



XXXI. Olomoucké hematologické dny

XXI. Konference ošetřovatelství a zdravotních laborantů
10th Symposium on Advances in Molecular Hematology

Hlavní téma

**Léčba chorob krvetvorby
v seniorském věku**



**Sborník
abstrakt**

28. – 30. 5. 2017

NH Collection Olomouc Congress
a Omega centrum Olomouc

www.olhemdny.cz



Lékařská fakulta
Univerzity Palackého
v Olomouci



Hemato-onkologická
klinika
Fakultní nemocnice
Olomouc

Haimaom
Nadace na podporu transplantace kostní dřeně



POŘADAJÍ

Lékařská fakulta UP v Olomouci
 Hemato-onkologická klinika FNOL a LF UP
 Nadace HAIMAOM, nadace na podporu transplantace kostní dřeně
 Sekce onkologie České asociace sester

POD ZÁŠTITOU

České hematologické společnosti ČLS JEP

doc. MUDr. Romana Havlíka, Ph.D., ředitele FN Olomouc

prof. MUDr. Milana Koláře, Ph.D., děkana LF UP v Olomouci

Mgr. Dalibora Horáka, náměstka hejtmana Olomouckého kraje

OBSAH

PREZIDENTSKÉ SYMPOZIUM	2
POSTGRADUÁLNÍ SEKCE 1	2
WIEDERMANNOVA PŘEDNÁŠKA	4
POSTGRADUÁLNÍ SEKCE 2	4
SYMPOSIUM ON ADVANCES IN MOLECULAR HEMATOLOGY 1	5
OŠETŘOVATELSTVÍ 1	8
SYMPOSIUM ON ADVANCES IN MOLECULAR HEMATOLOGY 2	10
OŠETŘOVATELSTVÍ 2	14
LYMFOMY	17
PODPŮRNÁ PÉČE U SENIORŮ	21
PSYCHOLOGIE	22
KONFERENCE ZDRAVOTNÍCH LABORANTŮ	23
CHRONICKÁ LYMFOCYTÁRNÍ LEUKEMIE	25
AKUTNÍ LEUKEMIE/MYELODYSPLASTICKÝ SYNDROM	28
CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKÉMIE/MYELOPROLIFERATIVNÍ NEOPLÁZIE	33
KONFERENCE ZDRAVOTNÍCH LABORANTŮ 2	37
LABORATORNÍ HEMATOLOGIE	40
MNOHOČETNÝ MYELOM 1	41
CYTOPENIE	43
MNOHOČETNÝ MYELOM 2	46
POSTEROVÁ ČÁST	50
JMENNÝ REJSTŘÍK AUTORŮ	80



Lékařská fakulta
 Univerzity Palackého
 v Olomouci



Hemato-onkologická
 klinika
 Fakultní nemocnice
 Olomouc

Haimaom
 Nadace na podporu transplantace kostní dřeně



Česká hematologická
 společnost ČLS JEP



FAKULTNÍ NEMOCNICE
 OLOMOUČ



Olomoucký kraj

AKREDITOVÁNO

EUROPEAN
 HEMATOLOGY
 ASSOCIATION

Sborník abstrakt vydalo

Vydavatelství UP Olomouc
 Univerzita Palackého v Olomouci
 Křížkovského 8
 771 47 Olomouc
 ISBN 978-80-244-5159-6
 Olomouc, 2017
 Neprodejná publikace
 1. vydání

Odpovědní redaktori:

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

1.

Diferenciální diagnostika monoklonálních gamapatiíŠčudla V. (*Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc*)

Edukační sdělení – abstrakt nedodán.

2.

Diferenciální diagnostika lymfocytózyDoubek M. (*IHO, FN, Brno*)

Přehledové sdělení diferenciální diagnostiky lymfocytózy. Sdělení zahrnuje diagnostiku lymfocytózy, benigní příčiny lymfocytózy, věnuje se monoklonální B lymfocytóze i malignitám (chronické lymfocytární leukemii, leukemii z vlasatých buněk a dalším).

3.

Klinický význam trombofilních stavů dnesDulíček P. (*IV. Interní klinika-hematoonkologie, FN, Hradec Králové*)

Edukační sdělení – abstrakt nedodán.

POSTGRADUÁLNÍ SEKCE 1

4.

Léčba starších nemocných s chronickou lymfocytární leukémií v roce 2017Smolej L. (*IV. interní hematologická klinika, FN, Hradec Králové*)

Je dobře známo, že chronická lymfocytární leukémie (CLL) je onemocněním převážně starších osob (medián věku v době diagnózy kolem 65-72 let), což s sebou nevyhnutelně nese výskyt významných přidružených onemocnění, která mohou zásadním způsobem komplikovat léčbu. Klinický výzkum u CLL byl však dlouho zaměřen na mladší, „fit“ nemocné. V posledních pěti letech byl tento dluh vůči starším a komorbidním nemocným splacen a výsledky nových randomizovaných studií přinesly zřetelné zlepšení léčebných výsledků včetně prodloužení celkového přežití. V roce 2017 se nacházíme v situaci, kdy rozhodování o léčbě starších a komorbidních nemocných zejména v 1. linii je paradoxně ztíženo řadou kvalitních léčebných možností, které jsou k dispozici (Tab. 1). Ukazatele jako výkonnostní stav, vypočtená clearance kreatininu, počet a tíže přidružených onemocnění a individuální posouzení funkčního stavu nemocného nám mohou toto rozhodování usnadnit a stanovit léčebný cíl, na jehož základě je specifický typ terapie zvolen. V léčbě 1. linie je nyní u starších/komorbidních nemocných s CLL standardem chemoimunoterapie založená na kombinaci chlorambucilu s anti-CD20 monoklonální protilátkou (obinutuzumab, ofatumumab, rituximab). Další možnosti představují např. protokoly založené na bendamustinu (bendamustin + rituximab, bendamustin + ofatumumab) či nízkodávkovaný režim FCR (fludarabin, cyklofosfamid, rituximab). Po zavedení chemoimunoterapie se dalším přelomovým mezníkem stala cilená dlouhodobá terapie perorálními inhibitory signalizace B-buněčného receptoru (BCRi - ibrutinib, idelalisib) či proteinu bcl-2 (venetoklax), která vedla u relabované/refrakterní CLL i nemocných s poruchou signální dráhy TP53 k dalšímu zlepšení účinnosti. Ibrutinib a kombinace idelalisib + rituximab jsou tedy hlavními léčebnými možnostmi u relabující/refrakterní CLL a v 1. linii v případě delece/mutace TP53; venetoklax je indikován v případě selhání či nevhodnosti léčby BCRi. Nové preparáty mají odlišné spektrum nežádoucích účinků, na které je nutno pamatovat a včas řešit (gastrointestinální či jaterní toxicita, krvácení, fibrilace síní, syndrom nádorového rozpadu apod.). V neposlední řadě je nutno zmínit „finanční toxicitu“: náklady na nové preparáty v současnosti zřetelně přesahují částku 1 milion Kč na rok léčby, což přináší závažný dopad na financování zdravotní péče. Podpořeno grantem AZV 15-30015A MZ ČR, grantem AZV 16-32339A MZ ČR, programem PROGRES Q40/08 a RVO MZ ČR (FNHK, 00179906).

	Hlavní léčebná možnost*	Další možnosti*
1. linie bez delece/mutace TP53	Obinutuzumab + chlorambucil Ofatumumab + chlorambucil Rituximab + bendamustin Rituximab + chlorambucil	Alemtuzumab Bendamustin + ofatumumab Ibrutinib Nízkodávkovaný FCR (fludarabin, cyklofosfamid, rituximab) RCD (rituximab, cyklofosfamid, dexametazon) či obdobný režim
1. linie s deleci/mutací TP53	Ibrutinib Idelalisib + rituximab**	
Pozdní relaps bez delece / mutace TP53		zopakování předchozí linie či protokoly pro léčbu časného relapsu/refrakterní choroby
Časný relaps/refrakterní CLL či delece / mutace TP53	Ibrutinib Idelalisib + rituximab	Alemtuzumab BR (bendamustin + rituximab) Nízkodávkovaný FCR Ofatumumab RCD (rituximab, cyklofosfamid, dexametazon) či obdobný režim Venetoklax***

Tab. 1: přehled léčebných možností pro starší/komorbidní nemocné s CLL.

*abecední řazení; **při nevhodnosti jiné léčby; ***při deleci/mutaci TP53 a selhání/nevhodnosti léčby BCRi nebo selhání chemoimunoterapie a BCRi

5.

Myelodysplastický syndrom u starších nemocnýchRohoň P. (*Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc*)

Úvod: Myelodysplastický syndrom (MDS) je klonální onemocnění krvetvorné kmenové buňky. Zahrnuje širokou skupinu heterogenních klinických podjednotek. Fenotypový projev onemocnění je důsledkem kombinace 3 faktorů: dysplastické krvetvorby, periferní pancytopenie a rizika progresu do akutní myeloidní leukemie asi v 1/3 případů. Léčba je podmíněna rizikovou stratifikací pacienta (IPSS, IPSS-R) s přihlédnutím k celkovému zdravotnímu stavu (komorbidity). U významné části osob je zásadní léčebnou modalitou hemosubstituční (podpurná) péče. Transplantace krvetvorných buněk (aloSCT) zůstává jedinou léčbou s kurativním potenciálem, je ale stále významně limitována biologickým věkem pacientů. **Epidemiologie:** MDS je onemocněním převážně starších osob. Medián věku při diagnóze (> 70 let) a přibližně 86 % pacientů má v čase diagnózy (> 60 let), pouze v 6 % případů je nemoc nalezena u osob (< 50 let) (USA). Mírná převaha MDS je pozorována u mužů (s výjimkou izolované delece 5q). Část nemocných má před rozvojem nemoci chemoterapii nebo radioterapii (sekundární MDS). Z faktorů zevního prostředí dominuje expozice nikotinu a benzenu. Vyšší výskyt MDS je pozorován u některých vrozených onemocnění krvetvorby (např. Fanconiho anémie).

Patogeneze: MDS je onemocněním hemopoetické kmenové buňky. Genetické, epigenetické a imunitně zprostředkované změny v těchto buňkách vedou k oligoklonální expanzi prekurzorů MDS s poškozenou diferenciací a zvýšeným sklonem k apoptóze. Bylo potvrzeno, že určité somatické genové mutace ovlivňují globální genomovou stabilitu a souvisí s klonální dominancí a progresí MDS. Zahrnují např. změny v transkripčních faktorech (TP53, ETV6), spliceozomech (SRSF2) a epigenetických regulátorech (TET2, IDH1, ASXL1).

Klasifikace: V současnosti se používá klasifikace podle edice WHO z roku 2016.

Léčba: Vychází z mezinárodních léčebných doporučení, obecně ji lze shrnout následovně: A/ Pacienti s MDS nízkého a středního rizika-1 (dle IPSS): observace u asymptomatické cytopenie, rHuEPO u anemických pacientů, podpurná léčba (hemosubstituce, infekční profylaxe, chelatace), lenalidomid pro MDS del(5q) u anemických pacientů s hladinou EPO v séru > 500 IU/l nebo u pacientů neodpovídajících na léčbu rHuEPO, imunosupresivní léčba u hypoplastické formy. V případě vyššího počtu blastů ve dřeni, nepříznivé cytogenetiky u pacientů < 65 (70) let je možné zvážit aloSCT (střední riziko-1). B/ Pacienti MDS středního-2 a vysokého rizika (dle IPSS): < 65 (70) let nebo při dobrém celkovém stavu se preferuje aloSCT přímo při počtu blastů ve dřeni < 10 %, v případě vyššího počtu blastů nebo nepříznivém karyotypu po podání intenzivní chemoterapie nebo léčby azacitidinem. Sóló léčba azacitidinem se používá při nedostupnosti dárce a nepříznivém karyotypu. U pacientů > 65 (70) let nebo u pacientů ve špatném celkovém stavu nebo se závažnými komorbiditami lze podat pouze podpurnou léčbu a zvážit azacitidin. V současnosti do terapie pronikají nové molekuly: lusparcept a rigosertib. Literatura Arber AD, Orazi A, Hasserjian R et al. The 2016 revision to the World

Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia Blood 2016; 127:2391-2405. 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; 30:3376-3382. Goldberg SL, Chen E, Corral M et al. Incidence and clinical complications of myelodysplastic syndrome among United States Medicare beneficiaries. J Clin Oncol 2010; 28:2847-2852. Malcovati L, Hellström-Lindberg E, Bowen D et al. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet. Blood 2013; 122:2943-2964. Práce byla podpořena grantem LF_2017_007

6. Léčba mnohočetného myelomu u starších nemocných
Minařík J., Pika T., Bačovský J., Krhová P, Ščudla V. (Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc)

Medián věku se při diagnóze mnohočetného myelomu pohybuje kolem 65 let. Jde současně o věkovou hranici, která donedávna v České republice oddělovala transplantabilní nemocné od pacientů nevhodných k provedení autologní transplantace krevetvorných buněk. Ačkoli je v současnosti posunut věk pro transplantaci až k 70 rokům (při zachované biologické kondici), zůstává stále značný podíl jedinců ne-transplantabilních. Léčebné možnosti u těchto „seniorů“ jsou poměrně široké, nicméně do značné míry je nutné léčbu individualizovat s ohledem na věk, celkový stav, přidružená onemocnění a další faktory, které podmiňují tzv. „křehkost“ (fragilitu) nemocných. Indukční režimy používané obvykle u starších nemocných (VMP, RD a další) mají velmi dobrou účinnost, při léčbě relapsů jsou k dispozici nové léky s vynikajícím efektem a nízkou toxicitou, přesto je s ohledem na specifika stáří vhodné nemocné rozdělit do kategorií podle stupně fragility a upravit adekvátně léčbu. Křehcí nemocní obecně nesnesou intenzivnější léčebné režimy a limitující může být i dávka kortikosteroidů. I v klinických studiích mívají tito jedinci horší výsledky. Obvykle spočívá zhodnocení křehkosti na subjektivním posouzení ošetřujícím lékařem, případně podle škál dle Karnofského, ECOG či WHO. Jako vhodnější se jeví tzv. „frailty score“, které k posouzení fragility využívá několika sofistikovaných postupů. Náplní sdělení je poukázat na současné možnosti skórování starších nemocných, jejich výhody i nedostatky. Současně je cílem formulace obecných doporučení pro léčbu nemocných s mnohočetným myelomem v seniorském věku. S podporou grantu IGA_LF_2017_007.

WIEDERMANNOVA PŘEDNÁŠKA

7. Význam biopsie v hodnocení lymfoidních a myeloidních neoplázií: od diagnostiky k predikci prognózy a léčebnej odpovědi
Plank L. (ÚPA JLF UK a UN Martin a MBC, s.r.o., Martin – SK)

Edukační sdělení – abstrakt nedodán.

POSTGRADUÁLNÍ SEKCE 2

8. Aggressive non-Hodgkin lymphoma in the elderly
D'Amore F. A. (Dept. of Hematology Aarhus University Hospital, Aarhus – DK)

Edukační sdělení – abstrakt nedodán.

9. Stárnutí populace a hematologické malignity: predikce epidemiologické a léčebné zátěže dle recentních dat
Dušek L. (IBA MUNI, Brno/Praha)

Edukační sdělení – abstrakt nedodán.

10. Etické aspekty futilní léčby
Vácha M. (Ústav etiky a humanitních studií, 3. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Praha)

Edukační sdělení – abstrakt nedodán.

SYMPOSIUM ON ADVANCES IN MOLECULAR HEMATOLOGY 1

11. The complexity of BCR signaling in CLL and other B cell malignancies: from the basic science to clinical applications
Mráz M. (IHOK, FN Brno a LF MU, Brno; CEITEC Masarykova univerzita, Brno)

The physiology of B cells is intimately connected with the function of their B cell receptor (BCR). B cell leukemias and lymphomas frequently (dys)regulate BCR signalling and thus take advantage of this pre-existing pathway for B cell proliferation and survival. This has recently been underscored by clinical trials demonstrating that small molecules (fosfatinib, ibrutinib, idelalisib) inhibiting BCR-associated kinases (SYK, BTK, PI3K) have an encouraging clinical effect in multiple B cell malignancies. It was shown that BCR inhibitors interrupt a plethora of microenvironmental interactions and mobilize malignant B cells from lymph node niches and bone marrow into the blood stream. The understanding of how precisely BCR inhibitors affect the behaviour of CLL and other malignant B cells is a key to the design of rational combinatorial therapeutic strategies. Moreover, the reasons for malignant B cells' dependence on this pathway are different in each B cell lymphoma/leukemia, and its specific subtypes. We will review the current knowledge of the specific aspects of BCR signalling in chronic lymphocytic leukaemia (CLL), diffuse large B cell lymphoma (DLBCL), follicular lymphoma, and normal B cells. Multiple factors can contribute to BCR (dys)regulation in these malignancies and the activation of "chronic" or "tonic" BCR signalling. In malignant B cells the balance of initiation, amplitude and duration of BCR activation can be influenced by a specific immunoglobulin structure, the expression and mutations of adaptor molecules, and the activity of kinases or phosphatases. Importantly, we have shown that also non-coding RNAs such as microRNA miR-150 and miR-155 can influence the propensity of BCR signalling in B cells, and novel data about non-coding RNAs' role in this pathway will be presented. We will also discuss the new findings about the crosstalk of BCR with other microenvironmental interactions such as adhesion and chemokine signalling. We will describe the progress in understanding of gene expression changes after in vivo application of ibrutinib, and the implications of this for targeted therapy. We will show that the "BCR inhibitors" target multiple pathways interconnected with BCR, including the CXCR4-SDF1 axis that regulates the expression of CD20, and anti-apoptotic molecules. Supported by: This work has received funding from Czech Science Foundation (project GA16-13334Y); Supported by Ministry of Health of the Czech Republic, grant nr. 16-29622A. All right reserved; The results of this research have been acquired within CEITEC 2020 (LQ1601) project with financial contribution made by the Ministry of Education, Youths and Sports of the Czech Republic within special support paid from the National Programme for Sustainability II funds; MH CZ - DRO (FNBr, 65269705). This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 692298. This publication reflects only the author's view and the Research Executive Agency is not responsible for any use that may be made of the information it contains. Contact: marek.mraz@email.cz

12. Characterization and integration of mantle cell lymphoma microenvironments are determinant for the development of rational targeted therapies
Chiron D. (CRCINA, IRS Université de Nantes 8, Nantes - FR)

Mantle cell lymphoma (MCL) accumulates in lymph nodes (LN) and disseminates early on in extranodal tissues. Recent effort has been invested on the identification of intrinsic MCL abnormalities but little attention has been paid to the importance of the surrounding cells and soluble factors in this pathology. Further investigations that integrate the key role of the microenvironments are now

needed to overcome drug resistance in this incurable malignancy. Despite a significant level of the proliferation index Ki67 in LN, we did not detect any proliferating peripheral blood (PB) MCL cells, suggesting a major role of the tumor ecosystem. To determine whether stromal (hMSC) or lymphoid-like (CD40L) interactions could support survival and proliferation, primary circulating MCL cells were cocultured *ex vivo*. In all the 21 samples tested, CD40L, but not hMSC, induced cell-cycle progression that was amplified by a MCL-specific cytokine cocktail (Ck). To determine the microenvironment dependent molecular modulations, RNA-seq in MCL cells from PB or cocultured was performed (n=8) and compared with genes expressed in MCL cells from LN and PB (Geo, PB n=77, LN n=107). More than 65 % of genes induced by "CD40L+Ck" were also upregulated in the LN. Our model recapitulated molecular signatures that are characteristic of MCL i.e., cell cycle, BCR, NFkB, NIK and survival, confirming the relevance of the coculture. We further studied the coculture-induced regulation of the genes belonging to the survival signature. The major regulation was an increase in expression of Bcl-xL protein associated with a striking downregulation of Bcl2 and Bim. Using the functional BH3-profiling assay, we demonstrated that, whereas PB MCL cells were dependent on Bcl2 for survival, Bcl-xL upregulation was responsible for loss of mitochondrial priming and drug resistance. Consequently, whereas clinically available Bcl2 BH3-mimetic efficiently triggered apoptosis in PB MCL, cells protected by the microenvironment were resistant. We then hypothesized that targeting BclxL could increase treatment efficacy. By integration of microenvironment modulations using our coculture model, we developed efficient targeted strategies (i.e.: BTK inhibitor, Type II anti-CD20), which counteract BclxL overexpression and overcome drug resistance in primary cells *ex vivo*. This strategy should target cells protected into their niches and our ongoing OAsIs Trial (NTC#02558816) will rapidly determine *in vivo* efficacy in MCL. In summary, we reported here the development of a relevant model that provides new insights into the microenvironment-dependent regulation of proliferation and Bcl-2 family expression. Our increased understanding of intrinsic abnormalities and the integration of extrinsic signaling offer new opportunities to design mechanism-based strategies to overcome drug resistance in MCL and potentially in other B cell malignancies.

13.
BH3 profiling as a tool to identify the acquired resistance to venetoclax in multiple myeloma
Dousset Ch., Maïga S., Gomez-Bougie P., Le Coq J., Touzeau C., Moreau P., Le Gouill S., Chiron D., Pellat-Deceunynck C., Moreau-Aubry A., Amiot M. (Centre de Recherches en Cancérologie et Immunologie Nantes Angers (CRCINA), IRS Université de Nantes 8, quai Moncoussu, Nantes – FR)

Venetoclax/ABT-199 is the first in class Bcl-2 specific BH3 mimetic and among the most promising targeted therapy in oncology. Venetoclax is currently approved by the Food and Drug Administration for the treatment of patients with relapsed chronic lymphocytic leukemia (CLL) with 17p deletion and under investigation in multiple myeloma. Multiple myeloma is heterogeneous and includes patients with translocation of the IgH locus on chromosome 14 with different chromosomes (4, 6, 11 or 16) and patients with a hyperdiploidy involving odd chromosomes. Venetoclax induces apoptotic cell death in a sub-group of myeloma patients that carried the t(11;14) translocation and expressed a high Bcl-2/Mcl-1 gene expression ratio. In contrast, resistance to venetoclax is mediated by a high Mcl-1 expression in other myeloma subgroups. The expected use of venetoclax alone or in combination with other agents in the treatment of myeloma leads us to explore the mechanisms of acquired venetoclax resistance. We investigated whether the acquired resistance to venetoclax might be different from the intrinsic resistance. We derived resistant sublines from initially KMS12-PE and XG5 t(11;14) myeloma venetoclax highly sensitive cell lines (LD50 15 and 5nM respectively). Cell lines were cultured during several months with increasing venetoclax concentrations until cells were able to maintain viability with 2µM venetoclax. We first provided evidence that venetoclax resistant sublines (XG5-199R and KMS12PE-199R) displayed cross-resistance to bortezomib. Indeed, both resistant sublines had a strong reduction in bortezomib sensitivity, which is characterized by an inhibition of intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. We then demonstrated that both resistant sublines exhibited a strong increase in both Mcl-1 mRNA and protein levels. Beside Mcl-1, the other Bcl-2 anti-apoptotic proteins were not significantly modified. Strikingly, a total lack of both Bax and Bak effector proteins characterized the XG5-199R subline. According to its strong sensitivity to venetoclax, XG5 cells exhibited a primed Bcl-2 profile. In contrast, using BH3 profiling we found that XG5-199R cells were unprimed. The XG5-199R unprimed status could be explained

by the absence of Bax and Bak effector proteins. Finally, by sequencing BAX gene, we identified a mutation at position Q52 leading to a stop codon, which resulted in a very short Bax truncated protein missing all the BH domains. KMS12PE-199R was characterized by a decline in several pro-apoptotic proteins (i.e., Bak, Bim, Bik and Puma). Like XG5, KMS12-PE had a primed Bcl-2 profile. Of interest, a switch in the dependence on Bcl-2 in KMS12PE cells towards Mcl-1 was demonstrated in KMS12PE-199R cells. Accordingly, co-immunoprecipitations demonstrated that BIM was mainly associated with BCL-2 in parental cells, and completely associated with MCL-1 in KMS12PE-199R. Finally, we found that KMS12PE-199 acquired resistance could be overcome by A1210477, a recently discovered potent Mcl-1 inhibitor. In conclusion, the XG5-199R and KMS12PE-199R acquired models of venetoclax resistance in myeloma reflect two main ways to escape to apoptosis, either by a reduction of BH3 only proteins or by a loss of effector multidomain proteins both being accompanied by an increase of Mcl-1 level of expression. Both models of acquired resistance affect the mitochondrial priming and/or the dependency on individual anti-apoptotic protein of the cells. Finally, BH3 profiling throughout venetoclax treatment could be a valuable assay to assess the acquisition of resistance in myeloma patients.

14.
Deregulation of hematopoiesis in patients with mature B cell malignancies

Klener P., BC Lenyetele Maswabi, Molinsky J. (I. Interní klinika – klinika hematologie, VFN, Praha; Ústav patologické fyziologie 1.LF UK, Praha)

We analyzed bone marrow (BM) samples from 131 patients with mature B-cell malignancies (PT) including chronic lymphocytic leukemia (CLL, n=20), mantle cell lymphoma (MCL, n=26), diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL, n=35), follicular lymphoma (FL, n=25), and multiple myeloma (MM, n=25), compared to 13 samples obtained from age-matched healthy volunteers (CTRL). By flow cytometry we analyzed absolute and relative numbers of hematopoietic stem and progenitor cell (HSPC) populations. In addition we carried out gene expression analysis of selected key regulators of hematopoiesis in hematopoietic stem cells (HSC) obtained from PT compared to CTRL. We demonstrated that normal hematopoiesis in patients with mature B-cell malignancies is quantitatively and qualitatively deregulated. First, we observed decrease in absolute numbers of certain HSPC populations in a subgroup of PT samples with BM involvement. The suppression of absolute HSPC numbers thus appears to be the consequence of the presence of malignant lymphocytes in the BM microenvironment. Second, we observed alterations in relative numbers of HSPC in PT samples irrespective of BM involvement. Third, we demonstrated deregulated transcription of key regulators of hematopoiesis including RUNX1, PU.1, IKAROS, MCL1, ABCB1 or MYC in HSCs isolated from PT compared to CTRL samples. Interestingly, the qualitative deregulation did not correlate with BM involvement, but appears to be the consequence of extramedullary-located lymphoma.

15.
MYC-dependent repression mechanism of the MIR150 transcriptional regulation in chronic myeloid leukemia

Burda P., Čuřík N., Šrůtová K., Savvulidi F., Silvestri G., Klamová H., Pecherková P., Sovová Ž., Koblíhová J., Stopka T., Perrotti D., Machová Poláková K. (Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague; Institute of Pathophysiology, 1st Medicine Faculty, Charles University, Prague; Department of Medicine, Greenebaum Cancer Center, University of Maryland Baltimore, Baltimore – USA; BIOCEV, Biotechnology and Biomedicine Center of the Academy of Sciences and Charles University, Vestec)

The expression of miRNAs is regulated at transcriptional and posttranscriptional levels. Dysregulation of miRNAs could directly induce or be a consequence of oncogenic pathways. Chronic myeloid leukemia (CML) is characterized by reduced miR-150 levels leading to an insufficient repression of its target, oncogene MYB. CML treatment with imatinib normalizes miR-150 levels. However, little is known about miR150 upstream transcriptional regulation. MiR-150 is an inhibitor of oncogene MYB, which is required for BCR-ABL1-dependent leukemogenesis in CML blast crisis. Our recent work brought an evidence of mutual BCR-ABL1/MYC/miR-150/MYB regulatory links in CML, sustained in CML resistant cells. We found low levels of miR-150 to be a hallmark of CML and impaired signaling pathway MYB/BCR-ABL1/MYC/miR-150/miR-155/PU.1 leading to a progressive cell differentiation block. The aim of our work was

to delineate potential mechanisms of the miR-150 transcription regulation. Initially we observed that unlike MLL-AML diagnosis, CML is not characterized by a block of miR-150 maturation and that miR-150 levels negatively correlated with mRNA levels of the oncogenic transcription factor MYC in CML HSPCs ($p < 0.001$). Role of MYC in CML was further strengthened by imatinib induced MYC downregulation and restored miR-150 levels in CML cell lines K562 and KCL-22. Imatinib resistance in K562R and KCL-22R was characterized by further miR-150 downregulation. To assess the MYC role on regulating miR-150 levels we tested the MYC binding sites upstream the miR-150 gene. We detected MYC binding to the upstream CpG of the MIR150 gene in K562 and KCL-22. We also found a depletion of MYC from the MIR150 locus after the imatinib treatment. We suggested potentially synergistic route for imatinib-induced BCR-ABL1 inhibition. This could be processed not only directly but also through an inhibition of a mutual positive regulatory loop between MYC and BCR-ABL1. We also noticed MIR150-neighboring gene FCGRT (which is adjacent to the studied miR-150 CpG) to become activated by imatinib. We observed MYC levels dependent regulation of both genes, but FCGRT is activated by MYC. This different MYC regulatory role may be facilitated by the detected transcription factor CTCF binding to an insulator site between miR-150 promoter and the CpG. An activation of the insulator via CTCF binding changes an interaction between enhancers and promoters (Bell et al. 2000). CTCF was previously described to be an inhibitor of MYC transcription and we show CTCF transcription to be induced by imatinib. We conclude that miR-150 transcription regulation involves transcription factors-dependent epigenetic changes within the promoter and distal enhancers. We outlined a new insight into MYC/MIR150/BCR-ABL1/imatinib regulation loop in CML. Our work revealed a MYC role in miR-150 repression underlying the CML leukemogenesis, where miR-150 functions as a pivotal gatekeeper and its repression is probably required for CML establishment and is enforced in imatinib resistant CML.

Support: LH15104 of MSMT and 00023736 of MZCR

OŠETŘOVATELSTVÍ 1

16.

Křehcí senioři - cílová skupina geriatrické péče

Danielová L., Kísvetrová H. (Oddělení geriatry, FN, Olomouc; Centrum vědy a výzkumu, Fakulta zdravotnických věd, Univerzita Palackého, Olomouc)

Geriatry jako specializační obor se věnuje zvláštnostem zdravotního stavu seniorů, jejich specifickým potřebám, funkčnímu zdraví, průběhu klinického obrazu, ale i prevenci, diagnostice, léčení chorob a poruch ve stáří. Cílovou skupinou geriatry jsou senioři vykazující závažný, s involucí související pokles potencionálu zdraví, který vede ke specifickým zdravotním problémům, k funkčním deficitům, k modifikaci průběhu a manifestace chorob a k potřebě specifického geriatrického přístupu. V ČR je často mylně obor geriatry a geriatrický pacient ztotožňován pouze s problematikou ošetrovatelskou, sociální a následnou dlouhodobou ústavní péčí. Geriatrickou křehkost (frailty) můžeme chápat jako multikauzálně navozený stav organismu, věkově podmíněnou funkční a morfologickou deterioraci s typickým souborem projevů a příznaků. Na vzniku geriatrické křehkosti se podílejí faktory genetické, tělesné, psychické a exogenní. Některé faktory se vyskytují nápadně často např.: zánět, inzulinová rezistence, nechutenství, hubnutí, malnutrice, svalová atrofie a slabost, hypomobilita, apatie, deprese, důsledky a projevy chorob, nežádoucí účinky léků... Klinický obraz geriatrické křehkosti souvisí s poklesem zdatnosti, odolnosti, adaptability a funkčních schopností v jednotlivých oblastech. Nejčastějšími projevy jsou únava, pokles pohybové aktivity, psychomotorické zpomalení, deondice, sarkopenie, senzorycké deficity, poruchy paměti, chronická bolest, instabilita s pády... Pravděpodobnost pádu po 65. roce věku výrazně stoupá a téměř u 40-60 % starších osob hospitalizovaných v ošetrovatelských ústavech se vyskytl pád. Pády komplikují základní onemocnění, prodlužují dobu hospitalizace, zvyšují náklady na péči, snižují kvalitu života seniora. Na Oddělení geriatry FN Olomouc existuje od roku 2002 evidence a systém hlášení pádů. Sledování pádů, jejich kontinuální analýza příčin je jedním ze základních indikátorů kvality směřující k nastavení uvědomělých preventivních opatření. Zavedením tohoto systému vedlo na tomto pracovišti ke snížení výskytu pádů z téměř 15 % pádů z celkového počtu hospitalizovaných pacientů v roce 2004 na 5 % v roce 2016. V posledních třech letech je tento systém rozšířen o sledování pádů v souvislosti s přidruženými chronickými onemocněními jako možnou příčinou

instability a pádu (diabetes mellitus, ischemická choroba srdeční, centrální mozková příhoda, demence, anémie...) Z výsledků mimo jiné vyplývá, že z celkového počtu evidovaných pádů jich více jak 30 % vzniklo u pacientů s diagnostikovanou anémií (nejčastěji typu normocytární normochromní v. s. anémie chronických chorob). Vzhledem k demografickým změnám se problematika stárnutí a geriatrické křehkosti stává velmi aktuálním tématem, kterému je třeba se věnovat i v souvislosti s kvalitou života geriatrického pacienta a podporou péče o seniory v rodině.

17.

Mobilní hospicová péče – naše zkušenosti

Beneš P., Kirchnerová M., Mrozek Z. (Onkologická klinika, FN, Olomouc; KARIM FN a LF UP, Olomouc)

V ČR, podobně jako v ostatních evropských zemích, je nejčastějším místem úmrtí nemocnice - v případech akutní péče (50 %) a dlouhodobé péče (15 %). V domácím prostředí nastává kolem 20 % úmrtí. V těchto 20 % se jedná o náhlá, nečekaná úmrtí, kdy pacient umírá před příjezdem služby rychlé lékařské pomoci. Kvalifikovaným odhadem pouze asi 5 % úmrtí je očekávaných. V ČR bohužel nejsou k dispozici reprezentativní data o čerpání zdravotní péče u nemocných v závěru života. Srovnání výzkumu veřejného mínění z roku 2011 a reality vyznívá chmurně: asi 80% lidí nechce umírat v institucích, ale téměř stejný počet tam umírá. Prožít závěr života doma je v dnešní době umožněno pouze menší části nemocných. Důvodů je celá řada: obtížné zvládnutelné symptomy, ošetrovatelská náročnost či nedostupnost služeb home care. Důležitou roli hrají také ekonomické aspekty v rodině. Mobilní hospicová péče má za cíl umožnit pacientům důstojné dožití v kruhu rodiny při zachování dobré kvality života. Tuto péči provádí zkušený multidisciplinární tým sestávající z lékařů (specialistů na paliativní medicínu), sestry, psychologa, sociálního pracovníka a duchovního. Je zajištěna péče 24 hodin, 7 dnů v týdnu. Péče je určena nemocným dospělým i dětem, kteří trpí nevléčitelnou chorobou v pokročilém a terminálním stádiu, kdy ošetřující lékař konstatoval, že byly vyčerpány všechny dostupné možnosti léčby.

18.

Zajištění vhodného žilního přístupu u pacientů s nádorovým onemocněním

Šebelová H., Špačková J., Kouřilová P., Kalodová Hadačová J., Hutáková B. (IHOK, FN, Brno)

Úvod V průběhu onkologické léčby u pacientů velmi často dochází k devastaci periferního žilního systému, která má mnohdy trvalý charakter a nepříznivě působí také na psychiku pacienta. Problematika zavedení vhodného žilního přístupu u onkologicky nemocného pacienta je v současné době velice aktuálním tématem. Touto problematikou se zabývá Společnost pro porty a permanentní katétry, která vydala doporučení pro volbu, optimální způsob zavedení a ošetření žilních vstupů. Metodika Na našem pracovišti při zajišťování žilního přístupu u onkologicky nemocného pacienta volíme hned z několika možných variant, tj. periferní kanyla, centrální žilní katétr, periferní implantovaný centrální žilní katétr (PICC) nebo intravenózní port. Při výběru vhodného žilního přístupu se rozhodujeme na základě několika kritérií. Jedná se především o typ nádorového onemocnění, předpokládanou délku léčby a sociální status nemocného. Periferní kanylu používáme především v období, než dojde ke stanovení základní diagnózy či k zajištění pacienta v akutním stavu. Centrální žilní katétr zavádíme u pacientů v akutním stavu, s akutní lymfatickou či myeloidní leukémií nebo u pacientů v transplantačním režimu. PICC na našem pracovišti zavádíme od roku 2015 a využíváme ho především u pacientů se středně dlouhou dobou léčby např. u pacientů s Hodgkinským lymfomem, s difúzním velkobuněčným B lymfomem nebo u pacientů v paliativní péči. Intravenózní port volíme v případech, kdy doba léčby je stanovena na dobu delší než jeden rok. To je například u pacientů s kolorektálním karcinomem, s karcinomem jícnu či jinou závažnou diagnózou. V současné době na našem pracovišti funguje databáze, která slouží k zaznamenávání střednědobých a dlouhodobých žilních přístupů u jednotlivých pacientů. Díky databázi jsme schopni analyzovat případné komplikace a problémy, které se mohou vyskytnout. Závěr V příspěvku prezentujeme problematiku využití jednotlivých typů žilních vstupů na našem pracovišti. Zvolení vhodného žilního vstupu pomáháme zajistit nejen efektivní péči, ale také vyšší komfort pro pacienta. Vzhledem k pokračujícímu nárůstu počtu nádorových onemocnění bude tato problematika i v budoucnosti velice aktuální. Tato práce vznikla v rámci projektu NIG FN BRNO 4/2014. „Podpořen MZ ČR – RVO (FNBr, 65269705)“.

19.

Porovnání žilních přístupů u allogenních dárců při odběru periferních kmenových buněk*Vodičková P., Kolomazníková D., Frančová Z., Bystrická E. (HOO FN, Plzeň)*

Allogenní transplantace krevetvorných buněk jsou základním a významným postupem při léčbě hematologicko - onkologických malignit. V současnosti jsou preferovaným zdrojem dárcovských krevetvorných štěpů periferní kmenové buňky. Jednou z podmínek provedení nekomplikovaného odběru je zajištění kvalitního žilního přístupu, který umožňuje dostatečný průtok krve mezi žilním systémem dárce a separačním přístrojem. Odběr lze provádět dvěma způsoby. První probíhá prostřednictvím periferních žil v loketních jamkách, za předpokladu kvalitního stavu žil na horních končetinách a jejich dobré přístupnosti. Odběrové sestry na aferetické jednotce jsou pravidelně a důkladně proškoleny v technice zavádění jehel do periferní žíly. Alternativou je zavedení dvoucestného dialyzačního žilního katétru do femorální žíly. Ten však pro dárce vždy představuje určité riziko jako např. bakteriální infekce, trombózy či krvácení v okolí místa vpichu. Zároveň prodlužuje dobu hospitalizace a snižuje komfort dárců. V prezentované retrospektivní analýze jsou vyhodnoceny žilní přístupy allogenních dárců, kteří podstoupili odběr periferních kmenových buněk od ledna 2012 do prosince 2016. Vyhodnocena byla následující data: demografické údaje, způsob žilního přístupu, počet aferéz, komplikace související s použitým žilním vstupem.

20.

Psychosociální problematika zdravotnického pracovníka: Mimořádná událost versus „malé životní tragédie“*Gehrová M. (Oddělení urgentního příjmu FN, Olomouc)*

Práce ve zdravotnictví přináší kontakt s nemocemi, ztrátami a lidským neštěstím či smrtí. Zdravotnické týmy jsou velmi kvalitně připraveny a vybaveny na záchranu lidského života. Méně často jsou připraveny na poskytnutí psychické podpory postiženému či jeho blízkým a na komunikaci s nimi. Při záchraně pacienta jsou zdravotníci konfrontováni s blízkými, u nichž došlo vlivem události k těžkému zasažení jejich psychického a emočního prožívání. Můžeme je také nazývat jako sekundárně zasažené krizovou událostí. Tito lidé mají potřeby, které by měl zdravotnický personál saturovat. Bohužel a také velmi často se stává, že zdravotnický personál používá ryze medicínský přístup, kterým oddalují přirozené prožívání krizové situace. V mnoha případech je to zcela zbytečné a z hlediska zpracování krizové situace může být toto pro zasaženého člověka velmi nevhodné. Existují možnosti, jak stávající nevyhovující situaci změnit. Jednou z možností je plošně připravit zdravotníky na samotný kontakt s psychicky zasaženými, ale ne zcela všichni zdravotníci jsou schopni tuto činnost zvládnout. Další z možností je připravit vycvičené týmy interventů psychické první pomoci, což se jeví jako nejvýhodnější. Klíčová slova: psychická první pomoc, intervent, sekundárně zasažení

SYMPOSIUM ON ADVANCES IN MOLECULAR HEMATOLOGY 2

21.

Novel therapeutic approaches to enhance innate immunity against cancer*Bauer T., Sibilia M. (Institute of Cancer Research, Medical University of Vienna, Vienna – Austria)*

The evasion of tumor cells from immune-recognition is a fundamental requirement for tumor manifestation and metastasis. Recent advances using immune-checkpoint inhibitors demonstrate the enormous potential of immune-modulation in the context of a tumor setting. Particularly fascinating is the possible cure in some patients, which proves that a time-limited hyper-activation of the immune system is sufficient to eradicate the malignant cells. The effective treatment of only a minor set of patients indicates the possibilities, but also shows that we are just at the beginning to unravel the enormous potential of the immune system in the fight against cancer. Recently we could identify two individual mechanisms by which immunomodulation of the innate immune system restrains tumor growth. Firstly, the direct killing of tumor cells by plasmacytoid dendritic

cells (pDCs) after activation with Imiquimod (Imi). Secondly, the negative impact of epidermal growth factor receptor (EGFR) expression on macrophages during tumor formation. Together, these findings enlighten the previously unknown mode of action in established and widely used human cancer therapies and show the enormous potential, which lies within the innate immune system to fight cancer.

22.

Importance of anti-tumor immune response for the outcome of cancer*Špišek R., Palich-Fučíková J. (Univerzita Karlova, 2.LF UK; Praha Sotio, Praha)*

It is now clear that human neoplasms form, progress, and respond to therapy in the context of an intimate crosstalk with the host immune system. In particular, accumulating evidence demonstrates that the efficacy of most, if not all, chemo- and radiotherapeutic agents commonly employed in the clinic critically depends on the (re)activation of tumor-targeting immune responses. One of the mechanisms whereby conventional chemotherapeutics, targeted anticancer agents, and radiotherapy can provoke a therapeutically relevant, adaptive immune response against malignant cells is commonly known as „immunogenic cell death.“ Importantly, dying cancer cells are perceived as immunogenic only when they emit a set of immunostimulatory signals upon the activation of intracellular stress response pathways. The emission of these signals, which are generally referred to as „damage-associated molecular patterns“ (DAMPs), may therefore predict whether patients will respond to chemotherapy or not, at least in some settings. Here, we review clinical data indicating that DAMPs and DAMP-associated stress responses might have prognostic or predictive value for cancer patients.

23.

Regulation of the immune system and inhibitors of immune checkpoints in oncology and hematooncology*Šťastný M., Rýška A., Arenberger P., Arenbergerová M., Němejcová K., Dunder P., Krajsová I. (Bristol-Myers Squibb Czech Rep., Medical Dep., Praha; Fingerlandův ústav patologie LF UK a FN, Hradec Králové; Dermatovenerologická klinika 3. LF UK a FN Královské Vinohrady, Praha; Ústav patologie 1.LF UK a VFN, Praha; Kožní klinika VFN Praha a 1.LF UK, Praha)*

There has been hundreds of clinical trials during the last 50 years, which tried to utilize the power of immune system in the fight against malignant diseases. However, until 2010, only few of them were successful and brought progress into the field of anticancer therapy. In 2011, two immunotherapeutic modalities were approved (dendritic cells for prostate cancer and anti-CTLA-4 therapy for metastatic melanoma), which restarted renaissance of immunotherapy. This field is now called immuno-oncology and targets immune system of the patient instead of tumor itself. T-cells as the most important players in anticancer therapy are characterized by many activating as well as inhibitory molecules on their surface. These receptors are participating in optimal tuning of the immune response against dangerous signals and foreign agents while at the same time maintain immune balance and reduce the risk of autoimmunity. CTLA-4 and PD-1 are the best known inhibitory receptors on T-cells. These „immune checkpoints“ block excessive activation of T-cells and thereby reduce the risk of autoimmune reactions at the place of intensive inflammation. CTLA-4 is key inhibitory molecule found on the surface of activated T-cells. While it appears on the surface of T-cells 2-3 days after their activation, it is constitutively expressed on the surface of regulatory T-cells. Mice with knock-out gene for CTLA-4 are born but die within 3-4 weeks due to development of lymphoproliferative disease with multiorgan lymphocyte infiltration and tissue destruction. These data support an important role of CTLA-4 in downregulation of T-cell activation and maintenance of immunological homeostasis. Just recently, similar immune dysregulation has been described in humans with CHAI disease (CTLA-4 Haploinsufficiency with Autoimmune Infiltration). PD-1 is another inhibitory receptor on T-cells, which contributes to maintenance of peripheral tolerance and reduces the risk of immunopathological damage. PD-1 binds to two ligands (PD-L1/PD-L2) and this inhibitory pathway is important in the setting of persistent antigenic stimulation such as during encounter with self-antigens, chronic viral infections and tumors. In contrast to fatal outcome of CTLA-4 deficiency in mice, animals lacking

PD-1 suffer from various forms of autoimmunity (depending on genetic background of mice) with later onset during their life (arthritis, carditis and glomerulonephritis in C57Bl/6 mice and cardiomyopathy in BALB/c mice). It has been shown in preclinical experiments that transient blockage of PD-1 molecule leads to increased activation of T-cells and reduced tumor growth various animal models. These data led to anti-PD1 testing in humans with encouraging anticancer activity even during the phase I. safety trials. While anti-CTLA-4 therapy is currently approved only for metastatic melanoma, anti-PD1 therapies represent more widely used approach with many indications approved (melanoma, RCC, NSCLC, urothelial carcinoma, head and neck carcinoma and others). Huge impact of immunooncology in solid tumors will be discussed during the lecture together with recent approval of the first anti-PD1 therapies in hematooncology. Classical Hodgkin lymphoma (cHL) represents malignancy characterized by genetic abnormality leading to overexpression of PD-L1 and PD-L2 ligands on the surface of Reed-Sternberg (RS) cells. Expression of PD-1 ligands leads to evasion of the immune response (T-cell exhaustion with reversible inhibition of T-cell activation and proliferation). As a result, RS cells represent only 1-2% of tumor population surrounded by extensive, but ineffective inflammatory and immune-cell infiltrate making cHL an ideal target for anti-PD1 therapies.

24.

Neutrophils in chronic lymphocytic leukemia

Manukyan Gayane, Papajik T., Gajdoš P., Mikulková Z., Urbanová R., Gabčová G., Kudělka M., Turcsányi P., Ryznerová P., Procházka V., Kriegová E. (Department of Immunology, Faculty of Medicine and Dentistry UP, Olomouc; Institute of Molecular Biology NAS RA, Yerevan – Armenia; Department of Hemato-Oncology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University and University Hospital, Olomouc; Department of Computer Science, Faculty of Electrical Engineering and Computer Science, VSB-Technical University, Ostrava)

There is emerging evidence that neutrophils are capable not only perform their antibacterial functions but also affect chronic and progressive diseases such as leukemias. However, there is very limited information on the role of neutrophils in chronic lymphocytic leukemia (CLL). The aim of the present study was to analyze phenotyping and functional properties of circulating neutrophils in CLL. Fifty one CLL patients and 27 healthy controls were enrolled in the study. Constitutive expression of following markers (CD11b, CD15, CD16, CD62L, CD54, and CD64) as well as priming of neutrophils with LPS and oxidative stress capacity were analyzed using flow cytometry. Clinical and laboratory findings were incorporated into the study. Neutrophils from CLL patients displayed increased expression of CD64, CD11b and CD54 which suggest their activation state in the circulation. We compared the expression of surface markers in CLL subgroups. Active disease was associated with upregulated expression of CD64 ($P < 0.01$) and CD54 ($P < 0.05$). Treated CLL patients displayed simultaneously increased percentage and expression of CD64 ($P < 0.01$) and CD54 ($P < 0.01$). Patients with unmutated IGHV gene status had increased MFI of CD64 ($P < 0.05$) and decreased percentage of CD62L ($P < 0.05$) compared with mutated IGHV status. The percentage of CD64+ cells was lower in patients with Binet stage A comparing to stages B and C ($P < 0.05$). Besides, active disease was associated with a decrease of neutrophil percentage ($P < 0.001$) and increase percentage of lymphocytes ($P < 0.01$) and CLL cells ($P < 0.01$) comparing to non-active disease. Patients with unmutated IGHV gene status had lower percentage of neutrophils than those with mutated IGHV ($P = 0.05$). Spontaneous and induced with fMLP and PMA oxidative stress was markedly elevated in neutrophils from CLL patients compared to healthy ones ($P < 0.05$, $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively). LPS up-regulated TLR2 in healthy cells ($P < 0.05$), while TLR2 expression was down-regulated in CLL cells ($P < 0.05$). In contrast to healthy cells, LPS-stimulated CLL neutrophils failed to induce releasing of IL-1 β and TNF- α . Taken together, our data provide first evidence that neutrophils in CLL are permanently primed and have functional defects. Functional properties of CLL neutrophils may account for the heightened sensitivity to bacterial infection as well as influence the disease course. The significant association of neutrophil activation markers and their number with the disease course warrants further investigations to clarify possible pro-leukemic or anti-leukemic properties of circulating neutrophils in CLL.

Grant support: MZ ČR VES16-32339A, IGA_LF_2017_009.

25.

BCR-ABL1 Mutations are acquired during resistance development in de novo CML KCL-22 cells but not in aged cells

Čuřík N., Polívková V., Kalina T., Kanderová V., Linhartová J., Savvulidi F., Toman O., Blagojevičová K., Motlová E., Kačerová L., Ransdorfová Š., Březinová J., Klamová H., Machová Poláková K. (Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague; Department of Paediatric Haematology and Oncology Univ. hospital Motol, Prague; Institute of Pathological Physiology, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague)

BCR-ABL1 kinase domain (KD) mutations are responsible for about 50 % of resistance to tyrosine kinase inhibitors (TKIs) treatment in chronic myeloid leukemia (CML) patients. However, mechanisms underlying KD mutation acquisition in TKI-resistant CML cells are not yet well understood. We aimed to study an acquisition of mutations in the KD after exposure of de novo and aged (grown in optimal growing medium for 24 months) KCL-22 cells to imatinib (IM). In addition, we examined dynamics of mutated sub-clones in established IM-resistant KCL-22R culture after dose-reduction of IM. We also studied changes in the expression profile of KCL-22 cultures early after exposure to IM. The occurrence and the dynamics of expansion of BCR-ABL1 mutant sub-clones were studied using next-generation deep sequencing in KCL-22 cells treated with 0.4 μ M IM and in established IM-resistant KCL-22R cells at 4 μ M IM. Next, KCL-22R cells were sorted according to the CD38 expression to explore whether CD38 is associated with the acquisition of BCR-ABL1 mutations as suggested by Wang et al. (PLOS Genetics 2014). A protein array was used allowing analysis of 576 proteins per sample. DNA damage pathway-RT Profiler PCR arrays were applied for gene expression analysis. No BCR-ABL1 KD mutations were detected in de novo untreated KCL-22 cells, however T315I and E255K appeared after exposure of the cells to 0.4 μ M IM. PCR array revealed increased expression of SUMO 1 ligase and ERCC2 involved in the nucleotide excision repair pathway. Notably, we also found significant decrease of G2/M-checkpoint protein GADD45A whose deficiency is associated with mutagenesis (Hollander et al., Cancer Research 2001). During the first culture period, T315I slowly emerged whereas E255K was not detectable. Later, E255K-bearing cells also became detectable and increased over time. A similar time-dependent expansion of mutant-bearing sub-clones was seen in the KCL-22R cells growing at 4 μ M IM. Interestingly, a mutant-clone switch from T315I to E255K in KCL-22R was accelerated after IM reduction from 4 μ M to 1 or 2 μ M. Moreover, emerging of E255K sub-clone was accompanied by rapid decrease of CD38 expression in KCL-22R cells. Screening of transitional KCL-22R culture carrying both T315I and E255K sub-clones revealed T315I transcripts were expressed only in the CD38+ subpopulation, while E255K was detected only in CD38- cells. We found, that unlike to de novo KCL-22 cells, imatinib-naïve aged KCL-22 cells developed resistance after exposure to IM without acquiring BCR-ABL1 KD mutations up to follow-up of 60 days after the cells exposure to 0.4 μ M IM. Neither BCR-ABL1 upregulation nor gene amplification was presented in these cells, however we identified considerably upregulated (D7, DTX3, ETV6, GLUL, HCLS1, HIF1 α , IGF1R, MAP2K7, MYH11, TP53) or downregulated (BAD, BID, MCL2 NOTCH3, PDKPK1) proteins 4 weeks after the exposure to IM. Increased expressions of HIF1 α and IGF1R proteins are known to ensure proliferation, while decreased expressions of pro-apoptotic proteins BAD and BID enhance survival of CML cells in the presence of TKIs. Our observation suggests the ability of KCL-22 cells to survive and proliferate early after exposure to IM. BCR-ABL1 mutations development seems to be related to a mutagenesis of imatinib on de novo KCL-22 cells, but not on aged KCL-22 cells that activated signaling pathways ensuring their survival and growing in the presence of the tyrosine kinases inhibitor. Supported by the project no. 00023736 and AZV 15-31540A of MZCR and ERDF OPK CZ.2.16/3.1.00/28007

26.

Specifika péče o LGBT (lesbian, gay, bisexual, and transgender) seniory s onkologickou diagnózou

Špatenková N., Olecká I. (Katedra sociologie, andragogiky a kulturní antropologie, FF UP, Olomouc; Ústav sociálního lékařství LF UP, Olomouc)

Stárnutí populace je aktuálním demografickým trendem. Nedílnou součástí této stárnoucí populace jsou také LGBT seniory/ry. Hematoonkologická onemocnění se nevyhýbají nikomu, tedy ani lesbám, gayům, bisexuálům či transgender (LGBT) osobám. V rámci péče o hematoonkologické pacienty se tak objevuje nové a doposud nediskutované téma specifické péče o tuto marginalizovanou skupinu seniorů/rek. Jsou instituce poskytující zdravotní péči připraveny pečovat o LGBT seniory/ry s hematoonkologickou diagnózou? Jsou v těchto institucích schopni, resp. ochotni vyjít vstříc specifickým potřebám těchto osob? A mají vůbec LGBT seniory/ry s hematoonkologickým onemocněním nějaké specifické potřeby? Liší se nějak péče o nemocné LGBT seniory oproti majoritní populaci a přístup k nim? Na tyto (a další otázky) jsme se pokusili najít odpověď v našem výzkumu „Neviditelné (LGBT) menšiny“ financovaného z EHP/Norwegian Funds. Design výzkumu byl založen na výzkumné otázce: Jsou poskytovatelé zdravotní péče připraveni poskytovat služby LGBT osobám? Vzhledem k povaze tématu bylo pro zodpovězení nastolené výzkumné otázky zvoleno kvalitativní výzkumné paradigma, konkrétně interpretativní fenomenologická analýza. Výzkumu se zúčastnilo celkem šest manažerů zdravotnických institucí. S touto výzkumnou skupinou byly provedeny polostrukturované rozhovory. Následně byli dotazováni ve dvou focus group první poskytovatelé péče, přičemž první focus group tvořilo 10 nelékařských zdravotnických pracovníků a druhou focus group tvořilo 9 studentů sociálně zdravotní péče s minimálně roční praxí. Věková struktura participantů byla od 19 do 50 let. Každá z focus group trvala zhruba hodinu a půl. Výsledky ukázaly, že zkušenost manažerů ve zdravotnictví i přímých poskytovatelů péče s LGBT osobami je velmi malá a v podstatě se tak byl potvrzen fakt, že téma LGBT seniorů/rek není v ČR vůbec řešeno, nemluví se o něm, odborná veřejnost není o tomto tématu vůbec informována. Participant výzkumu se nicméně shodli na tom, že se jedná o téma společensky naléhavé a že by rozhodně mělo být diskutováno. Nebránili by se proto ani nějaké formě edukace, vzdělávání či osvěty v této oblasti.

Grantová podpora: „Neviditelné menšiny“, EHP/Norwegian Funds.

27.

Alternativní medicína a lymfom

Kopálová N., Špačková J., Janíková A., Hanáková S., Kartašová Š., Chlubnová J. (IHOK, FN, Brno)

Úvod: Alternativní medicína (AM) a její metody se v současnosti berou jako nový fenomén. Avšak některé její metody jsou známé a využívány už po celá staletí. Jednou z těchto metod je třeba i bylinkářství, které stálo u zrodu vědecké medicíny. Lidé si odjakživa přáli být zdraví a mít kvalitní život. Vznikem farmaceutického průmyslu se podařilo vymýtit zcela některé nemoci, na které v minulosti umírala spousta lidí. Časem ale vyšli najevo i negativa spojená s výrobou a užíváním synteticky vyráběných léčiv. Lidé se opět pomalu začali vracet k tradičním léčivým prostředkům a opět začali věřit v sílu přírody. Lymfomy jsou poměrně heterogenní skupina diagnóz. Úspěšnost léčby u pacientů s lymfomem se neustále zvyšuje. Samozřejmě platí obecné pravidlo, že čím dřív pacient přijde, tím lepší jsou jeho vyhlídky na vyléčení. Toto onemocnění je citlivé jak na cytostatickou, tak i na radioterapeutickou léčbu. Léčba má však mnoho nežádoucích účinků a to je zřejmě důvodem, proč se rodina pacienta nebo známí pokouší hledat různé cesty, jak pacientovi pomoci. K tomu patří i hledání různých metod alternativní medicíny.

Metoda: Cílem výzkumu bylo zjistit používání různých metod alternativní medicíny u nemocných s lymfomem. Pro sběr dat byl použit dotazník. Výzkum proběhl na půdě FN Brno, ambulantní části Interní hematologické a onkologické kliniky. Jediným kritériem pro zařazení do výzkumu bylo diagnostikované nádorové onemocnění - lymfom. Bylo osloveno celkem 200 respondentů. Z navrácených 130 dotazníků muselo být 25 dotazníků tj. 19,23 % vyřazeno, jelikož u 23 dotazníků byla vyplněna pouze počáteční, obecná část, čímž byly ale získány aspoň informace o non-respondentech. 2 dotazníky se vrátily celé nevyplněné a 70 dotazníků se nevrátilo vůbec. Reprezentativní vzorek respondentů tvořilo tak 105 osob (n=105), čemu odpovídá 100 %.

Výsledky: Z výsledků dotazníkového šetření vyplynulo, že vztah pacientů s lymfomem k alternativní

medicině je kladný. Z našeho výzkumu vyplynulo, že o alternativní medicíně se 64 (60,95 %) respondentů dozvědělo z médií, 46 (43,81 %) respondentů má informace od rodiny a známých, 28 (26,67 %) z literatury, 5 (4,76 %) od lékaře a 10 (9,52 %) respondentů uvádí, že se o AM dovědělo jinak (přednáška). Metody AM vyzkoušelo 73 (69,52 %) respondentů. Z celkového počtu 73 (100%) respondentů, kteří uvedli, že vyzkoušeli nějakou metodu AM, jich 40 (54,79 %) tedy více než polovina vyzkoušela potravinové doplňky a vitamíny, 39 (53,42 %) respondentů bylinné kúry a jako nejméně používaná alternativní metoda u nemocných s lymfomem se jeví chiropraxe, kterou vyzkoušel 1 (1,37 %) respondent. Dále jsme zjistili, že o užívání metod AM 32 (43,83 %) respondentů informovalo lékaře, 21 (28,77 %) respondentů si myslí, že informovat lékaře o tom, že užívají nějakou metodu alternativní medicíny je zcela zbytečné, 7 (9,59 %) respondentů mělo obavy se zeptat, stejnému počtu lékařů doporučili nic takového neužívat a 6 (8,22 %) respondentů možnosti týkající se alternativní medicíny probralo se zdravotní sestrou. **Závěr:** Při léčbě alternativními metodami je největší riziko pro pacienta vědecká nepodloženost účinků této léčby. Pacienti by se neměli bát zeptat na možnost podpory alternativními prostředky a naopak, zdravotničtí pracovníci by se jim neměli vysmívat nebo kritizovat je za jejich názor. Je nesmírně důležité najít si na pacienta čas a probrat s ním jeho možnosti. Jsme přesvědčeni o tom, že nemocní, zejména onkologicky nemocní budou vždycky hledat různé způsoby, které by vedly k jejich uzdravení. A proto si myslíme, že další výzkum v oblasti alternativní medicíny má jistě smysl.

28.

Příprava pacienta a odběr periferních kmenových buněk

Drahošová R., Strnadová B. (IV. interní hematologická klinika, FN, Hradec Králové)

Příspěvek prezentuje přípravu pacienta a odběr periferních kmenových buněk na IV. Interní hematologické klinice Fakultní nemocnice Hradec Králové. Hematopoetická kmenová buňka (HSC) dává vzniknout v procesu krevtvorby různým buňkám. Z této kmenové buňky vznikají červené krvinky, krevní destičky i různé bílé krvinky. Tyto kmenové buňky sídlí v kostní dřeni a neustále se dělí, aby doplňovaly zásobu krevních elementů v krvi. Za normálních okolností je v periferní krvi jen minimální množství kmenových buněk. K jejich vyplavení používáme tzv. „mobilizaci“, která spočívá v podání kombinace chemoterapie a růstového faktoru (G-CSF), nebo jenom růstového faktoru. Po několika dnech dojde k vyplavení periferních kmenových buněk (PKB) do periferní krve, následně se provádí jejich sběr pomocí separátoru krevních tělísek. Před vlastním sběrem je nutná důkladná edukace pacienta, kterou provádí edukační sestra ve spolupráci s transplantčním koordinátorem. Pacient má možnost navštívit separátorové centrum a prohlédnout si prostředí, separátor a po dohodě i vlastní výkon. U každého nemocného vyšetřujeme stav periferních žil (nutné 2 vstupy), při insuficienci se zavádí dialyzační katetr, většinou do v. femoralis. Před zahájením mobilizace jsou provedena vyšetření, která potvrdí, že pacient je schopen podstoupit transplantaci (UZ srdce, spirometrie, stomatologické vyšetření) a jsou odebrány tzv. infekční markery (krví přenosné infekce, zejména HIV, hepatitidy A, B, C, syfilis, CMV, EBV, toxoplazmóza). 5. den aplikace G-CSF zahajujeme kontroly krevního obrazu a při vzestupu leukocytů provádíme vyšetření přítomnosti CD 34+ buněk v periferní krvi. Při dosažení dostatečné koncentrace CD 34+ buněk v krvi zahajujeme separaci. Používáme separátory (zpočátku COBE Spectra, nyní Spectra Optia, Terumo BCT) pracující na principu centrifugace, kdy se oddělí jednotlivé součásti krve a PKB se odsávají do sběrného vaku. Ostatní krevní elementy se vracejí pacientovi. Výkon trvá několik hodin a podle výtěžku (množství CD 34+ buněk/kg pacienta) ve sběrném vaku o obsahu 150-200 ml se výkon opakuje 2-3 dny. Během výkonu je pacient upoután na lůžko, proto dbáme na maximální fyzický i psychický komfort pacienta. Pacient je pod neustálým dohledem sestry. Ošetřovatelská péče má z tohoto hlediska nezastupitelný význam, je pro sestru náročná, vyžaduje náležitou erudici o principech výkonu, o obsluhované technice a značnou pečlivost. Je jedním z rozhodujících faktorů pro úspěšné provedení celého výkonu. K nejčastějším nežádoucím účinkům patří projevy hypokalémie způsobené přidáním protisrážlivého roztoku (ACD-A) při separaci, bolest v místě vpichu jehly nebo kanyly, problémy se žilním vstupem (neprůchodnost), trombocytopenie a anémie po výkonu. Po odběru se vak s PKB transportuje na Tkářovou ústřednu k dalšímu zpracování a kryokonzervaci. PKB jsou uskladněny v tekutém dusíku při teplotě - 196 st.C, jejich životnost je 10-15 let.

Závěr: Úspěšný odběr periferních kmenových buněk je nezbytným krokem před autologní transplantací PKB, vyžaduje erudovaný a empatický personál. Neméně důležitá je týmová spolupráce.

29.

Extrakorporální fotoferéza v léčbě reakce štěpu proti hostiteli*Hušková M., Lánská M., Strnadová B. (IV. interní hematologická klinika, FN, Hradec Králové)*

Úvod: extrakorporální fotoferéza (ECP) je léčebná metoda využívaná při léčbě reakce štěpu proti hostiteli (GVHD – graft versus host disease), která může vzniknout jako závažná komplikace po alogenních transplantacích krvetvorných buněk. GVHD výrazně zhoršuje morbiditu, mortalitu a kvalitu života pacientů.

Metodika: metodu ECP využíváme na našem pracovišti od r. 2007. Do konce r. 2016 jsme touto metodou léčili 27 pacientů, kteří podstoupili transplantaci krvetvorných buněk od příbuzného nebo nepříbuzného dárce. Pacienti měli akutní nebo chronickou GVHD. ECP se zahajuje na separátoru krevních buněk (SPECTRA OPTIA), kde se odebere část leukocytů - lymfomonocytární frakce (MNC) z krve nemocného, následně se v aseptických prostorách v laminárním boxu přidá fotosenzibilizující látka 8- metoxypsoralen, poté se buňky ozáří ultrafialovým zářením na přístroji Macogenic G2 a koncentrát MNC je vrácen pacientovi.

Výsledek: celkem jsme u 27 pacientů provedli 1077 výkonů. ECP jsme prováděli standardně u akutní GVHD – 3x týdně do potvrzení negativního histologického nálezu GVHD, u chronické GVHD – 2 výkony ve 2 po sobě jdoucích dnech v intervalu 7 až 14 dnů při zahájení terapie, interval se při léčebné odpovědi po 3 měsících postupně prodlužuje až na 6-8 týdnů. Efekt ECP jsme u chronické GVHD hodnotili nejdříve za 3 měsíce od zahájení, podle klinického nálezu, funkčního vyšetření plic a možnosti vysazení kortikoidů. Ze sledovaného souboru k nám v současně době dochází pravidelně 7 pacientů postižených sklerotizující kožní formou GVHD, plicním postižením nebo kombinací obou zmíněných projevů. U všech pacientů došlo k postupnému prodloužení intervalu výkonů, k celkovému zlepšení klinického stavu, došlo ke snížení dávek kortikoidů nebo jejich vysazení a zlepšila se kvalita jejich života.

Závěr: ECP je velice účinná a efektivní metoda při léčbě GVHD. Je dobře tolerována pacienty s minimem nežádoucích reakcí (v souvislosti se separací- hypokalcémie), reakce při podání buněk nebyla žádná. U většiny pacientů je možná ambulantní léčba. Úspěšná léčba ECP vede ke zlepšení kvality života nemocných.

30.

Granulocytaferéza na Transfuzním oddělení Fakultní nemocnice Olomouc*Stratilová I., Chmelová S., Hlávková E., Zemanová M., Galuszková D. (Transfúzní oddělení, FN, Olomouc)*

Úvod: Prezentace představuje naše zkušenosti z novým typem odběru- granulocyty z aferézy. Tato metoda byla nově zavedena na TO FN Olomouc v roce 2016. Granulocytaferéza je separační výkon, při kterém odebíráme z krevního oběhu dárce danou složku krve- granulocyty, a zbývající složky jsou navraceny zpět do krevního oběhu dárce. Výsledným produktem je koncentrát bílých krvinek resuspendovaných v plazmě. Hlavní úlohou granulocytů je likvidace cizorodého materiálu, což je umožněno jejich schopností migrace k místu infekce, schopností fagocytózy a schopností ničit fagocytované bakterie.

Cíl: Cílem zavedení odběru GA bylo rozšířit nabídku TO FN Olomouc o nový přípravek, který jsme dříve museli objednávat na jiném TO. Provádí se na žádost klinického pracoviště v případě těžké neutropenie u pacientů, kteří mají projevy infekce, a u kterých není dostatečná odezva na léčbu ATB. Metodika Odběr je prováděn na krevním separátoru Spectra Optia v režimu PMN. Je použit odběrový set REF 10300, jako HES 500ml 10% Voluven, jako antikoagulant 38ml 46,7% Natrii Citras. Důležitou roli hraje příprava dárce. Po zhodnocení způsobilosti dárce k odběru a provedení všech povinných předodběrových vyšetření s negativním výsledkem provádíme i.v. stimulaci kortikoidy. Následně dojde u dárce k vyplavení leukocytů z kostní dřeně do periferní krve. Za 4 hodiny od ukončení stimulace zahajujeme samotnou separaci. V polovině sběru provádíme kontrolní vzorek produktu na zjištění výtěžnosti obsahu, podle výsledku je v případě potřeby možné přenastavit úroveň sběru. Odběr trvá přibližně 100min., během něj dojde ke zpracování minimálně 6000ml plné krve. Objem výsledného produktu nepřesahuje 430ml. Po ozáření 25Gy je ihned transportován na klinické pracoviště k podání.

Závěr: Po zkušebních odběrech byly tyto separace zavedeny do rutinního provozu. Odběr je pro dárce zcela bezpečný. V průběhu separací jsme nezaznamenali žádné komplikace. K březnu 2017 jsme provedli celkem 22 procedur. Tato metoda rozšířila spektrum produktů, které nabízí naše pracoviště klinickým oddělením s cílem účelné hemoterapie.

LYMFOMY

31.

Outcome of elderly DLBCL patients treated with anthracycline based chemotherapy: dose reduction is not necessary for everybody*Trněný M., Janíková A., Sýkorová A., Procházka V., Mocíková H., Klener P., Šálek D., Belada D., Benešová K., Pytlík R., Blahovcová P., Boudová L., Campř V. (I interní klinika, Všeobecná fakultní nemocnice, Praha; University Hospital, Brno; University Hospital, Hradec Králové; University Hospital, Olomouc; University Hospital Kralovske Vinohrady, Praha; Charles University General Hospital, Praha; CLSG Data Center, Praha; University Hospital Motol, Praha)*

Background: Management of elderly patients (above ≥ 80 y) is difficult and only limited number of patients could be treated by curative approach with anthracycline based chemotherapy. Dose reduction of particular drugs is used very often and it varies based on pt's characteristics and center preferences. There is however lack of randomized or at least non-randomized historical comparisons. Aims: The objective of this study is to analyze elderly DLBCL patients prospectively registered in NiHiL Lymphoma Project and treated anthracycline based regimen in real world outside of clinical trials. Methods: Patients (pts.) with informed consent are prospectively followed in multicenter Lymphoma Project since 1999. Diagnostic, therapeutic and follow up data are prospectively collected. There were 399 DLBCL pts older than 80year diagnosed in period 1999-2014 identified. Among 372 pts. with pathology review and essential data there were 112 pts. (30.1%) treated with RCHOPlike chemotherapy. Analysis of clinical prognostic factors, therapy and toxicity was performed. Pearson, Kaplan-Maier and log rank tests were used.

Results: Median age was 81 years (80-88), 51.8% of men. Proportion of pts ≥ 85 was 14.3 %, with PS ≥ 2 (ECOG) 34.0%, with higher LDH 64.3%, with high or intermediate high IPI 49.1%, with bulky disease (≥ 10 cm) 17.0%, with lower albumin 27.7%, with Charlson Comorbidity Score (CCS) ≥ 4 25%. According to treatment choice of physician (intent to treat), pts. could be divided into 3 groups R-CHOP (CH) (cyclophosphamide –CF 750 mg/m², adriamycin – A - 50 mg/m²) or R-MiniCHOP (miniCH) (CF 400 mg/ m², A 25 mg/ m², Peyrade 2011) or modified R-CHOP (modiCH) (CF 750 mg/m² and A 25 mg/m² or any other dose between CHOP and miniCHOP). There were 21 pts (18.8%) treated with CH, 38 (33.9%) with miniCH and 53 (47.3%) with modiCH. There were no significant differences between the subgroups, except higher proportion of bulk in modiCH vs miniCH and CH (35% vs 12.9% vs 7.7% resp.; p 0.04) and cardiac comorbidity (60.5% vs 33.3% vs 30.2% resp.; p 0.02). Six and more cycles were administered in 71.4%, 63.1% and 58.5% pts. in CH, miniCH and modiCH resp. Following proportion of pts. received $>80\%$ ($>50\%$) of original CHOP dose. For cyclophosphamide it was 66.7% (81%), 0% (50%) and 62.2% (79.2%) resp. and for A it was 57.1% (76.1%), 2.6% (15.8%) and 13.2% (49%) resp. for CH, miniCH and modiCH resp.. There were observed 11 treatment related deaths (6 cardiac toxicity and 4 infection), 5 in miniCH and 6 in modiCH groups. The overall response rate was 76.8% with 59.8% CR/CRu. Median PFS and OS were 2.8y and 3.5y resp., with median follow up of 3.3y. There were found high beta2microglobulin (HR 2.2, p 0.05), low albumin (HR 1.9, p 0.05) and PS (p 0.05) as the only factors correlated with OS as well as PFS. Pts who achieved CR or PR have significantly better OS median (as well as PFS) compared to stable or progressive disease with 4.6 vs 3.5 vs 0.8 vs 0.5 y. There was numerically (not significantly) better OS median for R-CHOP (4.6y) vs R-miniCHOP (3.2y) and R-modiCHOP (2.9y).

Summary/Conclusion: Only one third of elderly DLBCL pts (≥ 80 y) is treated with anthracycline based regimen. Performance status, albumin and beta2microglobulin levels were significantly associated with prognosis. In minority of these pts full dose of RCHOP could be safely used and there is trend to better overall survival.

Supported by AZV 16-31092A

32.

Význam udržovací léčby rituximabem u starších pacientů s folikulárním lymfomem*Belada D., Janíková A., Procházka V., Papajík T., Pytlík R., Mocíková H., Ďuraš J., Pirnos J., Brejcha M., Sýkorová A., Starostka D., Baršová L., Trněný M. (IV. interní hematologická klinika, FN a LF UK, Hradec Králové; FN, Brno; Hamatologická klinika, FN, Olomouc; I.interní klinika, VFN, Praha; FN KV, Praha; FN, Ostrava; Nemocnice, České Budějovice; Nemocnice, Nový Jičín; Nemocnice, Haviřov; Nemocnice, Liberec)*

Folikulární lymfom (FL) je druhým nejčastějším typem lymfomů a navzdory nejnovějším pokrokům v jeho léčbě je považováno pokročilé stádium onemocnění za dosud nevyléčitelné. FL většinou dobře odpovídá na léčbu první linie, nicméně později dochází k opakovaným relapsům s progresivním zkracováním intervalu bez projevů nemoci (DFS). U většiny nemocných se stal standardem v 1. linii rituximab (chimerická monoklonální protilátka namířená proti antigenu CD20 na povrchu B lymfocytů) v kombinaci s chemoterapií – nejčastěji CHOP, event. bendamustine. Význam rituximabu v udržovací léčbě byl prokázán u nemocných s relapsem FL, a to i po podání kombinace rituximabu s chemoterapií jako indukční terapie (EORTC studie), stejně tak i v rámci léčby 1.linie (studie PRIMA). V obou studiích bylo prokázáno prodloužení PFS, nikoliv ale celkového přežití. Cílem analýzy z dat registru Kooperativní lymfomové skupiny bylo analyzovat význam udržovací léčby rituximabem u podskupiny pacientů s FL > 65 let věku. Celkem bylo do analýzy zařazeno 545 pacientů s mediánem věku v době diagnózy 72 let (65-93 let), které jsme rozdělili na podskupiny A: 65-70 let (n=220), B: 71-79 let (n=267) a C: 80 let a starší (n=58). Léčebná odpověď na terapii 1. linie – tedy dosažení kompletní nebo parciální remise (což bylo podmínkou zahájení udržovací léčby rituximabem) – dosáhlo v podskupině A celkem 182/220 (83%) resp. u skupiny B celkem 209/267 (78%) resp. u skupiny C dohromady 29/58 (50%) pacientů. Udržovací terapie (UT) byla zahájena v rámci podskupin u 35% (A), u 26% (B) resp. u 12% (C). Nutno poznamenat, že podíl pacientů se zahájenou UT je relativně nízký proto, že tato terapie byla zavedena do běžné praxe teprve cca před 5-6 lety. V rámci celého souboru byl zjištěn význam UT rituximabem oproti observaci stran PFS (medián 6,27 roků u UT vs. 4,37 u observace – p=0,01), ale i v rámci OS (medián u UT nedosažen vs. 8,55 let u observace – p=0,0128). V rámci dalších subanalýz podskupin A, B a C byl shledán statisticky nejvýraznější význam UT v rámci věkové podskupiny 71-79 let - medián PFS u UT nedosažen vs. 4,18 roků u sledování – p=0,0073. Medián OS u UT také nedosažen vs. 7,33 roků u observace, p=0,0267). Závěr: Analýzou dat z registru KLS byl zjištěn klinicky významný benefit z udržovací terapie rituximabem u nemocných s folikulárním lymfomem ve starší věkové skupině > 65 let, a to jak z hlediska prodloužení PFS, tak i z hlediska OS. I u této věkové skupiny tak má tato relativně nákladná terapie svůj nespochybnitelný význam.

33.

Burkittův lymfom - multicentrická retrospektivní analýza z registru Kooperativní lymfomové skupiny – výsledky léčby starších nemocných ve srovnání s mladšími nemocnými

Sýkorová A., Pytlík R., Móciková H., Janíková A., Procházka V., Belada D., Šálek D., Benešová K., Klener J. P., Duraš J., Smolek J., Šimkovič M., Campr V., Vosáhlová V., Blahovcová P., Trněný M. (IV. interní hematologická klinika LF UK a FN Hradec Králové, I. interní klinika 1. LF UK a VFN v Praze, Interní hematologická klinika 3. LF UK a FN Královské Vinohrady, Praha 4, Interní hematologická a onkologická klinika LF MU a FN Brno, Hematoonkologická klinika LF UP a FN Olomouc, Klinika hematoonkologie, FN Ostrava, Ústav patologie a molekulární medicíny, 2. LF UK a FN v Motole, Praha, Datacentrum Kooperativní lymfomové skupiny, I. interní klinika 1. LF UK a VFN v Praze)

Úvod: Burkittův lymfom (BL) se řadí k vzácným podjednotkám ne – Hodgkinových lymfomů (NHL) s agresivním chováním. Představuje < 1 % všech NHL. Na molekulárně biologické úrovni je lymfom charakterizován translokací a deregulací c-MYC onkogenu na chromosomu 8. V léčbě se používá chemoterapeutický režim CODOX-M/IVAC (cyklofosfamid, doxorubicin, vinkristin, methotrexát, ifosfamid, cytosin arabinosid, a etoposid) - Magrath et al. - a je založen na stratifikaci pacientů do 2 skupin (s nízkým/vysokým rizikem). Pacienti s nízkým rizikem jsou nemocní s kompletně resekovanou abdominální masou nebo s 1 extraabdominální lokalizací tumour, s normální hodnotou LDH a jsou léčeni režimem CODOX-M. Součástí terapie je intrathekální aplikace. Starší nemocní bývají léčeni obvykle méně intenzivními nekurabilními režimy, proto je jejich prognóza horší.

Cíl: Porovnání klinických charakteristik a analýza léčebných výsledků nemocných s BL podle věku (< 60 let vs. > 60 let) z prospektivně vedené databáze Kooperativní lymfomové skupiny (KLS) nově diagnostikovaných pacientů s NHL.

Nemocní a metody: Zastoupení BL v databázi KLS je 0,84 % (118/14 047 pacientů/p). Analyzovali jsme 101 pacientů se sporadickým subtypem BL diagnostikovaným od února 1999 do ledna 2016. Pacienti s BL spojeným s imunodeficitem a pacienti, kteří měli pouze postižení kostní dřeně, jsme z analýzy vyloučili. Charakteristiku pacientů ukazuje tabulka 1. Low risk BL jsme zaznamenali u 10% p. Samostatnou chemoterapii (CHT) bylo léčeno 18 % p, rituximabem+CHT 82 % pacientů - 64 (81%) mladších a 16 (73%) starších p. Intenzivní CHT režim byl použit u 82 (84 %) p – v 91 % u mladších p

a v 53% u starších pacientů. Z intenzivních režimů byly u mladších nemocných použity režimy CO-DOX-M (17p), CODOX-M/IVAC (51p) a jiné (14p). U starších pacientů byl použit režim CODOX-M/IVAC (3p), CODOX-M (1p), GMALL (2p), hyperCVAD (3p), HD-MTX/ARAC (1p). Mezi neintenzivní režimy jsme zařadili COP, CHOP a CHOP/HDMTX (16p). Kurativní chirurgický zákrok podstoupilo 9 % p. Radioterapie byla použita kdykoliv během léčby u 11 % p.

Výsledky: Medián sledování souboru byl 4,2 roky. Statisticky významně se skupiny dle věku lišily v podání intenzivní terapie (p=0,0006). Léčebnou odpověď po indukční léčbě dosáhlo 79 % pacientů (CR 74 %, PR 5 %, SD 1% a PD 13 % p). Tři pacienti s PD podstoupili transplantaci (SCT) (1p alloSCT, 2p autoSCT). Medián PFS, resp. OS nebyl u pacientů < 60 let dosažen, u pacientů > 60 let byl medián PFS 0,62 roku (p=0,003) s mediánem OS 1,17 roku (p=0,001). 5leté přežití bylo u pacientů < 60 let 77 % a u p > 60 let 40 %. Zemřelo celkem 33 nemocných: 19 na progresi choroby, 9 na toxicitu léčby, 1 na duplicitu, 1 na jinou příčinu a u 3 nemocných není příčina úmrtí známá. Věk > 60 let (p=0,0001), PS ECOG > 1 (p<0,0001), Ann Arbor stadium IV (p=0,003), LDH > norma (p=0,026), přítomnost extranodálního postižení (p=0,02), CNS postižení (p=0,0002), postižení kostní dřeně (p=0,0008), IPI skóre 3-5 (p=0,0004), nedosažení CR (p<0,0003) a intenzivní chemoterapie (p=0,012) měly dle univariátní analýzy statisticky významný vliv na OS, všechny uvedené faktory a navíc "bulk" > 5cm (p=0,03) i vliv na PFS. V multivariátní analýze byly významnými nezávislými faktory pro kratší PFS nedosažení CR, extranodální postižení, Ann Arbor stadium IV, pro kratší OS pak postižení CNS a nedosažení CR (tabulka 2). **Závěr:** Burkittův lymfom patří mezi vyléčitelné lymfomy u mladších nemocných, u starších pacientů je ale prognóza neuspokojivá, neboť jen část nemocných toleruje intenzivní kurabilní léčbu. Pro relativně vzácný výskyt tohoto lymfomu je třeba prospektivních klinických studií k určení optimální léčby především pro R/R nemocné a nemocné starší 60 let.

Tabulka 1

Faktor	Všichni pacienti (n=101)	Pacienti ≤ 60 let (n=79)	Pacienti > 60 let (n=22)	Statistická významnost (p – hodnota)
Medián věku, roky	45 (18-84)			
Mužské pohlaví	75/101 (74 %)	58/79 (73 %)	17/22 (77 %)	p=0,95
KS IV	65/99 (66 %)	51/79 (64 %)	14/20 (70 %)	p=0,86
B symptomy	54/101 (53 %)	43/79 (54 %)	11/22 (50 %)	p=0,90
LDH > norma	69/99 (70 %)	54/79 (68 %)	15/20 (75 %)	p=0,78
PS ECOG > 1	41/101 (41 %)	28/79 (35 %)	13/22 (59 %)	p=0,081
Bulk ≥ 5cm	57/90 (63 %)	44/72 (61 %)	13/18 (72 %)	p=0,56
IPI 3-5	52/97 (54 %)	38/79 (48 %)	14/19 (73 %)	p=0,077
EN postižení	85/101 (84 %)	64/79 (81 %)	21/22 (96 %)	p=0,18
CNS postižení	16/100 (16 %)	11/79 (14 %)	5/20 (25 %)	p=0,38
Postižení KD	34/96 (35 %)	28/76 (37 %)	6/20 (30 %)	p=0,77
Intenzivní CHT	82/98 (84 %)	72/79 (91 %)	10/19 (53 %)	p=0,0006
Podání rituximabu	81/101 (80 %)	64/79 (81 %)	17/22 (77 %)	p=0,90
Léčebná odpověď	79/100 (79 %)	65/79 (82 %)	14/21 (66 %)	p=0,21
Dosažení CR	74/100 (74 %)	62/79 (78 %)	12/21 (57 %)	p=0,09

Tabulka 2 Multivariátní analýza pro OS a PFS

Multivariátní analýza pro celkové přežití (OS)			
Faktor	Odhadovaný HR	95% CI	Statistická významnost (p – hodnota)
Nedosažení CR	19,21	6,56-56,27	p<0,0001
Postižení CNS	5,76	1,61-20,58	p=0,0073
Multivariátní analýza pro dobu do progresie (PFS)			
Faktor	Odhadovaný HR	95% CI	Statistická významnost (p – hodnota)
Nedosažení CR	98,74	18,22 - 535,07	p<0,0001
EN postižení	0,036	0,0027 - 0,51	p=0,014
Stadium IV	0,14	0,027 - 0,76	p=0,023

Retrospektivní analýza fertility žen po léčbě pokročilého Hodgkinova lymfomu chemoterapií BEACOPP eskal (1995 – 2017)

Marková J., Mociková H., Gaherová L., Jančárková T., Klásková K., Vernerová Z., Dědečková K., Kozák T. (Interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, Praha; Ústav patologie FN Královské Vinohrady a 3. LF UK, Praha; Protonové centrum Praha a Ústav radiační onkologie Nemocnice Na Bulovce a 1. LF UK, Praha)

Úvod: Poruchy funkce gonád po chemoterapii BEACOPP eskalovaný (escal) jsou známou toxicitou po úspěšné léčbě Hodgkinova lymfomu (HL). Pacienti a metody. Analyzovali jsme fertilitu 98 pacientek (pts) s pokročilým stádiem HL, které byly léčené chemoterapií BEACOPP eskal v letech 1995 – 2015. Věk žen v době diagnózy byl 18 – 34 let (medián 27 let). 57 pts (58%) dostalo osm cyklů, 39 pts (40%) šest cyklů a dvě (2%) pts čtyři cykly. Následná radioterapie reziduálního tumoru 30 Gy byla indikovaná u 33 pts (32%). Čtyřiceti devíti pts (48%) byla poskytnuta farmakologická ochrana gonád (GnRH agonista – Goserelin acetát, pozn. Dipherelin 3 mg i. m. 1 x za 4 týdny). Medián sledování pts od konce léčby je 161 měsíců (r 23 - 216). Výsledky. 28 žen porodilo 36 dětí, 8 (28%) z nich 2 děti. Medián věku v době diagnózy byl 26 let (r 19 – 32). Jen jedno dítě mělo izolovaný malý rozštěp rtu, ostatní jsou zdravé. Medián porodní váhy: 3480 g (r 2850 – 5400 g). Dvě ženy podstoupily IVF po ovariální stimulaci, ostatní gravidity byly spontánní. 2 gravidity byly ve 20 a 22 týdnu přerušeny (kongenitální malformace: velký rozštěp rtu a patra a monosomie 45,X0 Turnerův syndrom). Medián doby od konce léčby do narození prvního dítěte je 78 měsíců (r 16 – 143). Jedna žena porodila první dítě (IVF, darovaný oocyt) a za 14 měsíců porodila druhé dítě, spontánně počaté (11 let po terapii). Další žena spontánně otěhotněla během hormonální substituční léčby pro předčasné ovariální selhání. S infertilitou koreluje hladina FSH. V posledních sedmi letech jsme v pravidelných intervalech vyšetřovali antimüllerální hormon (AMH). Překvapivě porodily i ženy s velmi nízkými hodnotami a u jiných se hodnota AMH postupně normalizovala. 15 žen (53 %) porodilo v období 2014 – 2017. Větší počet spontánních gravidit v posledních 3 letech pravděpodobně souvisí s redukcí intenzity chemoterapie (z 8 na 6 cyklů) a nelze vyloučit i význam soustavně prováděné farmakologické ochrany gonád. Vzhledem k relativně malému počtu pacientů a krátké době sledování nelze z našeho souboru získat validní statistické výsledky.

Závěr: GnRH by měla být mladým ženám nabídnuta (i přes nepřesvědčivé výsledky studií u pokročilých stádií). Cílem výzkumu velkých onkologických center je dále snižovat intenzitu léčby při zachování kontroly tumoru. Předpokládáme, že zavádění nových strategií léčby gonadální toxicitu významně sníží. Česká skupina Hodgkinova lymfomu. Podpořeno Grantem AZV 16 – 29857A, MZ ČR a Výzkumným projektem P 27/2012, 3. LF UK Praha.

Hodgkinův lymfom seniorského věku

Mociková H., Sýkorová A., Marková J., Gaherová L., Lukášová M., Procházka V., Martínková L., Belada D., Štěpánková P., Král Z. (Interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, Praha; IV. Interní hematologická klinika FN, Hradec Králové; Hemato-onkologická klinika FN, Olomouc; Klinika hematoonkologie FN, Ostrava; Interní hematoonkologická klinika FN, Brno)

Starší pacienti (pac) ve věku nad 60 let představují 10 %-20 % ze všech případů Hodgkinova lymfomu (HL) s vyšším výskytem podtypu se smíšenou buněčností a jejich prognóza je výrazně horší oproti mladším pac. Starší pac. jsou častěji diagnostikováni v pokročilém stadiu s B symptomy, častěji se vyskytuje agresivnější nemoc a pozitivita Epstein-Barrova viru. Prognózu ovlivňuje celkový zdravotní stav, další přidružená onemocnění a nízká tolerance intenzivnější chemoterapie. V důsledku komorbidit a toxicity je v průběhu chemoterapie nutné dávky dále redukovat. V českém registru HL bylo v letech 2000 až 2016 zaregistrováno 151 pac. s klasickým HL ve věku nad ≥60 let (11 % z celkového počtu HL). Medián věku byl 67 (60-83) let, podtyp se smíšenou buněčností byl zjištěn u 55 % pac. a pokročilé stadium u 60,9 % pac. Samostatná chemoterapie (CHT) byla použita u 66,2 % pac., kombinace CHT s radioterapií (RT) u 26,7 % pac. Antracyklinový režim byl použit u 79,4 % (86 pac.). Samostatná RT byla použita u 4 % pac. 3 pac. dostali pouze podpůrnou léčbu a u 3 pac. léčba nebyla v registru uvedena. Celková odpověď po 1. linii léčby byla dosažena u 70,9 % (kompletní remise u 57,6 %), stabilní nemoc u 0,7 %, primární progresse u 7,3 % a u 21,2% pac.

odpověď nebyla hodnotitelná. Z pac., kteří odpověděli na 1. linii léčby se relapsy vyskytly u 12,6 % (19 pac.). Medián přežití bez relapsu/progrese (PFS) byl 7,9 let a medián celkového přežití (OS) 10,2 let. 2leté PFS bylo 73,1 % (95 % IS 64,9 - 81,3) a 2leté OS bylo 82,2 % (95 % IS 75,0 - 89,3). Žije celkem 53,6 % a 31,8 % (48 pac.) zemřelo: 11 na progresi HL, 14 na toxicitu léčby, 13 v důsledku jiných příčin a u 10 pac. je příčina úmrtí neznámá.

Závěr: Přežití pac. registrovaných v českém registru HL je srovnatelné s literárními údaji v této skupině starších pac. Dlouhodobé přežití bylo závislé na použití režimu s antracyklínem. V současnosti probíhají prospektivní klinické studie s použitím nových léků (brentuximab vedotin, nivolumab, pembrolizumab) a s cílem zvýšit účinnost a snížit toxicitu léčby v této skupině starších pacientů. Práce byla podpořena grantem AZV 16- 29857A, MZ ČR.

PODPŮRNÁ PÉČE U SENIORŮ

Alogenní transplantace po redukované přípravě u pacientů starších 60 let – 15 leté zkušenosti HOO FN Plzeň

Karas M., Steinerová K., Hrabětová M., Lysák D., Jindra P. (HOO FN, Plzeň)

Úvod: výskyt hematologických malignit narůstá s věkem a často se jedná o onemocnění prognosticky nepříznivé, dlouhodobě neovlivnitelné standardní léčbou. Alogenní transplantace krvetvorných buněk po redukované přípravě (RIT) může u části starších nemocných zlepšit tuto nepříznivou prognózu, nicméně s vyšším věkem pacienta narůstají i transplantáční rizika spojená s vyšší léčebnou mortalitou (NRM). V tomto sdělení shrnujeme naše zkušenosti s provedením RIT u nemocných starších 60 let na našem pracovišti v posledních 15 letech.

Pacienti a metody: od 1/2002 do 12/2016 153 pacientů s mediánem věku 63 let (rozmezí 60-74 let), z nichž 26% mělo HCT-Cl ≥ 3 a 9% WHO stav ≥ 3 , podstoupilo RIT. Základní onemocnění (AML 81x, CLL 40x, NHL 8x, MDS 7x, MPD 7x, ALL 5x, CML 4x, MM 1x) bylo obvykle rizikové a u 35% pacientů bylo pokročilé či chemorezistentní. Zdrojem krvetvorných buněk byla v 90% periferní krev a v 10% kostní dřev s mediánem podaných CD34+ buněk 5,45x10E6/kg (rozmezí 0,72-21,33x10E6/kg). V 46 (20%) případech se jednalo o shodného příbuzného, v 6 (4%) případech o haploidického příbuzného a v 102 (67%) případech o nepřibuzného dárce (z nichž 22% s HLA neshodou). Prevencí GVHD byla kombinace cyklosporinu A a methotrexátu. Další postupy, léčba komplikací, jejich hodnocení a hodnocení výsledků léčby probíhalo dle standardních kritérií.

Výsledky: u 142 (93%) pacientů došlo k přijetí štěpu. Z 142 hodnocených pacientů se akutní GVHD rozvinula u 97 (68%) pacientů a chronická GVHD u 63 (53%) z 120 hodnocených pacientů. S mediánem sledování žijících pacientů 50 měsíců (rozmezí 7-157 měsíců) žije 56 (37%) nemocných v CR základního onemocnění. U 33 (22%) pacientů došlo k progresi či relapsu onemocnění. Medián doby od RIT do relapsu byl 6 měsíců (rozmezí 2-49 měsíců). 64 (42%) pacientů zemřelo z důvodu NRM. NRM do dne +100 byla 12%, do roka po RIT 26%. Předpokládaný EFS a OS ve 3 letech je 39% a 43%, nicméně pro skupinu s nepokročilým základním onemocněním a HCT-Cl 0-1 (34% pacientů) byl EFS a OS ve 3 letech 58% a 61%.

Závěr: získané výsledky ukazují, že RIT může u nemalé části pacientů starších 60 let příznivě ovlivnit prognózu jejich rizikového onemocnění. Možný nepřívý vliv na NRM, incidenci relapsu a tím nižší celkovou efektivitu RIT u našeho souboru pacientů má fakt, že část (35%) nemocných podstoupila RIT předléčena a s pokročilým stavem onemocnění. Časnější indikace k RIT by pak mohla vést ke zlepšení výsledků transplantáční léčby starších pacientů.

Hematoonkologický nemocný v intenzivní péči

Karvunidis T. (JIP, I. interní klinika, FN Plzeň a Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova, Plzeň)

Spolu s rostoucí incidencí hematologických maligních onemocnění, rozšiřujícími se možnostmi léčby a zlepšením jejich přežívání je na jednotky intenzivní péče a/nebo anesteziologicko-resuscitační oddělení přijímáno stále více hematoonkologických nemocných a to často i pokročilého věku. Důvodem přijetí jsou (potenciálně) život ohrožující komplikace spojené přímo s vlastním základním

onemocněním a/nebo jeho terapií či komplikace případných komorbidit. Epidemiologie, indikace k přijetí do intenzivní péče, možnosti a rozsah léčby stejně jako prognóza akutního stavu a případná změna prognózy základního onemocnění v důsledku akutní komplikace zůstávají častými nezodpovězenými otázkami hematologů i intenzivistů.

38. Management sepse u pacientů v seniorském věku

Kula R. (Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny FN, Ostrava)

Edukační sdělení – abstrakt nedodán.

39. Paliativní péče a nemocný s hemato-onkologickým onemocněním v ČR

Polívka J., Švancara J. (Hospic Dobrého Pastýře, Čerčany; I. interní klinika 1. LF UK a VFN, Praha; Institut biostatistiky a analýz Masarykovy University, Brno)

Paliativní péče (PP) je v současné době považována za standardní součást komplexní péče o nemocné s onkologickým onemocněním, nemocné s hemato-onkologickým onemocněním (HOO) nevyjímaje. Časný přístup k PP a příp. souběžné poskytování je spojeno s lepší kvalitou života nemocného, lepší kontrolou symptomů, lepším přijetím a zvládním své nemoci, větší spokojeností nemocného a pečujících a také se snazším přechodem z nemoc ovlivňující léčby do péče v závěru života. HOO představují pátý nejčastější typ nádorového onemocnění, s roční incidencí 33 případů na 100 000 obyvatel v ČR (UZIS 2011). HOO představují podle klasifikace WHO 2016 více než sto různorodých onemocnění s rozdílnými léčebnými možnostmi, rozdílným průběhem a prognózou. Nemocní s HOO mají celosvětově oproti nemocným se solidními nádory nižší pravděpodobnost, že budou moci v průběhu života s onemocněním využít PP. Provedené studie již dostatečně popsalý současnou situaci „vztahu“ - nemocný s HOO a paliativní péče. Stejně tak byly definovány překážky integrace paliativní a hematologické péče. Situace v ČR není dosud známa. V přednášce budou uvedeny základní informace o PP, o specifických obtížích a potřebách nemocných s HOO. Budou představeny výsledky analýzy dat z Národního zdravotnického informačního systému, kde v ČR nemocní s HOO umírají.

PSYCHOLOGIE

40. Psychické reakce na nepříznivé zprávy v seniu

Kalvodová L. (Soukromá psychologická praxe, Brno)

Vycházíme z psychologie osobnosti, vývojové psychologie, duševní hygieny a sociální psychologie. Citace C.G.Jung, V.E.Frankl. Duševní životospráva ve stáří: J.Švancara a jeho 5P optimální adaptace: perspektiva, pružnost, prozíravost, porozumění, potěšení. Nepříznivé zprávy zdůrazňují v seniu pacientovu psychickou nedostatečnost, bilanci života, revokace dávných prožitků, ztrátu motivace žít. Seniorovy reakce v konaci, emoci, mentálním uzpůsobení. Senior touží především netrpět, být s blízkým, důstojně zemřít.

41. Humanistická psychoterapie a formy práce s onkologickými pacienty

Šporcrová I. (Ambulance klinické psychologie, Brno)

Na základě teoretických východisek přednáška ukazuje, jak lze pracovat s onkologicky nemocnými s uplatněním postupů humanistické psychoterapie - včetně konkrétních příkladů a odkazů na kazuistiky.

42. Možnosti psychoterapie v paliativní péči

Škrobánková A. (Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc)

Diagnóza maligního onemocnění je vždy výrazným zásahem do života člověka. Nemoc má velký dopad na jeho sebepojetí, na to, jak se vidí, chápe a hodnotí. Po počátečním šoku přichází do nemocnice s jedinou nadějí - že se uzdraví. Bohužel ne vždy se nemoc daří zvládnout, situace se nelepší a i s tímto je člověk nucen se vyrovnat. Psychická zátěž je velmi výrazná a to nejen pro něj samotného, ale také pro jeho blízké. Ti všichni potřebují vědět, že nejsou sami, že stále existuje možnost, jak pomoci. Nezastupitelné místo ve zdravotnickém týmu tak má, vedle lékařů a sester, stále častěji i psycholog. Základem jeho práce s nemocnými v paliativní péči, příp. terminálními, je psychoterapie, zejména podpůrná, ve které je důležité nemocnému, ale i jeho blízkým, poskytnout dostatek času a možností vyjádřit svá přání, obavy, starosti... Velmi důležité je ujištění, že je to pro nás důležité, že se tím budeme zabývat. Součástí sdělení budou také kazuistiky mapující práci s nemocným a jeho rodinou v terminální fázi onemocnění.

43. Paliativní péče v nemocničním prostředí

Lhotová P. (Nemocnice Na Pleši, Nová Ves pod Pleší)

Tématu paliativní péče je v posledních letech (oprávněně) věnováno stále více pozornosti. Hovoříme o důležitosti paliativní péče a jejím vlivu na kvalitu života i délku dožití pacientů se závažnými nemocmi, oborové specializaci paliativní péče, o různých formách a jejich dostupnosti, o její časné integraci. Zvláště v nemocnicích je ale často specializovaná paliativní péče novinkou, která je sice podporována, nicméně pro mnoho zařízení je výzvou najít model, který dobře sedne jejich stávající organizaci. Ve stejném čase pak dochází k prudkému rozvoji onkologické léčby, která má stále vyšší ambice na úplnou úpravu pacientů. A právě tu očekávají pacienti, když na odborná onkologická oddělení přichází. Paliativní péče je pak často v jejich očích (a i v očích odborníků) jakýmsi protikladem, který je spojen s neúspěchem nebo prohrou. Na našem oddělení věříme, že paliativní péče ve své nejširší podobě má adresovat biopsychosociální přístup a být nedílnou součástí péče o onkologické pacienty ve všech stádiích léčby. Snažíme se proto o její časnou integraci. Příspěvek mapuje náš proces implementace paliativního přístupu v léčbě onkologických pacientů a vypichuje klíčová témata, se kterými se během tohoto procesu setkáváme a cesty, které při vypořádávání se s nimi volíme.

KONFERENCE ZDRAVOTNÍCH LABORANTŮ

44. Mnohočetný myelom – co je vhodné vědět v praxi laboranta

Minařík J. (Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc)

Mnohočetný myelom je druhou nejčastější hematologickou malignitou. Liší se od ostatních nádorových onemocnění krvetvorby svými klinickými projevy, laboratorními nálezy i diagnostikou. Celkové projevy mnohočetného myelomu bývají obvykle nespecifické a mohou být spojovány s příznaky jiných interních onemocnění. Změny v krevním obraze i v biochemickém spektru lze pozorovat i u jiných stavů. Přesto je soubor příznaků společně s vybranými laboratorními změnami poměrně charakteristický a měl by vést k správné diagnóze. Náplní sdělení jsou základní informace o mnohočetném myelomu, o jeho projevech a diagnostických možnostech. Je poukázáno na odlišnosti od ostatních hematologických jednotek včetně správného vyšetřovacího algoritmu. Zmíněna jsou současná kritéria, umožňující léčbu u asymptomatických jedinců ještě před rozvojem orgánového postižení. V přehledu jsou zmíněny též léčebné přístupy s důrazem na aktuální možnosti léčby pomocí léků s biologickým mechanismem účinku.

45. Průtoková cytometrie v diagnostice mnohočetného myelomu

Kremlová H., Novák M. (Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc)

Diferenciální diagnostika mnohočetného myelomu pomocí průtokové cytometrie vychází z identifikace plazmatických buněk, definovaných kombinací znaků CD38+/CD138+. Pomocí markerů CD19 a CD56 odlišujeme fyziologické formy plazmocytů od patologických, což potvrďujeme vyšetřením

klonality lehkých řetězců imunoglobulinů. Za typický patologický imunofenotyp je považována kombinace CD38+/CD138+/CD19-/CD56+ s restrikcí lehkých řetězců. V naší laboratoři využíváme průtokový cytometr BD FACS Canto II, který díky osmibarevné technologii umožňuje na patologické populaci dále vizualizovat znaky CD45,CD28,CD33 a CD117, které umožňují prognostickou stratifikaci nemocných a doplňují imunofenotyp pro analýzu minimální reziduální nemoci. Výsledek stanovení minimální reziduální nemoci odráží hloubku léčebné odpovědi nemocných, zásadním způsobem ovlivňuje jejich další prognózu a je nezávislým faktorem délky přežití. Výhodou průtokové cytometrie je zejména rychlost laboratorní odezvy, vysoká senzitivita a specifita spolu s „přidanou hodnotou“ vyšetření, která spočívá v identifikaci rizikových pacientů a pacientů profitujících z dřívějšího zahájení léčby. Problematickou je pak obtížná standardizace vyšetření a zejména bias počtu plazmocytů mezi cytometrickým vyšetřením a výsledkem morfologického stanovení (mikroskopický diferenciální rozpočet leukocytů). Z důvodu ztráty části plazmatických buněk během přípravy vzorku pro průtokovou cytometrii není možné počet plazmocytů získaný těmito dvěma metodikami porovnávat. Podpořeno grantem IGA_LF_2017_007

46.

Cyto genetická analýza u nemocných s mnohočetným myelomem

Kropáčková J., Prekopová I., Hanzlíková J., Balcárková J., Mlynářčiková M., Holzerová M., Urbánková H., Minařík J., Papajík T. (Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc)

Mnohočetný myelom (MM) je třetí nejčastější hematologické onemocnění, které postihuje zejména pacienti starší 60 let. Jedná se nádorové onemocnění postihující terminální vývojová stádia B-lymfocyt-plazmatické buňky (myelomové buňky). Chromozomální abnormality u mnohočetného myelomu mají biologický a prognostický význam. V současnosti je MM podle nalezených cyto genetických změn rozdělován na hyperdiploidní a nonhyperdiploidní. Hyperdiploidní MM je spojen s trizomiemi lichých chromozomů, zejména chromozomů 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 a 21 a příznivější prognózou. Nonhyperdiploidní MM je prognosticky méně příznivý a je charakterizován translokacemi zahrnujícími IgH gen- např. t(11;14) a t(4;14). Delece RB1 genu/monozomie chromozomu 13 je popisována u obou skupin stejně tak další prognosticky nepříznivé cyto genetické změny jako delece genu TP53 (17p13), zmnóžení oblasti 1q21 nebo delece oblasti 1p32. Vyšetření pomocí klasické cyto genetické analýzy bývá málokdy úspěšné vzhledem k nízkému počtu myelomových buněk v kostní dřeni, jejich nízké mitotické aktivitě a mikroskopicky neohodnotitelné morfologii chromozomů v metafázích. Úspěšná klasická cyto genetická analýza karyotypu bývá spojena s agresivním průběhem nebo pokročilejším stádiem onemocnění a je pozorována u 30 - 40 % pacientů. Pro doplnění a přesnější určení nalezených změn v karyotypu je používána metoda mnohobarevné fluorescenční in situ hybridizace (M-FISH). Metoda fluorescenční in situ hybridizace (FISH) a její kombinace s imunofluorescenční detekcí lehkých řetězců monoklonálních imunoglobulinů v cytoplasmě myelomových buněk, kterou označujeme jako metodu FICTION, umožňuje cílenou detekci chromozomových změn v myelomových buňkách a identifikaci chromozomových abnormalit u většiny pacientů s MM. Cílem sdělení je ukázat na zajímavých případech pacientů s MM význam klasického cyto genetického vyšetření v kombinaci s molekulárně genetickými metodami FICTION a M-FISH. Práce je podporována grantem IGA_LF_2017_007

47.

Diagnostika Waldenströmovy makroglobulinemie z pohledu molekulárně-biologické laboratoře

Orviská M., Křupková L., Divoká M., Lapčíková A., Píka T., Minařík J., Papajík T. (Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc)

Waldenströmová makroglobulinémie (WM) je vzácná hematologická malignita definována jako lymfoplazmocytární lymfom s infiltrací kostní dřene a přítomností monoklonálního imunoglobulinu IgM v séru (paraprotein). Paraprotein zvyšuje viskozitu krve a může vést až k syndromu hyperviskozity. V nátěru periferní krve je charakteristickým nálezem nápadné rouleaux (penízkovatení erytrocytů). Pozorujeme i atypické lymfocyty a lymfoplazmocytoidní elementy. U více než 90 % pacientů s WM je přítomna aktivující mutace L265P v genu MYD88, jejíž detekce napomáhá odlišení WM od jiných příbuzných malignit (např. mnohočetného myelomu). Přibližně u třetiny pacientů pozitivních na mutaci v genu MYD88 je současně přítomna i mutace v genu CXCR4, která ovlivňuje klinické projevy onemocnění a usnadňuje prognostickou stratifikaci nemocných. Cílem našeho sdělení je přiblížit úlohu molekulárně-biologické laboratoře v diagnostice a prognostické stratifikaci pacientů s WM. DNA byla izolována

z mononukleárních buněk kostní dřene standardními technikami. Mutace v genu MYD88 byla detekována pomocí alelově specifické PCR; mutace v genu CXCR4 pomocí Sangerova přímého sekvenování. Všechny nalezené mutace byly potvrzeny pomocí restrikčního štěpení. V roce 2014 jsme v naší laboratoři zavedli molekulárně genetické vyšetření mutace MYD88 a CXCR4. Celkem jsme vyšetřili 38 pacientů s podezřením na WM. U 24 pacientů byla potvrzena mutace MYD88 a 5 z nich neslo současně i mutaci CXCR4. Tito pacienti měli agresivnější průběh choroby (vyšší IPSS, pancytopenie, vyšší hladina paraproteinu a volných lehkých řetězců v séru, vyšší infiltrace kostní dřene) a současně u nich byla pozorována horší léčebná odpověď. Analýza mutací v genech MYD88 a CXCR4 pomocí molekulárně-genetických technik je nepostradatelnou součástí diagnostiky a prognostické stratifikace pacientů. Přítomnost a typ mutací v genech MYD88 a CXCR4 mají vliv na klinické projevy a prognózu WM a vyšetření mutačního stavu těchto genů by mohla napomáhat při výběru optimální léčebné strategie. Tato práce byla podpořena grantem IGA-LF-2017-007.

CHRONICKÁ LYMFOCYTÁRNÍ LEUKEMIE

48.

Nežádoucí účinky inhibitorů B buněčného receptoru, komplikace léčby CLL

Urbanová R., Turcsányi P., Papajík T. (Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc)

Farmakologická inhibice aktivity B buněčného receptoru (BCR) v nádorových buňkách chronické lymfocytární leukémie (CLL) hraje klíčovou roli v léčbě vysoce rizikových, relabujících a refrakterních onemocnění (R/R), nemocí s del(17p) a mutací TP53, které jsou rezistentní vůči imunochemoterapii. Inhibice BCR je možná přes Brutonovu tyrosinkinázu (BTK), kde v klinické praxi prvním dostupným a vysoce účinným lékem je ibrutinib a dále přes cytoplazmatickou tyrosinkinázu PI3K, jejímž inhibitorem je idelalisib. Přežití nemocných s R/R CLL bylo do příchodu inhibitorů BCR krátké. Idelalisib v kombinaci s rituximabem a ibrutinibem prokázaly prodloužení doby do progresu onemocnění a celkového přežití u R/R CLL. Terapie je nemocnými dobře tolerována. Přesto se objevují některé závažné nežádoucí účinky stupně 3 a 4. Medián věku při diagnóze CLL je kolem 71 let, k terapii inhibitory BCR se dostávají starší nemocní, u kterých s narůstající komorbiditou a polypragmazií významně stoupá riziko komplikací a lékových interakcí. Některé časté nežádoucí účinky ibrutinibu jsou zvládnutelné, léčebně dobře ovlivnitelné, např. trombocytopenie, neutropenie, anémie, průjem, respirační infekce, bolesti kloubů a svalů, periferní otoky, stomatitida. Ibrutinib vede k poruše agregace trombocytů s následným rizikem krvácení. V případě, že nemocný již v době zahájení léčby užívá antikoagulační terapii, je preferován alternativní inhibitor (idelalisib). Je doporučeno preventivní laboratorní testování směřující k vytipování rizikových nemocných (vyšetřování agregace trombocytů, hladiny vWF a FVIII). Nutné je vysazení terapie ibrutinibem před a po chirurgickém zákroku a před všemi invazivními výkony. Je popisován zvýšený výskyt fibrilace síní (FiS), s trváním terapie ibrutinibem a věkem nad 65 let riziko výskytu narůstá. V této souvislosti je důležitou otázkou indikace antikoagulační terapie. V praxi se používá CHA2DS2 VASC skóre ke stanovení rizika trombembolie při FiS, pomocí něhož lze identifikovat níže rizikové nemocné, kteří k antikoagulační terapii indikováni nejsou a dále jsou v literatuře diskutovány přednosti a nevýhody užití warfarinu a nových orálních antikoagulantů. Optimální je spolupráce s kardiologem také stan antiarytmické terapie, zejména ve vztahu k možným lékovým interakcím. Ibrutinib zvyšuje riziko výskytu hypertenze, důsledná kompenzace krevního tlaku by měla minimalizovat riziko komplikující fibrilace síní. Ibrutinib a idelalisib jsou metabolizovány pomocí cytochromu P450, izoformy CYP3A. Inhibitory CYP3A zvyšují toxicitu terapie. Vzhledem k četnosti lékových interakcí na úrovni CYP3A4 je zřejmé, že je třeba zvažovat konkomitantní medikaci. Hlavním nežádoucím účinkem idelalisibu jsou neutropenie, trombocytopenie, průjem, kolitida, hepatopatie. Průjmy vzniklé po více než půl roce od zahájení léčby mohou být způsobeny lymfocytární kolitidou s nutností vysazení léčby a zahájení terapie kortikoidy. Pneumonie byly většinou infekčního původu včetně infekce Pneumocystis jiroveci a infekce Cytomegalovirem (CMV), což vedlo k doporučení profylaktické léčby cotrimoxazolem a k testování PCR CMV při léčbě idelalisibem. Závažné byly pneumonitidy imunitní etiologie vyžadující vysazení idelalisibu a terapii kortikoidy. Terapii inhibitory BCR (ibrutinibem nebo idelalisibem) je třeba ukončit pouze v případě závažné lékové toxicity, protože prognóza nemocných po vysazení této terapie je pro časný relapsy nemoci velmi nepříznivá, stejně tak není pro pravděpodobnost relapsu doporučováno neopodstatněné přerušování léčby. Pokud je vysazení inhibitoru pro toxicitu nezbytné, nemocní mohou být převedeni na terapii druhým z inhibitorů.

Aktuální postavení alogenní transplantace v léčbě chronické lymfocytární leukémie*Lysák D. (HOO FN, Plzeň)*

Alogenní transplantace krvetvorných kmenových buněk (aloTx) představuje důležitou a stále jedinou kurativní léčebnou modalitu pro nemocné s vysoce rizikovou chronickou lymfocytární leukémií (HR-CLL). S dostupností cílené terapie se role transplantace znovu definuje a její indikace se posouvá do pozdějších stádií relabujícího či refrakterního onemocnění. Konsensuální EBMT doporučení z roku 2007 nabízela transplantaci relabujícím pacientům s HR-CLL definovanou časným relapsem po chemoimunoterapii s purinovými analogy nebo přítomností nepříznivé cytogenetiky s del17p či TP53 mutací. Nové BCR inhibitory prokázaly významnou efektivitu u CLL a to i u vysoce rizikového onemocnění, kde nabízejí až 80 % ORR a 19 % PFS v 5-ti letech (ibrutinib). Léky typu BCRi/BCL2a by měly být proto zvažovány u všech pacientů s vysoce rizikovou CLL. Nové molekuly jsou efektivní, dobře tolerované a fungují i u nepříznivých genetických subtypů. Na druhou stranu nevedou k vyléčení CLL, po jejich vysazení může nastat rychlý relaps, případně se může rozvíjet resistance. AloTx nabízí dlouhodobou kontrolu a vyléčení onemocnění u cca 50 % pacientů (včetně del17p) a případný relaps onemocnění po transplantaci je léčitelný. Díky GvL efektu je možná kompletní eradikace onemocnění. Proceduru lze ovšem nabídnout pouze části pacientů, protože je zatížena mortalitou a omezením QoL. Aktuálně není alogenní transplantace v rámci konsolidace nebo při relapsu po první linii léčby HR-CLL indikována, čemuž odpovídá snižující se počet transplantací pro CLL – z 407 v roce 2010 na 255 v roce 2015 (EBMT). Své místo má aloTx u nemocných se selháním po dvou liniích terapie a při odpovědi na BCRi; u nemocných relabujících po BCRi, kteří mají odpověď na venetoclax; ale také v případech nedostatečné odpovědi na venetoclax. Pacienti s Richterovou transformací mohou být indikováni při odpovědi na antracyklinový režim. Naopak refrakterita či časný relaps po purinových analogích nejsou bezprostřední indikací pro aloTx. Transplantace se u pacientů odpovídajících na nové molekuly bude stále zvažovat na základě rizikosti onemocnění a transplantace. Otázkou zůstává vhodné načasování aloTx, která by neměla přicházet po vyčerpání všech možností, ale měla by právě vycházet z individuálního zvažení historie a rizika CLL a transplantčního rizika v době, kdy existuje nad onemocnění kontrola. Pacienti, kteří v době aloTx reagují na terapii ibrutinibem, mají nižší riziko relapsu po transplantaci. Časněji může být aloTx také zvažována při souběhu del17p a komplex. karyotypu. Pro provedení transplantace je doporučována redukovaná příprava, po které lze očekávat cca 50 - 60 % pravděpodobnost dlouhodobého přežití s nerelapsovou mortalitou kolem 20 - 30 % (v 5-letech) a GVHD jako nejčastější příčinou úmrtí. Jako zdroj krvetvorných buněk jsou preferovány PBSC, nelze ale odmítnout ani BM, která nabízí méně komplikací vyplývajících z chronické GVHD, vyšší pravděpodobnost návratu do zaměstnání a to bez většího rizika relapsů. Přibývá pacientů nad 60/70 let, kteří podstupují aloTx, a samotný pokročilý věk nemusí být překážkou aloTx, kdy starší pacienti dosahují uspokojivé QoL. Obecně existuje prostor pro snižování transplantční mortality u dlouhodobě přežívajících, zejména starších, pacientů. Nové molekuly se v budoucnu více zapojí do před- a potransplantační terapie a umožní lépe v součinnosti s imunomanipulací eradikovat reziduální nemoc, případně léčit potransplantační relaps. Současně s lepší kontrolou onemocnění po aloTx mohou BCRi redukovat závažnost GVHD.

Práce byla podpořena grantem MZ ČR-RVO (Fakultní nemocnice Plzeň-FNPI, 00669806).

50.

Alogenní transplantace po režimu s redukovanou intenzitou u 25 pacientů s vysoce rizikovou chronickou lymfatickou leukémií*Krejčí M., Doubek M., Brychtová Y., Panovská A., Tomiška M., Robešová B., Mayer J. (IHOK, FN, Brno)*

Úvod: Alogenní transplantace krvetvorných buněk (alo-HCT) má u nemocných s vysoce rizikovou CLL kurativní potenciál a nabízí dlouhodobou kontrolu nemoci, problémem však zůstává morbidita a mortalita spojená s alo-HCT. Role alo-HCT u CLL v éře nových léků je široce diskutována. Následně jsou prezentovány naše zkušenosti s provedením alo-HCT ve skupině 25 nemocných s vysoce rizikovou CLL.

Metody: Vysoce riziková CLL byla definována takto: nemoc refrakterní na purinová analoga, krátká odpověď nebo časný relaps (do 24 měsíců) po předchozí chemoimunoterapii, a/nebo progresse nemoci s přítomností nepříznivých genetických abnormalit (delece 17p/mutace TP53). Bylo

analyzováno 25 pac., kteří absolvovali chemoterapii a přípravný režim s redukovanou intenzitou (RIC) v našem centru v období 2007-2016. Medián předtransplantačních léčebných linií byl 3, nové léky (idelalisib, ibrutinib) byly podány u 20% nemocných (5/25). Fludarabin (30mg/m²) a cytarabin (2g/m²) po dobu 4 dní byly použity k cytoredukci, následně jako přípravný režim byl podán RIC ve složení celotělové ozáření (TBI, 4Gy) a cyklofosfamid 40-60 mg/kg po 2 dny. Medián věku pac. byl 53 let (rozpětí 32-66), typy dárců a použité štěpy byly následující: HLA identický sourozenec, n=6; nepříbuzenský dárc, n=19; periferní krvetvorné buňky, n=23; kostní dřeň, n=2.

Výsledky: Medián doby příhojení štěpu (neutrofilů nad 0,5x10⁹/l) byl 16 dní, jeden pac. zemřel v aplázii, 96% pac. (24/25) dosáhlo příhojení. Léčebná odpověď byla hodnocena u 22 pac., kompletní remise bylo dosaženo u 19 pac. (86%), negativita zbytkové nemoci byla dosažena u 14 pac. (64%). Infúze dárcovských lymfocytů byly podány u 28% pac. Kompletní chimerismus dosáhlo 82% pac. v mediánu 65 dní po alo-HCT. Incidence akutní GVHD byla 52%, incidence chronické GVHD 41%, většinou se jednalo o mírné formy. Kumulativní mortalita bez souvislosti s relapsem (NRM) po 1 roce a 2 letech od HCT byla 8% a 13%, příčiny úmrtí byly: multiorgánové selhání (1x), infekce (1x), GVHD (1x). Při mediánu sledování 37 měsíců od provedení HCT žije 64% nemocných (16/25), z toho je 14 v remisi, 2 s relapsem CLL. Celkem 9 pac. zemřelo (3 úmrtí na NRM, 6 úmrtí na progresi/relaps CLL). U 32% pacientů došlo k relapsu CLL.

Závěr: Sekvenční podání chemoterapie a RIC režimu s následnou alo-HCT je efektivní a bezpečná terapie u vhodných vysoce rizikových pacientů s CLL, v našem souboru byla léčebná odpověď 86% a nízká NRM. Doba do progresse (PFS) a celkové přežití (OS) ve 3 letech od provedení alo-HCT byly 56% a 64%.

51.

Význam nálezu komplexních karyotypů v souvislosti s delecemi/mutacemi genu TP53 u pacientů s CLL*Krůzová L., Schneiderová P., Holzerová M., Vatošíková M., Turcsányi P., Urbanová R., Kriegová E., Papajík T., Urbánková H. (Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc; Ústav imunologie FNOL a LF UP, Olomouc)*

Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je nejčastější leukémií dospělého věku vyznačující se heterogenním průběhem onemocnění. Určení prognosy nemocných je založeno na klinických a laboratorních výsledcích, mezi kterými hraje významnou roli cytogenetické vyšetření. K nálezům negativně ovlivňujícím prognosu pacienta patří delece genů TP53, ATM, BIRC3, dlouhého ramene chromosomu 6 a také nález komplexních změn v karyotypu (KZ). KZ se vyskytují u 10-30 % pacientů s CLL a korelují s výskytem nemutovaného IGHV a pozitivitou patologických B-lymfocytů na znak CD38. Cílem této práce bylo zjistit, jaká je frekvence KZ v souboru pacientů s CLL vyšetřených na HOK Olomouc v letech 1999-2016, stanovit, zda existuje klinický rozdíl mezi pacienty s KZ, ve kterých je zahrnuta delece TP53, pacienty s KZ bez této delece a pacienty pouze s delecí TP53. Celkový soubor tvořilo 785 pacientů, z toho u 117 pacientů (15 %) byly prokázány KZ. Tito pacienti byli vyšetřeni metodami konvenční a molekulární cytogenetiky (FISH, mFISH a arrayCGH) a molekulární genetiky (určení mutačního stavu IGHV a mutace TP53). Soubor tvořilo 83 mužů a 34 žen s mediánem věku při diagnóze (dg) 61 let (34-87 let). Celkem 77 pacientů (pp) (66 %) bylo u pokročilejším klinickém stádiu dle Bineta (B nebo C). Mezi nejčastější nalezené rekurentní chromosomální změny patří delece 13q14 (74 pp = 63 %), delece ATM (56 pp = 48 %), delece TP53 (41 pp = 35 %) a zmnožení genu MYC (38 pp = 32 %). 31 pacientů (76 %) s delecí genu TP53 mělo zároveň mutaci druhé alely. Naopak u 13 pacientů, u kterých nebyla prokázána delece genu TP53, byla prokázána mutace. Mezi chromosomy, které nejčastěji vstupují do translokací nebo jsou zahrnuté do početních změn a dicentrických chromosomů, patří chromosomy 2, 8, 13 a 17. 94 pacientů (80 %) mělo nemutovaný IGHV status (p=0,001). Na základě statistického porovnání bylo zjištěno, že pacienti s KZ mají kratší medián přežití ve srovnání s kontrolní skupinou CLL. Dále bylo prokázáno, že pacienti s KZ nalezenými již v době dg mají kratší medián přežití než pacienti s KZ, které byly detekovány až v průběhu onemocnění. Delece/mutace genu TP53 zahrnuté v KZ nemají již na prognosu vliv. Byla prokázána závislost mezi výskytem komplexních změn a nemutovaným IGHV. Naše práce prokazuje, že KZ detekované kombinací dostupných cytogenetických a molekulárně cytogenetických metod jsou důležitým prognostickým faktorem u pacientů s CLL a jejich nález je spojen s progresí onemocnění, negativní prognosou, rezistencí vůči terapii a kratším přežíváním pacientů. Tato práce je podpořena granty VES16-32339A a IGA_LF_2017_007

Dopad rekurentních mutací na dobu do progresu po terapiích zahrnujících rituximab v 1. linii u pacientů s CLL

Hložková M., Malčíková J., Tom N., Borský M., Brychtová Y., Doubek M., Panovská A., Divišková E., Mráz M., Pospíšilová Š., Mayer J., Trbušek M. (IHOK, FN, Brno)

Pro pacienty s chronickou lymfocytární leukémií (CLL) jsou režimy zahrnující rituximab (RTX) v kombinaci s chemoterapií významnou terapeutickou možností. Dosavadní klinické studie prokázaly, že pacienti s mutací v genu TP53 z těchto režimů neprofitují a měli by být léčeni pomocí alternativních přístupů. Kromě toho, mutace v genu NOTCH1 byly asociovány s nulovým benefitem z přidání RTX k chemoterapii. Potenciální dopad dalších prognosticky důležitých mutací u pacientů s CLL zůstává nejasný, včetně jejich role v relapsu onemocnění. Cílem naší studie bylo (a) posoudit dopad mutací v genech ATM, SF3B1, NOTCH1 a BIRC3 na dobu do progresu onemocnění (PFS) u pacientů s CLL léčených v první linii režimy s RTX a (b) analyzovat klonální evoluci mutací v relapsu. Celkově bylo studováno 53 pacientů s CLL, kteří byli v první linii léčeni režimy FCR (fludarabin, cyklofosfamid, rituximab), Q-FCR (FCR v redukováné dávce) nebo BR (bendamustin, rituximab). Všichni pacienti měli neporušený gen TP53 v analýzách FISH a FASAY (kvasinkový funkční test); 46/53 pacientů (87%) vykazovalo nemutovaný status IGHV. Mutace byly identifikovány pomocí sekvenování nové generace (Miseq, Illumina) u 53 vzorků před terapií a 41 vzorků z relapsu za využití tří samostatných panelů: ATM (exony 2-63; medián pokrytí (MP) 6100), SF3B1/NOTCH1/BIRC3 (exony 14-16, část exonu 34 a exony 7-10; MP 11200) a TP53 (exony 2-11; MP 31500). Funkční dopad mutací v genu ATM byl klasifikován pomocí online nástrojů SIFT a PolyPhen. Při klinické analýze byly uvažovány mutace přítomné ve >10% readů (molekul). PFS bylo stanoveno pomocí log-rank testu (Mantel-Cox). Interval byl počítán od doby ukončení terapie do klinické progresu onemocnění (dle doporučení iwCLL). U analýz provedených před terapií bylo identifikováno 23 pacientů s jedním mutovaným genem a 7 pacientů se dvěma mutovanými geny; zbývající pacienti (n=23) měly všechny geny v pořádku. Počet vzorků s jednotlivými mutacemi byl následující: ATM – 15 pacientů (uvažovány byly pouze mutace s predikovaným funkčním dopadem), SF3B1 – 10 pacientů (hot-spot mutace), NOTCH1 – 7 pacientů (delece c.7541_7542) a BIRC3 – 5 pacientů (frame-shift mutace). U jednotlivých léčebných režimů nebyly pozorovány signifikantní rozdíly v PFS: mediány byly 16,5 měsíce (m) pro FCR (30 pacientů; medián: 4 cykly); 15 m pro Q-FCR (15 pacientů; 4 cykly) a 14 m pro BR (8 pacientů; 3,5 cyklů); P = nesignifikantní (ns). V univariální analýze individuálních genových defektů jsme nepozorovali nepříznivý dopad mutací na PFS: ATM-mut medián 19 m vs. 14 m u wt pacientů; SF3B1-mut 19,5 m vs. 16 m; NOTCH1-mut 32 m vs. 15,5 m; BIRC3-mut 16 m vs. 16 m (všechny analýzy P = ns). V detailnější analýze strukturované podle defektů v genu ATM vykazovali nejkratší PFS (11 m) pacienti se samotnou delecí 11q (druhá alela ATM neporušená, n=13), a poté následovali pacienti ATM-mut (n=15; 19 m; P=0,1) a wt (n=24; 24 m; P=0,041). V doplňující analýze strukturované dle cytogenetických abnormalit měli pacienti s trizomií chromozómu 12 (n=7) výrazně delší PFS než pacienti bez této aberace (44,5 m vs 16 m; P=0,028). Analýza klonální evoluce u relabovaných pacientů (provedená u 41 párových vzorků) odhalila následující významné události: u dvou pacientů selekci mutace v genu TP53 (z 2,3% na 77% a z 5,4% na 64,5%), u dalších dvou selekci mutace v genu ATM (z 8% na 15% a z wt na 18%) a také komplexnější změny zahrnující expanzi i ústup mutací v genu BIRC3 u tří pacientů. Naše pilotní analýza provedená u zatím omezeného souboru naznačuje negativní dopad studovaných mutací u léčebných režimů s RTX v 1. linii. Některé vzorky z relapsu vykazují docela odlišný mutační profil.

Práce byla podpořena projekty AZV 16-32743A, MUNI/A/1106/2016 a FNBr 65269705.

AKUTNÍ LEUKEMIE/MYELODYSPLASTICKÝ SYNDROM

Molekulární genetika MDS v roce 2017 - význam pro klinickou praxi

Jonášová A. (I. Interní klinika – klinika hematologie, VFN, Praha)

Ačkoli myelodysplastický syndrom MDS je závažné onemocnění známé několik dekád, jeho molekulární patogeneze a otázka proč dochází k vývoji do AML zůstávají neznámé. V patogenezi MDS hrají roli genetické faktory, epigenetické a imunopatologické mechanismy. Sekvenování nové generace

„next generation sequencing“ (NGS) v posledních pěti letech odhalilo sadu mutací, které mohou hrát roli ve vzniku onemocnění. Většina mutovaných genů ovlivňuje nastavení genetického programu umožňující diferenciaci krevních buněk, jde o mutace genů, které mají význam jako tumor supresorické geny (TP53), geny signálních soustav (CBL, NRAS, KRAS, JAK2), geny s rolí v epigenetických procesech (TET2, ASXL1, EZH2, DNMT3A, IDH1/2) geny pro apoptotické a anti-apoptotické faktory s geny s rolí v reparaci DNA (TP53, ATM, BRCC3), geny transkripční regulace (TP53, RUNX1, ETV6, BCOR) a geny RNA sestřihového mechanismu (SF3B1, SRSF2, U2AF1, ZRSR2). Poslední práce dokládají, že u MDS nalezneme minimálně jednu z mnoha známých onkogenních mutací u zhruba 70-90% nemocných. Studium mutací stojí v posledních letech ve středu zájmu výzkumu týkajícího se nejen patogeneze MDS ale i stanovení prognózy a identifikace respondentů na specifickou terapii. Zvláště co se týče prognózy se stále více obrací pozornost k výsledkům molekulárně genetických vyšetření a nálezu mutací, které mají, jak se zdá určitou prognostickou váhu (například: TP53, ASXL1, EZH2, TET 2, SF3B1, RUNX1, CBL, NRAS). Krucíální je například mutace tumor supresorického genu TP53. Stran prognózy se zdá, že podobně jako je tomu u cytogenetických změn, čím více mutací nemocný má, tím horší prognóza je. Význam má také alelická frekvence jednotlivých mutací. Výskyt mutací u nemocných je velmi variabilní, většina nemocných sice má nějakou mutaci, ale výskyt specifické mutace v rámci celé MDS skupiny nepřesahuje 20%. Což obzvláště činí potíže v identifikaci jejich jasné patogenetické a prognostické role. Kumulující se poznatky a často ne zcela jednotné výsledky z různých analýz týkající se výskytu a prognostického významu mutací nyní ukazují jak složitá situace je. Výjimečné jsou mutace sestřihového mechanismu (spliceosom) a mutace genu TP53. Mutace spliceosomu 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. V současné době dokonce v nové MDS klasifikaci má přítomnost mutace SF3B1 diagnostickou hodnotu prakticky stejnou jako přítomnost věnečkovitých sideroblastů, či jí dokonce nahrazuje. Zdá se, že mutace spliceosomu jsou tzv. „founder“ mutace a skutečně hrají významnou roli ve vzniku dysplastické krevtvorby. V poslední době se proto vyvíjejí léky ovlivňující spliceosom. Pro klinické využití výsledků molekulárně genetických vyšetření a mutací je, jak jsme uváděli v současné době jednou ze stěžejních otázek identifikovat ty mutace, které mají opravdu silný a jednoznačný prognostický význam. Jak ukazuje řada prací s posledních 2 let se postupně zužuje okruh jasnějších bytí ne 100% prediktorů prognózy. Například práce Della-Porty et al. v JCO 2016 identifikuje již jen 3 mutace (ASXL1, RUNX 1 a TP53) jako nezávislé prognostické faktory výsledku allogenní transplantace u MDS. Jiná práce doporučuje přidání mutace SF3B1, ASXL1, EZH2 a TP53 k IPSS-R a vytvoření revidovaného „molekulárního“ IPSS (RM-IPSS). Mutace TET2 zase může napomáhat k identifikaci respondentů na demetylační terapii. Jak složitá a komplikovaná situace, ale ještě stále je, dobře prezentuje naše práce (prezentace Kamila Polárová et al OHD 2017). Nepodstatným faktorem klinického využití je zatím dosažitelnost výsledků a cena NGS.

Přístup k léčbě seniorů s akutní myeloidní leukémií

Žák P. (IV. interní hematologická klinika, FN, Hradec Králové)

Úvod: Akutní myeloidní leukémie (AML) dominantně postihuje pacienty starší 60 let (60% případů), medián věku při diagnóze je 65-67 let. U 50-60% nově diagnostikovaných pacientů s AML starších 65 let není podána žádná antileukemická terapie.

Cíl sdělení: Ukázat způsob, jak plánovat péči a léčbu u seniorů v podmínkách ČR Věk: Obvykle je nutné definovat celkový stav pacienta. Starší pacienti jsou arbitrárně děleni do 3 kategorií: 65-75 let, 76-85 let a nad 85 let. Nicméně kalendářní věk jako samostatný faktor není, jak bylo dokumentováno v řadě analýz, jediným zásadním a rozhodujícím kritériem. Důležitá se jeví další kritéria, která ukazují na skutečný biologický stav pacienta.

Celkový stav: Pro posouzení celkového stavu je nezbytné znát přítomnost dalších onemocnění, celkový funkční stav orgánů, nutriční stav, lékovou anamnézu, duševní stav a rodinné zázemí.

Léčba: Pacient s AML, který se jeví jako „geriatrický“ a přes kalendářní věk je biologicky starší není vhodný k agresivnímu léčebnému přístupu. Naopak u pacienta s nízkým rizikem léčebné mortality zvláště u cytogeneticky příznivých variant AML je vhodné léčit standardními postupy (3+7) nebo je zařadit do studijních protokolů. Využitím této stratifikace došlo k významnému snížení s léčbou

spojené mortality v léčených skupinách seniorů a to jak při využití přístupu BSC („best supportive care“) nebo při podání hypometylačních látek či konvenční chemoterapie.

Budoucnost: U seniorů s AML bývají až v 60 % aktivovány signální dráhy, které hrají roli v leukemogenním procesu. Výzkumné protokoly jsou zaměřeny na blokování těchto signálních drah. Rozvoj cílené terapie s cílem ovlivnění aktivity - FLT3, RAS, cKIT, DOT1-L, BRD4 a IDH1,2 aj. jsou nadějným příslibem netoxické a účinné léčby i pro pacienty s AML.

Závěr: V současné době je zásadní vybrat seniory s nově diagnostikovanou AML, kteří jsou v biologicky dobrém stavu a/nebo mají cytogeneticky příznivou AML. Ti mohou profitovat z konvenční či výzkumné terapie. V ostatních případech je vhodná „BSC“ nebo níže intenzifikovaná léčba.

55.

Srovnání efektu podávání hypometylačních látek s alogenní SCT u starších nemocných s pokročilým MDS

Čermák J., Vítek A., Maalouf-Soukupová J., Marková-Štátná M., Cetkovský P. (Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha)

Podávání hypometylačních látek (HMA) je efektivní u zhruba poloviny nemocných s pokročilými stádii MDS, nicméně, většina nemocných postupně relabuje a tři roky přežívá méně než 10%. Alogenní transplantace krvetvorných buněk (SCT) stále představuje jediný léčebný přístup i ke starším nemocným s pokročilým MDS, jenž vede k dlouhodobému přežití u 35-40% nemocných i přes stále poměrně vysokou peritransplantační mortalitu (25-30%). V naší studii jsme srovnávali efekt podávání HMA s alogenní SCT u 59 nemocných starších 50 let s pokročilým MDS (RAEB-2 či AML s multilineární dysplazií s méně než 30% blastů ve dřeni = RAEB-T). Ve skupině léčených HMA dostávalo 34 z 38 nemocných azacytidine (Vidaza®) v dávce 75 mg/m²x7 každých 28 dní a 4 nemocní byli léčeni decitabinem (Dacogen®) v dávce 20 mg/m² x5 každých 28 dní. Median počtu podaných cyklů byl 10,4 (rozmezí 3-31). Ve věkově shodné skupině 21 transplantovaných nemocných bylo 9 nemocných transplantováno bez předléčení, 10 nemocných bylo před SCT předléčeno kombinovanou chemoterapií, 2 nemocní byli předléčeni HMA, 10 nemocných obdrželo myeloablativní přípravný režim, 11 nemocných bylo transplantováno po redukováném přípravném režimu. Léčebná odpověď na podání HMA (CR, PR, hematologické zlepšení) byla pozorována u 22 z 38 nemocných (57,9%), CR bylo dosaženo u 10 nemocných (31,8%). V transplantované skupině bylo dosaženo přihojení štěpu u 20 z 21 nemocných, po SCT zemřelo 11 nemocných (6 na komplikace spojené se SCT, 5 nemocných na relaps choroby). Mezi oběma skupinami nebyl pozorován rozdíl v pravděpodobnosti přežití 2 roky (42% pro SCT vs. 36% pro HMA), signifikantní rozdíl ve prospěch SCT byl přítomen pro pravděpodobnost přežití 3 roky a 5 let (42% a 38% pro SCT vs. 9% a 4% pro HMA, P=0.001). Median přežití činil 18,7 měsíců u nemocných léčených HMA oproti 42,6 měsíce u transplantovaných (P=0.02). Při recentní analýze provedené za 48 měsíců o zahájení léčby žili 2 nemocní léčení HMA (5,3%) a 9 transplantovaných nemocných (42,8%) 23 nemocných léčených HMA a 6 transplantovaných relabovali. Nebyl pozorován významný rozdíl v efektu léčby a výskytu vedlejších účinků mezi nemocnými ve věkové skupině 50-60 let a nemocnými staršími 60 let. Naše výsledky potvrzují, že i přes iniciační efekt podávání hypometylačních látek u více než 50% nemocných představuje SCT nadále jediný léčebný přístup vedoucí k dlouhodobému přežití u signifikantního počtu nemocných i ve skupině pacientů starších 50 let s pokročilým MDS.

56.

Mutace v genu NRAS u pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML)

Đurínková A., Ježíšková I., Folta A., Dvořáková D., Kosařová Z., Čulen M., Cetkovský P., Žák P., Sztokowski T., Jindra P., Ráčil Z. (Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno; Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematologická a onkologická klinika, FN, Brno; Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha; IV. interní hematologická klinika, FN, Hradec Králové; Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc; Hematologicko-onkologické oddělení, FN, Plzeň)

Úvod: Aktivační mutace RAS proto-onkogenů patří k často detekovaným aberacím u solidních tumorů i hematologických malignit. Proteiny rodiny RAS (p21ras) jsou membránové proteiny s GTPázovou aktivitou kontrolující intracelulární signální dráhy. Somatické mutace genů RAS způsobují konstitutivní aktivaci RAS proteinu, vedoucí k nekontrolovatelně zvýšené proliferaci buněk

a snížené apoptóze. RAS geny kódují tři vysoce příbuzné proteiny (homology) o délce 181 - 189 aminokyselin: HRAS (11p15.5), KRAS (12p12.1) a NRAS (1p13.2). Zatímco u solidních tumorů jsou s vyšší frekvencí detekovány mutace v genu KRAS, u AML jsou čtenější mutace NRAS genu. Frekvence výskytu mutací je 11 až 30 % a jejich prognostický význam zůstává nejasný. Cílem práce bylo provést mutační analýzu genu NRAS u velké skupiny pacientů s AML.

Metody: Vyšetření mutací v genu NRAS bylo provedeno metodou sekvenování nové generace (NGS) u konsektivního souboru 231 de novo AML pacientů s kurativním přístupem léčby. NGS knihovny byly připravovány ze vzorků DNA periferních krví z doby diagnózy onemocnění za pomoci panelu ClearSeq AML (Agilent Technologies). Sekvenování probíhalo na přístrojích MiSeq a NextSeq (Illumina); jako pozitivní byly hodnoceny vzorky s hladinou frekvence variantní alely (VAF) $\geq 2\%$.

Výsledky: Minimálně jedna mutace v kodonech 12, 13 a 61 genu NRAS byla detekována u 51/231 (22,1 %) analyzovaných pacientů. Majorita mutací (74,6 %) byla lokalizována do exonu 2 – glycinové kodony 12 a 13. U 40/51 (78,4 %) pacientů byla identifikována jedna mutace genu, u 11/51 (21,6 %) NRAS pozitivních pacientů byla zachycena polyklonalita mutací – 10/11 pacientů neslo dvě a 1/11 pacientů tři mutace současně. Celkem bylo identifikováno 11 různých bodových mutací genu, nejčastěji G12D (27,0 %), G13D (19,0 %), G12S (12,7 %), Q61R (9,5 %), Q61K (6,3 %) a Q61H (6,3 %). Ostatní varianty (G13R, G13C, G12A, Q61L, G13V) byly detekovány s četností pod 5,0 %. Vedle mutací v uvedených kodonech byla u jednoho pacienta detekována raritní mutace G60E. Analýza distribuce mutací ukázala, že téměř u poloviny NRAS pozitivních pacientů je možné současně identifikovat přítomnost mutace v genu NPM1 – 24/51 (47,1 %) a mutace v genu DNMT3A – 19/51 (37,3 %) pacientů.

Závěr: Detekovaná frekvence mutací v genu NRAS (22,1 %) potvrzuje, že gen NRAS je vedle NPM1, FLT3 a DNMT3A čtvrtým nejčastěji mutovaným genem u pacientů s AML. Navíc určitá část NRAS pozitivních pacientů (21,6 %) nese více mutací genu současně. Význam koexistence těchto vícečetných mutací však zatím zůstává nejasný. „Podpořeno z projektu MUNI/A/1106/2016 a programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. 15-25809A. Veškerá práva podle předpisů na ochranu duševního vlastnictví jsou vyhrazena.“

57.

Blinatumomab v léčbě pokročilé akutní lymfoblastické leukemie – výsledky studie Tower a naše zkušenosti

Horáček J. M., Lánská M., Víšek B., Kupsa T., Žák P. (IV. interní hematologická klinika, FN a LF UK, Hradec Králové; KVVLVH, FVZ UO, Hradec Králové)

Blinatumomab je myší rekombinantní konstrukt jednořetězcové protilátky s vazebnou specificitou pro B-buněčný antigen CD19 a epsilon řetězec komplexu T-buněčného receptoru/CD3 (TCR/CD3) na jednom polypeptidovém řetězci. Patří do nové třídy bispecifických konstruktů protilátek nazvaných BiTE (Bispecific T-cell Engagers), které byly navrženy tak, aby směřovaly efektorové paměťové T buňky (CD3+) k cílovým buňkám (CD19+). Tím dojde ke spuštění specifické cytotoxické reakce a lýze cílových buněk. Během tohoto procesu aktivované T buňky produkují prozánětlivé cytokiny (např. TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-2), které mohou vyvolat syndrom z uvolnění cytokinů (Cytokine Release Syndrome, CRS). V prevenci i léčbě CRS se používají kortikosteroidy. Studie Tower byla multicentrická randomizovaná studie fáze 3, do které bylo zařazeno 405 dospělých pacientů s relabující nebo refrakterní B-prekurzorovou akutní lymfoblastickou leukémií (R/R B-ALL), Ph negativní. Pacienti byli v poměru 2:1 randomizováni k léčbě blinatumomabem (až dva cykly v rámci indukce, až tři cykly v rámci konsolidace u nemocných s remisí, až po dobu 12 měsíců v rámci udržovací léčby při trvající remisi) (n=271) nebo ke standardní chemoterapii dle výběru ošetřujícího lékaře (n=134), nejčastěji chemoterapie FIAG±Ida. Primárním sledovaným parametrem bylo celkové přežití (OS), k hlavním sekundárním sledovaným parametrům patřily četnost CR po indukci, přežití bez příhod (EFS), trvání remise (DOR), četnost alogenní transplantace krvetvorných buněk (aIoT) a výskyt nežádoucích účinků (NÚ). Výchozí charakteristiky pacientů v obou ramenech byly podobné: medián věku nemocných byl 41 let, v souboru převažovali muži, třetina nemocných dříve podstoupila aIoT. Léčba byla zahájena u 376 nemocných. Medián OS byl signifikantně delší v ramenu blinatumomabu (7,7 měsíce) než v ramenu chemoterapie (4,0 měsíce) (HR 0,71; 95% CI 0,55–0,93; p=0,01), po 6 měsících přežívalo 54 % vs. 39 % pacientů.

Rovněž četnosti CR s kompletní úpravou KO (34 % vs. 16 %; $p < 0,001$), jakož i četnosti CR s kompletní, částečnou či inkompletní úpravou KO (44 % vs. 25 %; $p < 0,001$) byly po 12 týdnech statisticky významně vyšší při léčbě blinatumomabem v porovnání s chemoterapií. Ve skupině nemocných s CR s kompletní, částečnou či nekompletní úpravou KO dosáhlo MRD negativity 76 % vs. 48 % pacientů, medián trvání remise byl 7,3 vs. 4,6 měsíce a četnost 6měsíčního EFS činila 31 % vs. 12 % (HR pro relaps po dosažení CR s kompletní, částečnou či inkompletní úpravou KO 0,55; 95% CI 0,43–0,71; $p < 0,001$). ALoT podstoupilo 24 % pacientů v obou ramenech. Výsledky studie Tower ukazují, že léčba blinatumomabem v porovnání s chemoterapií u pacientů s R/R B-ALL vedla k signifikantnímu zlepšení OS, EFS a četnosti dosažení CR. Výskyt NÚ byl při terapii blinatumomabem podobný jako při aplikaci chemoterapie, výskyt závažných nežádoucích účinků adjustovaný na délku expozice terapii byl výrazně nižší při terapii blinatumomabem. Ve Fakultní nemocnici Hradec Králové máme zkušenosti s blinatumomabem v léčbě R/R B-ALL od ledna 2014, celkem jsme podali 25 cyklů. Ve studii Tower jsme blinatumomab podali 4 pacientům (2 po aLoT). V rámci Specifického léčebného programu (SLP) Amgen jsme blinatumomabem léčili 3 pacienty (2 po aLoT), u 1 pacienta se jednalo o retreatment pro relaps. U všech pacientů bylo po indukční léčbě blinatumomabem dosaženo CR, MRD negativita v 71 %. U 3 pacientů došlo k relapsu onemocnění, z toho 1 časný relaps. U 3 pacientů byla následně provedena aLoT. K dnešnímu dni (15. 3. 2017) všichni naši pacienti léčení blinatumomabem žijí. Nečastějším nežádoucím účinkem při léčbě byla neutropenie a infekce, které nevyžadovaly hospitalizaci.

58. Léčba AML u pacientů nad 60 let a role alogenní transplantace v jejich léčbě – zkušenosti HOO FN Plzeň v období 2003-2016

Karas M., Steinerová K., Hrabětová M., Lysák D., Vozobulová V., Jindra P. (HOO FN, Plzeň)

Úvod: výsledky léčby starších pacientů s AML jsou obecně neuspokojivé z důvodů vyššího zastoupení rizikových AML a vyššími riziky samotné léčby u této skupině pacientů. Alogenní transplantace krevetvorných buněk (aloSCT) může u části starších pacientů s AML zlepšit jejich prognózu. V naší prezentaci analyzujeme výsledky léčby AML u starších pacientů na našem pracovišti a potenciální roli aloSCT v jejich léčbě za období 2003-2016.

Pacienti a metody: od roku 2003 do roku 2016 bylo na našem pracovišti diagnostikováno 222 pacientů ve věku 60-70 let s AML, intenzivní cytostatickou léčbu podstoupilo 140 (63%) pacientů a z nich 74 (53%) pacientů s mediánem věku 64 let (rozmezí, 60-70 let) v 61% v 1.CR., v 7% v 2.CR a v 32% mimo CR AML podstoupilo aloSCT (27% HLA shodný příbuzný dárce, 4% haploidentický příbuzný dárce, 69% nepříbuzný dárce) po redukované přípravě. Zdrojem krevetvorných buněk byla v 88% periferní krev a v 12% kostní dřeň. Přípravným protokolem byla v 82% kombinace fludarabinu s melfalanem a v 12% sekvenční protokol, který byl u 25 pacientů doplněn o podání ATG. Profylaxí GVHD byla kombinace cyclosporinu A a metotrexátu a v případě haploidentické aloSCT byl podáván potransplantační cyklofosfamid a kombinace cyclosporinu A a mykofenolát mofetylu.

Výsledky: z 128 pacientů plánovaných k provedení aloSCT byly hlavními důvody jejího neprovedení: v 46% úmrtí v průběhu intenzivní chemoterapie, v 30% rezistence či progresse AML, v 11% nedostupnost dárce, v 7% celkový stav či komorbidita neumožňující aloSCT a v 6% odmítnutí aloSCT pacientem. AloSCT nicméně podstoupilo 58% z indikovaných pacientů. U všech pacientů se přihojil štěp po aloSCT byla dosažena či trvala CR AML. K rozvoji akutní GVHD došlo u 68% a k rozvoji chronické GVHD u 41% pacientů. S mediánem sledování žijících pacientů 53 měsíců (rozmezí, 10-149) žije 32 (43%) pacientů v CR AML. S mediánem 7 měsíců (3-48) po aloSCT 21 (28%) pacientů zrelabovalo a 20 z nich zemřelo. 22 (30%) pacientů zemřelo z jiných důvodů než byl relaps AML. Transplantační mortalita do dne +100 byla 4% a do 1 roku 19%. 3 letý OS byl u transplantovaných pacientů 38% a v případě transplantace v CR AML pak 53%. 3 letý OS u všech intenzivně léčených pacientů byl 37%.

Závěr: intenzivní léčba včetně zařazení aloSCT má šanci zlepšit nepříznivou prognózu starších pacientů s AML. Zařazení aloSCT do léčby AML u starších nemocných by mělo být standardním postupem při zohlednění našich i publikovaných dat.

59. Somatic mutations dynamics in high-risk MDS patients treated with azacitidine determined by Illumina Myeloid TruSight panel

Polgárová K., Kulvait V., Vargová K., Minařík L., Zemanová Z., Jonášová A., Stopka T. (1st Internal Clinic – Clinic of Haematology, General Faculty Hospital, Prague; 1st Faculty of Medicine, BIOCEV, Charles University, Prague; Center of Cancer Cytogenetics, General Faculty Hospital, Prague)

Myelodysplastic syndrome (MDS) is defined as a clonal stem cell disorder with ineffective dysplastic haematopoiesis and variable risk of progression to acute myeloid leukaemia (AML). Somatic mutations are observed in ~ 90% of MDS patients and are associated with different disease phenotype as well as treatment response and prognosis. We herein asked whether treatment with Azacitidine (AZA) selects some AZA-resistant clones defined by particular somatic mutations and whether AZA treatment influences the clonal architecture and its dynamics during the disease course. We thus analyzed in duplicate 97 bone marrow (BM) samples of 38 high risk MDS patients before AZA-treatment and during different restaging points using Illumina Myeloid TruSight panel. MDS subtypes were as follows: RAEB2 (n=17, 46%), RAEB1 (n=13, 35%), AML/MDS (n=5, 13%), CMML (n=2, 4%), and RCMD (n=1, 2%). 19% of patients had complex karyotypes, 46% were progressions of 5q-. Median OS was 24 months, median PFS was 16 months; CR/mCR was reached in 43% (n=16); 65% patients (n=24) progressed to AML. Germinal variants were filtered using non-malignant CD3+ cell fraction. Analysis of 38 patients treated with AZA (reaching median OS 24 months (Mo) with 60% hematology improvement) revealed 125 somatic variants with VAF over 5%. Majority of patients (92%) from our MDS cohort bore at least one somatic mutation (range 1-9) in one out of 54 analyzed genes. The most frequently mutated genes at diagnosis were TP53 (n=11), TET2 (n=10), CUX1 (n=9), BCORL1 (n=8) and ASXL1 (n=7). Out of the variants observed before AZA therapy, 37% remained stable during the disease course including TET2, BCORL1, CDKN2A, and EZH2. Besides the stable variants' dynamic (changes between time points 50% < VAF < 200%), which precluded presence of putative AZA-resistant clones with shorter OS (14 mo), additional dynamic patterns were observed. Patients bearing variants with decreasing VAF, i.e. with clones inhibited by AZA, lived longer (31 Mo). We conclude that dynamic changes observed in the mutational pattern often reflect the disease course and responsiveness of the disease to AZA treatment. Several types of variant dynamics during the AZA therapy were noted by using the massive parallel sequencing approach of the duplicate libraries per MDS BM samples also utilizing non-tumorous controls and serial sampling. Stable dynamics was found in variants previously recorded by COSMIC database and targeting the adverse outcome genes such as TP53, BCORL1, ASXL1, and EZH2 as well as their combinations with TET2 that may potentially mediate AZA resistance.

Grant support: AZV 16-27790A, GAČR 16-05649S, UNCE 204021, LH 15170, Progres Q26/Q28, NPU2 LQ1604 & RVO-VFN64165.

CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKÉMIE/ MYELOPROLIFERATIVNÍ NEOPLÁZIE

60. Interferon alfa v léčbě Ph negativnej myeloproliferatívnej neoplázie

Hatalová A., Slezáková K., Mistrík M., Bátorová A. (Klinika hematológie a transfuziológie, Univerzitná nemocnica, SZU a LF UK, Bratislava – SK)

Od objavu interferónu (IFN) virológi Isaccom a Lindenmannom pri štúdiu bunkových kultúr uplynulo 60 rokov. Klinické štúdie s IFN- α pri mnohopočetnom myelóme, vlasatobunkovej leukémii (HCL) a chronickej myelocytovej leukémii (CML) umožnili používať IFN- α aj Ph negatívnych myeloproliferatívnych neopláziách (Ph-MPN), esenciálnej trombocytémii (ET), polycytémii vera (PV), primárnej myelofibróze (PMF), ako aj hypereozinofilnom syndróme a systémovej mastocytóze. Použitie rIFN- α sa prvý raz dokumentovalo pri liečbe ET, v roku 1985. V roku 1986 profesor Silver publikoval výsledky použitia IFN- α pri myelofibróze (MF), u nás Šteruská a spol. (1989) publikovali prvé úspešné skúsenosti s liečbou rekombinantného IFN- α (rIFN- α) u pacientov s ET. Na základe priaznivých výsledkov odporúčali tento liek do prvej línie liečby pacientov s MPN. Nízke

dávky IFN- α v priebehu niekoľkých mesiacov u väčšiny pacientov s ET, PV a hypercelulárnej fázy MF vedú k navodeniu hematologickej a molekulovej odpovede, ale aj k redukcii výskytu trombotických komplikácií, častých pri MPN. Limitácie pri používaní IFN sú dané výskytom nežiaducich účinkov, približne jedna tretina pacientov musí z dôvodu intolerancie liečbu ukončiť. Podiel na znižovaní výskytu nežiaducich účinkov má liečba nízkymi dávkami a použité pegylovanej formy IFN (Peg-IFN- α -2b). Ďalšia generácia pegylovaného IFN, ropeginterferónu (Peg-P-IFN- α -2b) s prebiehajúcou registračnou klinickou štúdiou u pacientov s PV znamená historický míľnik. Peg-IFN s pridaním prolínu na N-terminálnom konci má jedinečné farmakokinetické vlastnosti, ktoré sa odrážajú v tolerabilite, bezpečnosti a účinnosti. Klinická štúdia označená akronymom PPROUD – PV sa zameriavala na historicky prvé porovnanie hydroxyurey a Peg-P-IFN- α -2b. Nová generácia monopegylovaného IFN- α -2b v porovnaní s konvenčným Peg-IFN- α má výrazne lepšiu tolerabilitu, avšak aj pri použití novej generácie IFN- α približne 20 % pacientov ukončilo liečbu pre nežiaduce účinky. V práci sme sa zamerali na problematiku liečby Ph-MPN s IFN- α a hodnotenie efektivity liečby. Vychádzame z hodnotenia 70 - členného súboru pacientov s Ph-MPN, liečených na našom pracovisku, v ambulancii zameranej na liečbu MPN v priebehu rokov 1997 – 2017, mimo klinických štúdií. Do súboru pacientov sme začlenili tých, ktorí mali diagnózu jednotlivých podtypov MPN (PV, ET a PMF). Do roku 2013 v liečbe prevažoval rIFN- α . Peg-IFN- α 2b je od roku 2013 dostupný pre pacientov netolerujúcich liečbu konvenčným IFN- α . Vyhodnotením výsledkov sme potvrdili takmer 90 % celkových hematologických odpovedí. Dokumentujeme aj pokles alelickej nálože mutácie JAK2 pod hranicu detekovateľnosti. U žiadneho pacienta sme nezaznamenali transformáciu MPN do akútnej myeloblastovej leukémie (AML). Vyhodnotili sme trombotické komplikácie, progresiu MPN a výskyt nežiaducich účinkov liečby IFN- α . Pozornosť venujeme rozboru nežiaducich účinkov, ktoré viedli k prerušeniu liečby. IFN- α preukazuje svoju účinnosť pri manažmente Ph-MPN už od 80-tych rokov minulého storočia. Súčasná vedomosti o potenciálne kuratívnom vplyve IFN- α na priebeh MPN logicky vyústili do konceptu včasnej liečebnej intervencie, v začiatkových štádiách ochorenia PV, ET a prefibrotického štádia PMF. Napriek našim skúsenostiam a vedomostiam o liečbe, benefitoch a bezpečnostnom profile IFN- α v manažmente Ph-MPN nám stále chýba jeho schválenie na liečbu v tejto indikácii. Nástup novej generácie IFN- α v liečbe Ph-MPN nepochybne prinesie nové stratégie v liečbe pacientov s dôrazom na potrebu včasnej intervencie.

61.

Význam vyšetrení mutačného stavu a jeho vliv na klinický a laboratorní fenotyp u myelofibrózy

Palová M., Szotkowski T., Hluší A., Indrák K., Navrátilová J., Divoká M., Papajík T. (Hematologická klinika, FN, Olomouc; Ústav molekulární biologie LF UP a FNOL, Olomouc)

Úvod: Primární myelofibróza (PMF) je chronickým klonálním onemocněním krvetvorby. Spolu s pravou polycytémií (PV) a esenciální trombocytémií (ET) patří do skupiny Ph (Philadelphia chromosome) negativních myeloproliferativních nemocí (MPN). Objev somatické mutace JAK2V617F vedl k průlomů v klasifikaci, diagnostice a pochopení Ph negativních MPN. Pouze u 50-60% PMF je detekovaná mutace JAK2V617F, v dalších 5-8% případů mutace v kodonu 515 nebo 505 genu kódujícím tromboopoetinový receptor (MPL). Když byly v roce 2013 popsány somatické rekurentní mutace postihující exon 9 v genu pro kalretikulín (CALR), které se vyskytují u většiny JAK2 a MPL nemutovaných pacientů s PMF, vzrostl počet nemocných se známým molekulárním markerem klonality na 80-85%. V práci jsme studovali vliv mutace v genu CALR na klinický průběh u pacientů s primární, post-ET a post-PV myelofibrózou.

Pacienti a metody: Retrospektivní analýza souboru 66 pacientů s diagnózou PMF (45), post-PV myelofibrózy (10) a post-ET myelofibrózy (11) diagnostikovaných v našem centru v období od roku 1998 do 2016 v souladu s WHO kritérii 2008. Z toho 30 mužů, 36 žen, medián věku 55,5 let (18-77). Transformace do akutní leukemie (AL) byla diagnostikována v souladu s WHO kritérii. Konstituční symptomy zahrnovaly teploty, ztrátu hmotnosti a noční poty. U všech pacientů byla vyšetřována mutace v kodonu 617 genu JAK2, v případě pozitivního nálezu se provedla kvantifikace a výpočet procentuálního zastoupení mutované alely. Taktéž byly u všech subjektů vyšetřeny mutace v exonu 9 genu CALR a genu MPL (S505N a W515). Klinické a laboratorní parametry byly systematicky porovnány s mutačním stavem nemocných.

Výsledky: V době analýzy byl medián sledování pacientů 46 měsíců (2-221), 13 (20,3%) pacientů zemřelo v mediánu 42 (13-173) měsíců od diagnózy. Tři pacienti progredovali do AL v mediánu 2 let od diagnózy. Distribuce driver mutací: 54,5% JAK2V617; 34,8% CALR; 6,1% MPL; 3,0% triple negativní, 1,5% koincidence CALR a JAK2V617F. Z CALR mutovaných nese 60,8% mutaci typu1; 17,4% mutaci typu2 a 21,8% další méně frekventní typy. Analýza naší kohorty prokázala signifikantní rozdíl ve věku, počtu trombocytů, velikosti sleziny a přítomnosti B-symptomů v době diagnózy. Ve skupině CALR mutovaných jsme prokázali signifikantně nižší věk ($p=0,009$), vyšší počty trombocytů ($p=0,051$), výrazně menší velikost sleziny ($p=0,005$) a nižší výskyt B-symptomů ($p=0,02$) v době diagnózy ve srovnání s CALR nemutovanými pacienty. Zaznamenali jsme nižší počet leukocytů u CALR mutovaných (nedosaženo statistické významnosti). Hodnoty dalších testovaných parametrů nebyly významně rozdílné. V souladu s literaturou jsme potvrdili srovnatelné rozložení variant CALR mutací s nejčastěji vyskytujícími se typem 1 (CALRdel52). U JAK2V617F pozitivních pacientů jsme testovali vliv alelické nálože mutované alely na klinický a laboratorní fenotyp choroby. Potvrdili jsme významně větší splenomegalii ($p=0,0001$) a vyšší hodnoty leukocytů ($p=0,003$) v době diagnózy u pacientů s alelickou náloží JAK2V617F nad 50%. Pomocí univariantační analýzy jsme porovnávali celkové přežití (OS) pacientů. Rozdíl v OS mezi CALR mutovanými a nemutovanými nebyl statisticky významný, což je dáno nízkým počtem zaznamenaných událostí.

Závěr: Naše zkušenosti potvrzují již referované údaje o významu driver mutací, které podmiňují různé klinické projevy a průběh MPN. Přítomnost CALR mutace je prognosticky příznivým faktorem a její vyšetření je důležité pro přesnější posouzení individuálního rizika nemoci.

Práce vznikla s podporou grantu IGA_LF_2017_007.

62.

Význam věku při léčbě CML na dosažení optimální odpovědi

Bělohávková P., Voglová J., Vrbacký F., Hrochová K., Žák P. (IV. interní hematologická klinika, FN, Hradec Králové)

Úvod: Tyrozinkinázové inhibitory (TKI) výrazně zlepšily přežití nemocných s chronickou myeloidní leukémií (CML) ve všech věkových kategoriích. Vyšší věk pacientů s CML v době diagnózy je považován za negativní prognostický faktor a věk pacienta je rovněž součástí prognostických skórovacích indexů (Sokalův a Hasfordův index). S novou érou léčby TKI se začaly objevovat práce, které prokázaly, že věk pacienta při léčbě TKI ztrácí svůj silný prognostický význam.

Soubor: Provedli jsme retrospektivní analýzu významu věku na dosaženou léčebnou odpověď při rozdělení podle věku pacientů v době diagnózy (≤ 60 let vs. > 60 let). Do našeho hodnocení byli zařazeni pouze pacienti s chronickou fází a léčbou imatinibem (IMA) v 1. linii. Celý soubor představuje 129 pacientů (62 žen, 67 mužů) s mediánem věku v době diagnózy CML- CP 55 let (rozpětí 19 – 88 let), kteří byli diagnostikováni v období 1/2001 – 6/2015. Skupina mladších pacientů zahrnuje 82 pacientů (37 žen, 45 mužů) a skupinu starších tvoří 47 pacientů (25 žen, 22 mužů). Medián dávky imatinibu byl v obou skupinách shodný 400 mg denně (rozpětí 200 – 600 mg). Medián doby sledování ve skupině starších pacientů je 89 M (21 - 194 M) a ve skupině mladších pacientů 114 M (21 - 294 M).

Výsledky: Po 3 měsících (M) léčby bylo dosaženo kompletní hematologické odpovědi (CHR) u 94 % mladších pacientů a u 85 % starších pacientů, po 6M léčby kompletní cytogenetické remise (CCyR) dosáhlo 51 % mladších vs. 38 % starších pacientů a CCyR ve 12 M léčby byla přítomna u 89 % mladších vs. 68 % starších pacientů. Velké molekulární odpovědi (MMR) po 12 M léčby bylo dosaženo u 51 % mladších a 46 % starších pacientů, po 18 M léčby u 77 % mladších a 62 % starších pacientů. V případě statistického posouzení dosažených odpovědí bylo zjištěno, že význam věku na dosaženou odpověď se uplatňuje pouze ve 12. měsíci na dosažení CCyR ($p = 0,005$), u ostatních odpovědí nebyl prokázán statistický význam věku. Hodnotíme-li pravděpodobnost přežití v 10 letech v případě CML jako příčiny úmrtí je 84 % u starších pacientů a 98 % u mladších pacientů ($p = 0,0452$). Při hodnocení všech příčin úmrtí u pacientů bylo zjištěno, že pravděpodobnost přežití u mladších pacientů bude 98 % vs. 64% u starších pacientů ($p = 0,0003$).

Závěr: V obou skupinách při léčbě CML-CP imatinibem v 1. linii bylo dosaženo velmi dobrých léčebných odpovědí bez většího vlivu věku v době diagnózy na dosažení této odpovědi. Léčba imatinibem přináší výrazný benefit i pro starší pacienty a bez rozdílu věku by mělo být její zahájení zvaženo. Horší přežití u starších pacientů je dáno jinými příčinami úmrtí než je CML.

Áké sú úskalia liečby chronickej myelocytovej leukémie u starších pacientov?

Slezáková K., Sninská Z., Hatalová A., Mistrík M., Bátorová A. (Klinika hematológie a transfuziológie LFUK, SZU a Univerzitetnej nemocnice, Bratislava – SK)

Cieľ: Cieľom príspevku je upozorniť na možné úskalia liečby starších pacientov s chronickou myelocytovou leukémiou (CML) inhibítormi tyrozínkinázy (TKI) a aj na základe analýzy súboru našich pacientov ponúknuť možné riešenia ako zvládnuť najčastejšie problémy pri manažmente takýchto pacientov. Úvod. Zavedenie TKI do liečby pacientov s CML umožnilo tak významne predĺžiť ich prežívanie, že sa v priemere dožívajú podobného veku ako ostatná populácia. Epidemiologické údaje o incidencii CML v USA a Európe poukazujú, že CML je relatívne zriedkavé onkologické ochorenie s incidenciou 0,6 – 2,0 prípadov na 100 000 obyvateľov, s mediánom veku pri diagnóze 65 rokov (1). V dôsledku pozitívneho vplyvu TKI na prežívanie a očakávanú dĺžku života stúpa prevalencia CML a počet starších pacientov liečených TKI narastá. TKI sú účinné aj u starších pacientov, s účinnosťou podobnou ako u mladších. U starších pacientov sa častejšie stretávame s komorbiditami a liekovými interakciami, ktoré môžu mať vplyv na celkový manažment pacientov, môžu vyžadovať úpravu dávkovania a aj zmenu TKI. Súbor a metodika. Súbor tvoria pacienti s CML nad 65 rokov, ktorí sú liečení TKI na pracovisku KHaT v UNB. V analyzujeme liečebnú odpoveď a toleranciu týchto pacientov na TKI. Liečebnú odpoveď hodnotíme podľa odporúčaní ELN z roku 2013 (2). Výsledky. Na KHaT v UNB sa k 31.12.2016 lieči TKI 155 pacientov s CML, z toho 38 pacientov nad 65 rokov, čo predstavuje 24,5% z celkového počtu. Súbor tvorí 24 mužov a 14 žien. Priemerný vek v súbore pacientov je 71 rokov. V sledovanom súbore je 19 pacientov liečených imatinibom, 15 pacientov nilotinibom a 4 pacienti sú liečení dasatinibom. Redukciu dávky pre nežiaduce účinky vyžadovalo 15 pacientov. Liečebnú odpoveď sme hodnotili u 31 pacientov, ktorí boli liečení TKI aspoň 12 mesiacov. Všetci pacienti sú v kompletnej hematologickej remisii, v tzv. veľkej molekulovej remisii (MMR, bcr/ablIS \leq 0,1%) je 15 pacientov, v kompletnej molekulovej remisii (bcr/abl negat) je 16 pacientov. Záver. Aj starší pacienti s CML liečení TKI dosahujú pri správnom manažmente optimálne liečebné odpovede. Vyšší vek by nemal byť prekážkou v liečbe TKI. Pred zahájením liečby alebo zмене TKI je vhodné podrobnejšie vyšetrenie pacienta so zameraním na kardiovaskulárny a respiračný systém a parametre metabolizmu. Pri výskyte nežiadúcich účinkov je potrebná včasná redukcia dávky TKI, v prípade pokračujúcej toxicity je vhodná zmena na iný TKI. Literatúra. 1. Rohrbacher M, Hasford J. Epidemiology of chronic myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2009; 22:295-302. 2. Baccarani M, Deininger M, Rosti G et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood* 122:872-884.

Výsledky liečby chronickej myeloidní leukémie u starších pacientů

Vráblová L., Faber E., Rohoň P., Skoumalová I., Indrák K., Papajík T., Urbánková H., Divoká M., Furstová J., Furst T. (Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc; 1. LF UK, Praha)

Úvod: Výsledky liečby chronickej myeloidní leukémie (CML) se dramaticky zlepšily po zavedení inhibítorů tyrosinové kinázy (TKI). Toto zlepšení se podle literárních údajů projevilo také u starších pacientů.

Cíle: Analýza výsledků léčby TKI nemocných s CML starších 65 let.

Metodika: Pro retrospektivní hodnocení byli vybráni nemocní léčeni v první linii imatinibem na HOK LF UP po roce 2000. Výsledky byly získány z dokumentace pacientů. Byly použity popisné statistické metody a bude provedena analýza přežití podle Kaplana a Meiera v kombinaci s log-rank testem.

Výsledky: Starší pacienti, 20 žen a 18 mužů ve věku od 65 do 88 let (věkový medián 73,5 let), měli podle Sokalova skóre v jednom případě (2,6%) nízké riziko, 23 (61%) střední a 14 (37%) pacientů mělo vysoké riziko. 25 (66%) pacientů dosáhlo kompletní cytogenetickou a 22 (58%) velkou molekulární odpověď. U 16 pacientů bylo nutno redukovat dávku léčiva nejčastěji (10 případů) pro hematologickou toxicitu. 9 pacientům byla změněna terapie za inhibitor TKI vyšší linie, u 7 pro selhání terapie. K úmrtí nemocných došlo u 14 (39%) případech; v důsledku progresu CML exitovalo 5 pacientů, 6 nemocní zemřeli na komorbiditu, 3 pacienti z nejasné příčiny. Provedli jsme i analýzu výsledků léčby 111 mladších pacientů, 46 žen a 65 mužů, ve věku od 20 do 64 let (věkový medián 52 let), kteří měli podle Sokalova skóre vyjádřeno nízké riziko v 39 (35%) případech, střední 39 (35%), vysoké riziko

mělo 31 (28%) pacientů, u 2 nebylo vyjádřeno. Kompletní cytogenetickou odpověď dosáhlo 93 (84%) mladších pacientů a velkou molekulární odpověď 84 (76%). U 39 pacientů se redukovala dávka léčiva nejčastěji pro nežádoucí účinek, v 13 případech až po dosažení velké molekulární odpovědi. Změna terapie za inhibitor TKI vyšší linie nastala v 28 případech hlavně pro selhání terapie. K úmrtí došlo u 13 pacientů; v důsledku progresu CML 4, 7 nemocní zemřeli na komorbiditu, 1 pacient z neznámé příčiny, 1 pacient pro suicidium. Statistické srovnání výsledků potvrdilo významně lepší pravděpodobnost dosažení kompletní cytogenetické odpovědi ($p=0,0002$) a velké molekulární odpovědi ($p=0,0002$) u mladších pacientů. V obou případech jsme pozorovali trend k dřívějšímu dosažení léčebné odpovědi paradoxně u starších. Snížení dávky imatinibu přitom nezhoršovalo dosažení odpovědi na léčbu. Celková úmrtnost byla pochopitelně signifikantně horší u starších ($p=0,001$), ale úmrtnost na CML byla lepší u mladších pacientů pouze hraničně ($p=0,06$).

Závěr: v našem centru představují starší pacienti s CML rizikovou skupinu.

Podpořeno grantem IGA_LF_2017_007.

KONFERENCE ZDRAVOTNÍCH LABORANTŮ 2**Revize WHO klasifikace hematologických malignit: 2016 - vybrané změny z pohledu zdravotního laboranta**

Trnavská I., Kissová J., Antoňová M., Antoňová L., Mičáňková S., Tůzová E., Babáčková G., Penka M. (OKH FN, Brno)

V roce 2016 byla provedena revize předchozí WHO klasifikace hematologických malignit vydané v roce 2008. Nejdůležitější změny této revize byly publikovány ve dvou stěžejních publikacích, kde byly shrnuty hlavní změny týkající se diagnostických kritérií myeloidních a lymfoidních malignit. Záměrem nové revize bylo začlenit do stávající WHO klasifikace nové poznatky v problematice hematologických malignit, které se objevily od doby posledního vydání. Revize následuje filozofii předchozího vydání- zahrnout klinické, morfológické, imunofenotypizační, cytogenetické a molekulárné genetické znaky s cílem definice jednotek s klinickým významem a usnadnit rozpoznání méně častých skupin onemocnění. Diagnostická kritéria myeloidních malignit a akutních leukémií zahrnují nové objevené molekulární znaky významné pro diagnostiku a prognózu jednotlivých onemocnění, novější charakteristiku a standardizaci morfológických znaků, které jsou nápomocné v diferenciální diagnostice jednotlivých skupin onemocnění. Revize lymfoidních malignit zaznamenala pouze omezené úpravy při srovnání s klasifikací 2008. Autoři sdělení se zaměřili na výčet vybraných změn revidované WHO klasifikace zejména v oblasti morfológické laboratorní diagnostiky a to z pohledu zdravotního laboranta specialisty zabývajícího se touto problematikou. Pro morfológickou diagnostiku jsou v tomto ohledu významnější změny týkající se myeloidních malignit. Mezi významné změny patří upřesnění diagnostických kritérií bcr/abl negativních myeloproliferativních chorob, vyčlenění mastocytózy ze skupiny myeloproliferací jako samostatné jednotky a změny v terminologii jednotlivých podskupin myelodysplastického syndromu. Významnou změnou v kategorii akutních leukémií je vyjmutí diagnostické jednotky akutní erytroidní leukémie a vyjasnění diferenciální diagnostiky myeloidních neoplázií s erytrocitární predomancí. Některé změny byly provedeny i u některých jednotek myelodysplasticko-myeloproliferativních chorob.

Podpořeno grantem MZ ČR- RVO (FNBr, 65269705).

Laboratorní diagnostika akutních leukémií podle WHO 2016 z pohledu molekulárního biologa

Navrátilová J., Szotkowski T., Divoká M., Katrincská B., Holzerová M., Urbánková H., Lipert J., Orviská M., Vrbová O., Indrák K., Papajík T. (Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc)

Až do roku 2001 byla pro diagnostiku akutních leukémií využívána francouzsko-americko-britská klasifikace (FAB) založená především na morfológickém a cytochemickém zhodnocení leukemických buněk. Vzhledem k postupnému rozvoji poznatků na poli patogeneze leukémií bylo objeveno

mnoho mutací v genech, u nichž bylo zapojení v procesu nádorové transformace následně potvrzeno. Jednalo se především o různé chromozomové translokace, které ústí ve vznik specifických fúzních genů s onkogenním charakterem. Díky klinickým studiím zaměřeným na přežívání a vznik relapsů u jednotlivých skupin AML nesoucích dané mutace byla u některých z nich potvrzena nejen diagnostická, ale i významná prognostická hodnota. V nové klasifikaci Světové zdravotnické organizace (WHO – World Health Organisation) byly již zohledněny i tyto genetické změny. První WHO klasifikace zaměřená na hematologické malignity byla přijata v roce 2001. Byla v ní nově vytvořena skupina AML s rekurentními genetickými abnormalitami, kam byly zařazeny AML nesoucí translokace t(15;17); t(8;21); inv(16) či t(16;16) a fúze postihující gen KMT2A ležící na 11. chromozomu. V revidované klasifikaci z roku 2008 byly doplněny AML nesoucí translokaci t(9;11); t(6;9); inv(3); t(1;22) a jako provizorní jednotky zařazeny AML s mutacemi v genu pro nukleofosmin (NPM1) a CEBPα vyskytující se převážně u AML s normálním karyotypem. Poslední revize proběhla v roce 2016. AML nesoucí bíaleické mutace v genu CEBPα a AML s mutovaným NPM1 byly zařazeny mezi stálé jednotky a nově byly jako provizorní jednotky vyčleněny případy AML s mutacemi v genu RUNX1 a fúzním genem bcr/abl1. Molekulárně cytogeneticky lze přítomnost fúzních genů detekovat pomocí fluorescenční in situ hybridizace (FISH). Molekulární metody však nabízejí vyšší citlivost vhodnou např. pro sledování minimální reziduální nemoci, která je velmi důležitá při hodnocení odpovědi pacienta na podanou léčbu. Molekulární změny je možné sledovat jak kvalitativně, např. pomocí nested RT-PCR, tak i kvantitativně pomocí real time PCR. Metodou přímého sekvenování jsou detekovány mutace v genu CEBPα a fragmentační analýzou 4 nt inzerce v genu NPM1. Práce je podpořena grantem IGA_LF_2017_007.

67.

Richterova transformace CLL - cytologický nálezy atypických lymfocytů periferní krve

Dvořáková Z., Zadrazilová V., Ryznerová P., Juráňová J. (Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc)

Úvod: Chronická lymfocytární leukemie (CLL) je lymfoproliferativní onemocnění charakterizované akumulací monoklonálních zralých CD5+ B lymfocytů v periferní krvi, kostní dřeni a lymfatických orgánech. Jedná se o nejčastější leukémii dospělých, vyskytuje se převážně u starších pacientů, častěji mužů, kde medián věku při diagnóze je 62-72 let. Onemocnění má velmi heterogenní průběh, od indolentní choroby, kdy nemocní žijí bez nutnosti léčby desítky let až po agresivně se chovající maligní onemocnění s poměrně krátkou dobou přežití. K záchytu onemocnění dochází často náhodně při rutinním vyšetření krevního obrazu z jiného důvodu. Je zjištěna lymfocytóza (diagnostický pro CLL je absolutní počet lymfocytů nad $5 \times 10^9/l$). U pokročilých forem nemoci je potom přítomna anémie nebo trombocytopenie. V nátěru periferní krve nacházíme zmožněné uniformní „zralé“ patologické lymfocyty a buněčné (tzv. Gumprechtovy) stíny, což jsou rozetřená jádra fragilních lymfocytů. Ke stanovení diagnózy nemoci slouží metoda průtokové cytometrie, buňky CLL mají charakteristický imunofenotyp. K určení prognózy nemocných se využívá stanovení rekurentních aberací metodou fluorescenční in situ hybridizace (FISH). Jednou z velmi závažných komplikací CLL je Richterova transformace (RT), onemocnění do lymfomu vyššího stupně malignity, nejčastěji do difuzního velkobuněčného lymfomu – tzv. Richterův syndrom (RS). Podezření na RS je vyjádřeno na základě klinického obrazu (celkové zhoršení stavu nemocného, rychlý nárůst velikosti uzlin, teploty), laboratorního nálezu - zvýšení hladiny laktát dehydrogenázy (LDH) a zobrazovacích vyšetření (PET CT). Diagnóza RT je stanovena na základě histologického vyšetření. V naší kazuistice bude demonstrován morfoloogický nálezy patologických lymfocytů v periferní krvi v době transformace nemoci.

Popis případu: Referujeme kazuistiku 69-ti leté ženy, které byla CLL diagnostikována v roce 2014, jednalo se o prognosticky nepříznivou formu nemoci s delecí 17p. Pacientka byla sledována na naší ambulanci. Pro krátký zdvojnásobovací čas leukocytů a zvětšování periferních uzlin byla zahájena v dubnu 2015 terapie režimem RCD (Rituximab, Cyklofosfamid, Dexamethazon). Po šesti cyklech byla dosažena v říjnu 2015 parciální remise onemocnění. Již v červnu 2016 dochází k relapsu onemocnění, nemocná byla pro rizikovitost onemocnění léčena od července 2016 moderní, vysoce účinnou léčbou ibrutinibem. Přechnodně dochází ke zlepšení klinického stavu. Od prosince 2016 se ale objevily rychle narůstající uzliny na krku a v axilách, nemocnou trápí horečky, laboratorně je zvýšena hladina LDH, na PET/CT je vysloveno podezření na transformaci onemocnění. V nátěru periferní krve byly zastiženy atypické buňky (větší lymfocyty, blastického vzhledu, s bohatší

sytější bazofilní cytoplazmou, některé s vakuolizací), také imunofenotypizační vyšetření podporuje diagnózu RT. Klinický stav nemocné se výrazně zhoršuje, byla přijata k hospitalizaci s poruchou vědomí, hyperkalcémií při aktivitě onemocnění, stav je léčebně neovlivnitelný, nemocná v lednu 2017 umírá na projevy RS.

Závěr: Cílem našeho sdělení je upozornit na zajímavý morfoloogický nálezy patologických lymfocytů v nátěru periferní krve pacientky s Richterovým syndromem.

68.

Lymfoproliferativní nádorová onemocnění – dvě kazuistiky pacientů s hyperleukocytózou

Dynterová A., Fátorová I., Rydvalová D., Podaná M. (IV. interní hematologická klinika, FN, Hradec Králové)

Lymfoproliferativní stavy tvoří velkou heterogenní skupinu maligních nádorových onemocnění a tvoří nejčastější skupinu hematologických malignit. Incidence výskytu bývá cca 25 nových případů na 100 000 obyvatel za rok. Dle WHO klasifikace se dělí do dvou skupin, na lymfoproliferace vycházející z vývojové řady B- nebo T-lymfocytů. Další dělení se provádí podle stupně zralosti buněk nádorové masy na lymfoproliferace z prekurzorových buněk (akutní lymfoblastické leukemie - ALL) nebo na lymfoproliferace ze zralých lymfocytů (lymfomy), přičemž ALL bývají častější u dětí a lymfomy jsou onemocněním osob převážně staršího věku. Zvláštní kategorií zůstává Hodgkinův lymfom, který je charakterizován histologickým průkazem buněk Reedov-Sternberga v uzlinách. Protože se jedná o malignity postihující lymfoidní řadu na různém stupni vývoje, bývá i manifestace jednotlivých typů lymfoproliferací různá. Postiženy mohou být primární lymfatické orgány (kostní dřevě a thymus) a/nebo sekundární lymfatické orgány (mízní uzliny a slezina). Ojedinele se může onemocnění manifestovat i v neobvyklé lokalizaci. Diagnostika lymfoproliferací je založena na komplexním klinickém a laboratorním vyšetření. Laboratorně se provádí cytologické a histologické vyšetření kostní dřevě, případně uzliny, zásadní význam pro zařazení má imunofenotypizace. Cytogenetické a molekulárně genetické testy jsou důležité pro stanovení prognózy konkrétního onemocnění. U některých stavů, kdy se maligní populace lymfoidních buněk masivně vyplavuje do periferní krve (např. u chronické lymfocytární leukemie), stačí provést cytologické a imunofenotypizační vyšetření z tohoto odběru. Vzhledem k patogenetice a povaze nádorových buněk je v některých případech obtížné vést hranici mezi leukemií a lymfomem, to platí zejména pro akutní lymfoblastickou leukemii a lymfoblastický lymfom a pro chronickou lymfocytární leukemii a lymfom z malých lymfocytů. Na dvou kazuistikách pacientů s hyperleukocytózou (vstupní počet leukocytů byl 800, resp. 1100 x 10^{9/l}), kteří byli vyšetřeni ve stejný den v ambulanci IV. interní hematologické kliniky FN HK, budeme prezentovat záchyt různých lymfoproliferativních onemocnění. Po kompletaci klinických i laboratorních nálezů byla u prvního pacienta diagnostikována chronická lymfocytární leukemie a u druhého B-prolymfocytární leukemie.

69.

Downův syndrom a jeho význam pro laboratorní pracovníky v hematologii

Kolařík L., Zúňová H., Hochová I., Vodičková E., Polenová M. (OKH, FN Motol, Praha; ÚBLG FN Motol, Praha)

Downův syndrom patří mezi geneticky podmíněné onemocnění s pestrými zdravotními komplikacemi. Onemocnění je způsobeno poruchami chromozomu 21. V dětské hematologii je potřeba na toto onemocnění myslet v souvislosti s vyšším výskytem hematologických malignit. U 10% dětí s Downovým syndromem můžeme pozorovat transienční myeloproliferativní nemoc, čtenější výskyt myelodysplastického syndromu a akutní myeloidní leukémie, kdy je riziko vzniku až 56x vyšší než u dítěte bez Downova syndromu. Morfoloogické odlišení akutní myeloidní leukémie u Downova syndromu od akutní myeloidní leukémie u pacienta bez Downova syndromu není možné. Odlišnosti v patologických buňkách nám ukáží metody molekulárně genetické a imunologické. V patologických buňkách se vyskytuje mutace genu GATA1 a snížená množství anti-apoptických molekul např. BCL 2 a HSP70. Pro přesné stanovení diagnózy je důležitá mezioborová spolupráce.

70.

Rozlišení zralých CD5+ B-lymfoidních neoplázií založené na analýze vícebarevné průtokové imunotypizace (MFI) informativních markerů imunofenotypu

Starostka D., Kriegová E., Kudělka M., Mikula P., Zehnalová Š., Radvanský M., Koláček D., Chasáková K., Taliánová H. (Oddělení klinické hematologie, Nemocnice s poliklinikou Havířov, p. o., Havířov; Ústav imunologie LF UP a FN, Olomouc; Fakulta elektrotechniky a informatiky VŠB-TUO, Ostrava)

Úvod: Standardní hodnocení imunofenotypu v diagnostice zralých CD5+ B-lymfoidních neoplázií je kvalitativní či semikvantitativní. Údaje o klinickém využití kvantitativního hodnocení expresního profilu imunofenotypu těchto nemocí jsou omezené. Cílem studie bylo srovnání diagnostického přínosu kvantitativního hodnocení intenzity exprese diagnostických znaků založené na jejich průměrné fluorescenční intenzitě (MFI) s kvalitativním hodnocením exprese.

Metodika: Imunofenotyp neoplastické populace byl stanoven v diagnostických vzorcích od 199 pacientů s CD5+ B-lymfoidními neopláziemi (CLL/SLL, MCL a CD5+ MZL). S využitím průtokového cytometru BD FACS Canto II a klinického software FACS Diva byla analyzována povrchová exprese znaků CD5, CD19, CD20, CD22, CD79b, CD23, FMC7, CD10, CD25, CD35, CD38, CD43, CD11c, CD95, CD103, CD200 a lehkých řetězců imunoglobulinů kappa a lambda. Intenzita exprese byla hodnocena jako pozitivní/negativní a kvantitativně pomocí MFI a vyhodnocena pomocí bioinformatických metod.

Výsledky: Nejinformativnější faktory při rozlišení CLL/SLL, MCL a CD5+ MZL představuje intenzita exprese (MFI) markerů CD79b, CD23, CD43, CD38, CD11c, FMC7, CD200 a lehkých řetězců kappa a zejména pak jejich kombinace. S jejich pomocí bylo možno spolehlivě odlišit CLL od MCL i CD5+ MZL, a to včetně atypických případů. Přestože kvantitativní analýza exprese použitým panelem markerů výrazně zpřesnila odlišení MCL a CD5+ MZL v porovnání se standardním hodnocením pozitivita/negativita, uvedený panel znaků neumožnil dokonalé rozlišení těchto neoplázií. Přehlednou vizualizaci expresního imunofenotypového profilu umožnila konstrukce datových sítí.

Závěry: Naše data potvrdila, že kvantifikace exprese informativních markerů zvyšuje u zralých CD5+ B-lymfoidních neoplázií diagnostický přínos imunofenotypizace v porovnání s kvalitativním (pozitivita/negativita) či semikvantitativním hodnocením. Rutinní použití kvantitativního hodnocení expresního profilu vyžaduje konstrukci matematických modelů, jejichž velkou výhodou je minimalizace subjektivity hodnocení na expertní bázi.

Grantová podpora: MZ ČR VES16-32339A

71.

Doporučené postupy pro vysoce sensitivní a přesnou detekci PNH klonů metodou průtokové cytometrie

Marinov I. (Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha)

Paroxysmální noční hemoglobinurie (PNH) je X-vázané onemocnění způsobené jednou či více získanými mutacemi v genech podílejících se na syntéze GPI kotvy. Následkem těchto mutací vznikají hematopoetické kmenové buňky s částečnou nebo úplnou ztrátou GPI vázaných proteinů. U pacientů s aplastickou anémií (AA), hypoplastickou formou myelodysplastického syndromu (MDS) a subklinické formy PNH lze detekovat minoritní PNH populaci (<1%), přítomnost minoritního klonu tvoří až 40% všech PNH pozitivních případů. V současné době finalizuje příprava nových ICCS/ESCCA doporučených postupů pro vysoce sensitivní a přesnou detekci PNH klonů metodou průtokové cytometrie. Důraz je kladen na validaci pre-analytických, analytických a post-analytických požadavků vyšetření. Současný stav problematiky a hlavní body nastávajících guidelines budou obsahem následující prezentace.

72.

K velikosti jádérka a jádra v lymfocytech nemocných s B – chronickou lymfatickou leukémií (CLL)

Smetana K., Karban J., Trněný M. (Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha; 1. Interní klinika 1. Lékařské fakulty UK, Praha)

Je obecně známo, že maturace (terminální diferenciací) krevních buněk je doprovázena zmenšováním buněčného jádra a jádérka. Vztah velikosti jádra a jádérka nebyl však uspokojivě definován. Proto byla studována velikost jaderné oblasti obsahující jádérkové tělo (jadérko bez perinukleolárního heterochromatinu). Jednoduchá cytochemická metoda pro zobrazení RNA umožnila sledovat tělo jádérka i obrys jádra a vypočítat hodnoty jejich průměrů. Nezralé a zralé lymfocyty periferní krve nemocných s CLL se ukázaly vhodným modelem pro jejich dostatečný počet pro měření průměru těl jáderek i jader na úrovni jedné buňky. Pomocí počítačové úpravy a měření bylo zjištěno, že během zrání lymfocytů dochází i k redukci velikosti jaderné oblasti obsahující jádérkové tělo. Vypočtený poměr pak se ukázal být velmi stabilní pro jednotlivá stadia zrání lymfocytů u neléčených nemocných v době odběru vzorků krve pro tuto studii. V protikladu k publikovaným změnám jáderek po působení různých léků, se však tento poměr v periferní krvi nemocných s CLL léčených fludarabinem nemění. Jediná změna byla pozorována v terminálních lymfocytech obsahujících mikronukleoly jako jediný nukleolární typ. Studie byla podpořena fondem Ústavu hematologie a krevní transfuze.

73.

Lymfocytózy z pohledu morfologické laboratoře

Šimečková R., Mikulenková D., Campř V. (Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha; Morfologicko-cytochemická laboratoř ÚHK, Praha; Ústav patologie a molekulární medicíny při 2. LF, Praha)

Jako lymfocytózu označujeme zvýšený počet (relativní, absolutní) lymfoidních buněk pro daný věk a pohlaví. Příčin toho stavu je mnoho, mohou mít reaktivní charakter (virové, bakteriální infekce, autoimunitní choroby), ale může se jednat i o hematologické onemocnění. U některých onemocnění je morfologie lymfocytů typická. Průkaz klonality (patologický imunofenotyp, molekulárně genetické vyšetření) a histologické vyšetření aspirátu kostní dřeně či tkáně (lymfatická uzlina, slezina, aj.) je pro stanovení diagnózy zásadní. Vyšetření nátěru periferní krve či aspirátu kostní dřeně může upozornit na možnost přítomnosti lymfoproliferativního onemocnění, na jeho přechod do agresivnější formy, či umožní cíleně zaměřit vyšetření imunofenotypu patologických lymfocytů.

MNOHOČETNÝ MYELOM 1

74.

Léčebná strategie u mnohočetného myelomu v roce 2017 nemůže být složena jen z léků hrazených zdravotními pojišťovnami

Hájek R. (Klinika hematologie, Fakultní nemocnice Ostrava, Ostrava – Poruba; Česká myelomová skupina a myelomová sekce ČHS)

Mnohočetný myelom je ukázkovým příkladem překotného zavádění účinných léků do klinické praxe. Zatímco americký systém regulace směřuje nových léků dokáže vstřebat, konzervativní a ekonomicky méně silné Evropě to jde jen velmi obtížně. Více léků znamená více léčebných možností. Je zásadním posunem v léčebné strategii, pokud můžete daný léčebný postup u určité skupiny nemocných zastavit pro malou účinnost a nahradit jej jiným. Šance na nalezení účinného postupu s pozitivním dopadem na prognózu nemocných se tak zvyšuje u nemocných v primoléčbě na 100%, v prvním relapsu na 90% a ve 2-3 relapsu na více než 75%. Správné poskládání léčebné strategie je jistě omezeno realitou, tedy úhradou léku od zdravotních pojišťoven. Každý nemocný má však ze zákona právo být informován o optimálním postupu, třebaže jeho dostupnost je limitovaná pro většinu nemocných. Ne na lékaři, ale na daném nemocném je, zda limitující postup akceptuje. V jiném případě se lékař vyvíjí zásadnímu střetu se zákonem a dobrovolně a možná nevědomě na sebe přenáší související ekonomická rozhodování, která mu však nepřísluší. Vstupní zvolené léčebné strategie by tedy měla obsahovat jak optimální postup, tak reálné hrazené léčebné postupy v daném čase.

Nové guidelines pro diagnostiku mnohočetného myelomu

Maisnar V., Minařík J., Hájek R. (IV. interní hematologická klinika, Hradec Králové; Hemato-onkologická klinika FN a LF UP, Olomouc; Klinika hematatoonkologie FN a LF Ostravské Univerzity, Ostrava)

V průběhu tohoto roku budou vydána další Guidelines pro diagnostiku a léčbu mnohočetného myelomu. Cílem našeho sdělení je rekapitulace novinek v jejich diagnostické části při srovnání s posledním vydáním Guidelines v roce 2012. Mezinárodní myelomová pracovní skupina (IMWG) vydala aktualizovaná kritéria pro stanovení diagnózy mnohočetného myelomu Již koncem roku 2014. Úpravu do té doby platných kritérií z roku 2003 si vyžádaly zejména další pokroky v léčbě mnohočetného myelomu, dále průkaz přínosu nových zobrazovacích technik u MM a snaha zabránit poškození organismu v rámci asymptomatické fáze onemocnění při identifikaci nových rizikových faktorů. Ke změně došlo již v názvosloví, když symptomatický mnohočetný myelom nahradil pojem mnohočetný myelom a asymptomatický mnohočetný myelom se vrátil k původnímu názvu doutnajícího („smoldering“) mnohočetného myelomu. Ve snaze zabránit poškození organismu bylo v rámci dosud platných CRAB kritérií doplněno k dosavadnímu posouzení renální insuficience pomocí koncentrace sérového kreatininu ještě stanovení kreatininové clearance. Tu je možné stanovit jak klasickým měřením, tak pomocí validovaného výpočtu. Ze stejného důvodu byla nově do diagnostických kritérií zařazena možnost průkazu kostního postižení pomocí moderních metod, kromě dosud standardního rtg zobrazení lze dnes využít CT, CT/PET i MRI. V rámci sledování nemocných s doutnajícím („smoldering“; dříve asymptomatickým) MM byly nově identifikovány 3 rizikové faktory, jejichž identifikace znamená pro nemocné jejich časnou progresi do symptomatické formy onemocnění a opravňují tak u nich zahájení léčby. Zde se významně prosadily výsledky randomizované studie španělských autorů, které prokázaly prodloužení celkového přežití při časném zahájení léčby u nemocných s doutnajícím MM a vedly tak k oprávnění léčby nemocných s vysoce rizikovým „smoldering“ MM. Za takové nemocné jsou tedy nově považováni nemocní s více jak 60% klonálních plazmatických buněk v kostní dřeni, s poměrem postižených/ nepostiženým volným řetězcům v séru ≥ 100 a více jak jedním ložiskem skeletu větším než 5 mm při vyšetření pomocí MRI. Novým diagnostickým kritériím MM byla přizpůsobena i kritéria jeho doutnající („smoldering“) formy.

Profylaxe tromboembolické nemoci u pacientů s mnohočetným myelomem

Kessler P. (Odd. hematologie a transfuziologie, Nemocnice Pelhřimov, Pelhřimov)

Mnohočetný myelom (MM) je provázen zvýšeným rizikem tromboembolické nemoci (TEN). Podle přítomnosti rizikových faktorů je možno pacienty rozdělit do 4 skupin: Vysoké riziko: a) Primoléčba obsahující kombinaci thalidomidu, lenalidomidu ≥ 15 mg/den nebo anthracyklinu s vysokodávkovanými kortikoidy. b) Pacienti s anamnézou TEN. Doporučen nízkomolekulární heparin (LMWH) v profylaktické nebo intermediární dávce. Vyšší střední riziko: a) Primoléčba obsahující kombinaci thalidomidu, lenalidomidu, pomalidomidu nebo anthracyklinu s nízkodávkovanými kortikoidy. b) Léčba relapsu kombinací thalidomidu, lenalidomidu v dávce ≥ 15 mg/den nebo anthracyklinu s vysokodávkovanými kortikoidy. Doporučen LMWH v profylaktické dávce. Pacienti bez dalších rizikových faktorů TEN lze po dosažení parciální remise převést na acetylsalicylovou kyselinu (ASA) 100 mg denně nebo warfarin v terapeutické dávce. Nižší střední riziko: a) Léčba relapsu kombinací thalidomidu, lenalidomidu nebo pomalidomidu s nízkou dávkou kortikoidů. b) Indukční nebo udržovací léčba kombinací lenalidomidu 10 mg s nízkou dávkou kortikoidů. c) Monoterapie thalidomidem, lenalidomidem 10 mg, pomalidomidem nebo vysokodávkovaným dexametazonem. Doporučena je ASA 100 mg denně u osob s ≤ 1 rizikovým faktorem TEN. LMWH v profylaktické dávce preferován při nakupení rizikových faktorů TEN, je však možno ho použít i u osob bez dalších rizikových faktorů TEN. Nízké riziko: Léčba neobsahující thalidomid, lenalidomid, pomalidomid nebo kombinaci anthracyklinu s vysokodávkovaným dexametazonem. Doporučena jsou fyzikální opatření. Speciální postup je třeba volit u dalších specifických skupin pacientů: Při dlouhodobé léčbě warfarinem pro umělou chlopenní náhradu nebo pro fibrilaci síní (FS) je doporučeno pokračovat v léčbě warfarinem. Při nemožnosti dosáhnout stabilní hodnoty INR je možno pacienta s umělou chlopni převést na LMWH s cílem dosažení hodnoty aXa 1,0-1,2 aXaIU/ml. Pacienta s FS je možno převést na dabigatran, rivaroxaban nebo apixaban, při

kontraindikaci těchto léků je možnou alternativou LMWH s cílem dosažení hodnoty aXa 0,6-1,0 aXaIU/ml. Pacienti, léčené dlouhodobě warfarinem pro předchozí TEN je vhodné během indukční terapie MM převést na LMWH (Clexane, Fraxiparin, Fragmin) v dávce 100 IU/kg 1x denně s.c. U pacientů léčených pro FS dabigatranem, rivaroxabanem nebo apixabanem je navrženo tuto medikaci během léčby MM ponechat, tyto léky však nejsou vhodné pro pacienty, u nichž došlo k poklesu renálních funkcí. U pacientů užívajících dlouhodobě protidestičkové léky z důvodu sekundární prevence arteriální trombózy je doporučeno pokračovat v této léčbě i během léčby MM. V případě vysokého nebo vyššího středního rizika TEN je navrženo tuto léčbu kombinovat s profylaktickou dávkou LMWH. U pacientů hospitalizovaných z důvodu imobilizace nebo akutních interních komplikací je indikována profylaxe LMWH v profylaktické dávce.

Pomalidomid is more effective in real clinical practice than in randomized trial – an observational study of the Czech Myeloma Group

Pour L., Brožova L., Špička I., Maisnar V., Minařík J., Gregora E., Jungova A., Hájek R. (IHOK, FN, Brno; IBA, Masarykova univerzita, Brno; I. interní klinika, 1. LF UK, Praha; IV. interní klinika LF UK, Hradec Králové; Hematoonkologická klinika, FN a LF UP, Olomouc; Hematologická klinika FNKV, Praha; Klinika hematologie LF UK Plzeň, Hematologická klinika LF, Ostrava)

The combination of pomalidomide and low-dose dexamethasone (Pom-Dex) is a perspective option for patients with end-stage relapsed/refractory multiple myeloma (RRMM). We analyzed efficacy and toxicity of Pom-Dex in all patients from the Czech Republic treated from 2013 to 2016. METHODS and patients characteristics: Patients were eligible if they had been diagnosed with RRMM and had failed at least two previous treatments of bortezomib and lenalidomide. They were treated with start dose of Pom (4 mg/day on days 1-21, orally) plus low-dose dexamethasone (40 mg/day on days 1, 8, 15, and 22, orally) until disease progression or unacceptable toxicity. We analyzed TTP and OS together with toxicity. Also, univariate Cox proportional hazards model for OS was done for standard risk factors. One hundred and twenty-two patients with median age of 67 treated with Pom-Dex were evaluated. Median follow-up was 8.7 months. Median of previous treatment lines was 4. RESULTS: Median TTP of Pom-Dex treatment was 7.1 months (95% CI 5.3-8.6). Median OS was 19.0 months (95% CI 13.2-25.8). The most common grade 3-4 adverse events were neutropenia in 44%, anemia in 22% and thrombocytopenia in 24% of patients. Grade 3-4 infection were observed in 10% of patients. Patients with ECOG worse than 2, B2microglobulin higher than 5, ISS stage 3, low hemoglobin, low platelet count and presenting extramedullary mass had worse OS according to univariate Cox proportional hazards model. Our analyses show that Pom-Dex treatment of Czech RRMM patients is effective, well tolerated and had better results than the registration study. Performance status and tumor burden seem to be main prognostic factors according to our model. Thus, our suggestion for clinical practice is to start pomalidomide treatment as soon as possible in case of MM relapse.

CYTOPENIE**Paroxysmální noční hemoglobinurie (PNH) v České republice – údaje z mezinárodního PNH registru**

Čermák J., Červinek L., Steinerová K., Bělohávková P., Rohoň P. (Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha; Interní hematologická a onkologická klinika FN, Brno; Hematologicko-onkologické oddělení FN, Plzeň; IV. interní hematologická klinika FN, Hradec Králové; Hemato-onkologická klinika FN, Olomouc)

Mezinárodní PNH registr (International PNH registry) shromažďuje klinické a laboratorní údaje o nemocných s PNH z 20 evropských a 10 dalších zemí z celého světa. Česká republika poskytla do registru do současnosti data o 70 nemocných s PNH (ÚHKT – 32, FN Brno – 22, FN Plzeň – 7, FN Hradec Králové – 6, FN Olomouc – 3), což odpovídá incidenci onemocnění 0,7/100.000 obyvatel. Průměrný věk nemocných činil 40,3 roku, do registru bylo zadáno 37 mužů a 33 žen. U 24 nemocných byla přítomna těžká hemolýza, průměrný počet CD59 kompletně deficitních

erytrocytů (RBC) byl v této skupině 40,2 %. U 16 nemocných, vesměs s komplikujícími faktory (trombóza, renální insuficience, septické infekty) byla zahájena léčba eculizumabem, 2 nemocní byli zařazeni do studie s novým inhibitorem komplementu, u 2 nemocných byla provedena alogenní transplantace krvetvorných buněk (alloSCT). U 12 nemocných byla přítomna mírná až středně těžká chronická hemolyza bez dalších komplikací, počet CD59 deficitních RBC byl v průměru 22,4%. Polovina těchto nemocných byla léčena kombinací kortikosteroidů s CS-A, u 3 nemocných vznikla PNH rozvojem z aplastické anemie (AA) léčené kombinovanou imunosupresí. Další 12 nemocných mělo známky intermitentní minimální hemolýzy s 4,4% CD59 deficitních RBC v průměru, třetina z nich dostávala imunosupresiva, ostatní nebyli léčeni. Hypoplastická forma PNH byla přítomna u 12 nemocných, průměrný počet CD59 deficitních RBC byl 2,6%, 7 nemocných bylo léčeno podáním anti-thymocytárního globulinu (ATG), u 6 nemocných byla provedena alloSCT. U 10 nemocných byl přítomen minimální PNH klon s průměrem 0,8% CD59 deficitních RBC, u 3 z nich se PNH klon objevil v různě dlouhé době po léčbě aplastické anemie kombinovanou imunosupresí s ATG. Údaje z PNH registru představují efektivní nástroj ke sledování přirozeného průběhu choroby a k určení optimální léčebné strategie včetně indikace nákladné biologické léčby.

79.

Anémia u starších lidí

Nosál M., Stecová A., Gáboríková M., Luha J., Holub D., Bátorová A. (Univerzitná nemocnica Bratislava, Nemocnica Staré Město, Bratislava – SK; KHaT-LFUK, UNB, SZU, Bratislava – SK; Medirex s.r.o., Bratislava – SK; Ústav biológie a genetiky LFUK, UNB, Bratislava – SK; Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta UP, Olomouc)

Úvod: Anémia prevládá v starší populácii, najmä v zariadeniach dlhodobej starostlivosti a geriatrických oddeleniach. Dokonca aj mierna anémia je spojená s nepriaznivými zdravotnými následkami. Aj keď stárnutie je považované za prispievajúci faktor, pátranie po príčine musí byť vždy dôkladné. Najčastejšími etiologickými príčinami anémie u starších osôb sú anémia chronických ochorení / zápal; deficit železa, kyseliny listovej a kobalamínu; a myelodysplastický syndróm. Súčasne je často prítomných viac príčin, anémia v staršom veku je multifaktoriálna. Diagnostické spracovanie je priamočiare, nie je príliš invazívne a malo by byť vykonané systémove. Nedostatok vitamínov vyžaduje kompletné vyšetrenie a liečbu. Pri anémii chronických ochorení / pri zápalе v ideálnom prípade je potrebná liečba ochorenia, ktoré spôsobuje tento typ anémie. Ak sa glomerulárna filtrácia výrazne zníži, mal by sa podať erytropoetin. Väčšina prípadov s myelodysplastickým syndrómom bude mať prospech z podpornej starostlivosti, ale špecifická podskupina (MDS 5q-) reaguje veľmi dobre na orálne analógy thalidomidu. Všeobecne je potrebné sa vyhnúť zbytočným transfúziám. Zmeny v metabolizme železa sú významné, zaznamenávajú sa zmeny v nízkomolekulovom regulačnom proteíne metabolizmu železa – hepcidine.

Ciel: našim cieľom bolo zistiť ako sa chová metabolizmus železa a hepcidin u pacientov seniorov s anémiou z nedostatku železa a anémiou chronických chorôb.

Metóda: vyšetrili sme pacientov seniorov nad 65 rokov s diagnózami sideropenická anémia a anémia chronických chorôb (ACD). Tieto skupiny sme porovnali s kontrolnou skupinou tejto vekovej kategórie bez sideropenickej anémie a ACD. Vyšetřili sme 9 kontrol, 5 s anémiou z nedostatku železa a 16 pacientov s ACD. Vyšetřili sme následujúce parametre: kompletný krvný obraz, parametre metabolizmu železa - FeS, Feritin, Trf., sat. Trf., solub. Trf. Rec., index solub. Trfrec./log. Feritin, Hpcidin HPLC a Elisa, IL-6, CRP, Epo. Výsledky laboratorných vyšetření boli testované nepárovým T-testom a Mann-Whitney testom.

Výsledky: uvádzame niektoré štatisticky významné hodnoty: Kontrola-Anémia: s Trfrec. $p < 0,006$, Hpcidin Elisa $p < 0,031$, Index $p < 0,006$, Epo $p < 0,034$, Hgbp $p < 0,003$, MCV $p < 0,003$. Kontrola-ACD: CRP $p < 0,003$, IL-6p $p < 0,001$, Epop $p < 0,004$, Eryp $p < 0,000$, Hgbp $p < 0,000$. Ostatné hodnoty uvedieme v prezentácii.

Záver: vzhľadom na to, že v kategórii starších pacientov (malý počet), zaznamenali sme niektoré štatisticky významné laboratorné výsledky. Poukazuje to na multifaktoriálnu príčinu anémie v tejto vekovej kategórii. Mnohokrás je obtiažne zaradiť pacientov do správnej skupiny anémie.

Podakovanie: pani Oľge Aujeskej laborantke Medirex s.r.o.

80.

Celoexomové sekvenování u děti s imunitní cypopenií: aplikace a klinický dopad

Svatoň M., Kanderová V., Smešek P., Suková M., Šrámková L., Kayserová J., Stuchlý J., Žaliová M., Freiburger T., Elbllová L., Průhová Š., Vičková M., Pospíšilová D., Blatný J., Procházková D., Mejstříková E., Kalina T., Sedivá A., Starý J., Trka J., Froňková E. (Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol, Praha; Ústav imunologie 2. LF UK a FN Motol, Praha; Ústav klinické imunologie a alergologie, Lékařská fakulta, Masarykova Univerzita, Brno; Pediatrická klinika 2. LF UK a FN Motol, Praha; Ústav biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN Motol, Praha; Dětská klinika, FN, Olomouc; Oddělení dětské hematologie, FN, Brno; Dětská klinika, Masarykova nemocnice v Ústí nad Labem, Krajská zdravotní a.s., Ústí nad Labem)

Úvod: Sekvenování nové generace se stává hlavní diagnostickou metodou geneticky podmíněných onemocnění. Zároveň s identifikací nových patogenních variant a kauzálních genů je dalším důležitým záměrem zhodnotit efektivitu celoexomového sekvenování (WES) a jeho využitelnost v rutinní klinické praxi.

Cíle: Naším cílem bylo zhodnotit přínos a úskalí WES jako diagnostické metody u skupiny pacientů trpících imunitní cypopenií, autoimunitní hemolytickou anémií (AIHA), idiopatickou trombocytopenickou purpurou (ITP) a imunitní neutropenií, anebo kombinací těchto onemocnění (Evansův syndrom). Většina těchto pacientů měla další symptomy imunitní dysregulace včetně běžného kombinovaného imunodeficitu (CVID), lymfoproliferace a autoimunitních onemocnění (diabetes mellitus 1. typu, autoimunitní tyreoiditida). Metody Provedli jsme celoexomové sekvenování u 30 pacientů (věk 0-39 let) po vyšetření klinickým genetikem. Sekvenovační knihovny byly připraveny pomocí Agilent SureSelectXT Human All Exon V5/6+UTR kitu a sekvenovány na přístroji Illumina NextSeq 500 s výsledným průměrným pokrytím alespoň 30x. Výsledky U 10 pacientů (33%) jsme byli schopni identifikovat pravděpodobné kauzální varianty onemocnění. 3 pacienti (sourozenci) byli heterozygoti pro dříve nepopsanou variantu v genu CTLA4, vedoucí k CTLA4 deficitu. Další novou variantu v tomto genu jsme identifikovali i u jiné pacientky současně s další patogenní variantou v genu TSC1, vedoucí ke kombinovanému fenotypu s tuberozní sklerózou. Molekulární diagnóza CTLA4 deficitu umožnila nasadit léčbu analogem CTLA4 (Abatacept) u jednoho z pacientů. U jednoho pacienta jsme identifikovali variantu vedoucí k aktivaci molekuly STAT3, která byla nedávno popsána u syndromu imunitní dysregulace. U 3 pacientů jsme našli varianty v genech typicky popsanych u protilátkových deficitů (TACI, CD40L, IKBKKG). U 1 pacienta s chronickou AIHA a ITP byla nalezena varianta v genu TERT, mutovaným u dyskeratosis congenita. 1 pacient s mnohočetnými vývojovými vadami a Evansovým syndromem byl heterozygot pro variantu v genu KMT2D, způsobující syndrom Kabuki. Diagnostika ostatních pacientů byla obtížná. U 4 z nich jsme našli varianty v genech, které jsou popsány u syndromů imunitní dysregulace, ale vyskytují se v menší míře také u zdravých jedinců (CASP10, PIK3CD). 12 pacientů (36%) neslo pouze heterozygotní mutaci v genech spojených s autosomálně recesivním onemocněním (např. ITK, LRBA), nebo jsme u nich zatím nenašli žádnou relevantní aberaci. U 4 pacientů jsme identifikovali nové varianty v genech, které hrají důležitou roli v imunitní regulaci, ale prokázání jejich patogenity vyžaduje rozsáhlé validační studie s použitím primárních buněk pacientů nebo pomocí genetické modifikace existujících buněčných či zvířecích modelů.

Záver: WES je velmi vhodná metoda, která umožňuje identifikaci genetické příčiny onemocnění zhruba u jedné třetiny pacientů a umožňuje cílenou terapii. Přesto, že cílené sekvenování genových panelů snižuje náklady na vyšetření a zjednodušuje analýzu výsledků, panely se rychle stávají zastaralými, jelikož na poli primárních imunodeficitů dochází velmi rychle k objevům nových kauzálních genů a jejich mutací. Vzhledem k heterogenitě genetických příčin imunitních cypopenií a syndromů imunitní dysregulace doporučujeme využití WES před cíleným sekvenováním jednotlivých genů. Podpora: NV15-30626A, 16-32568A, P302/12/G101.

81.

Kontroverze v hematologii: splenektomie u ITP – pro a proti

Hluší A., Červinek L., Kozák T., Pospíšilová D. (Hemato-onkologická klinika, LF UP a FN, Olomouc; Interní hematologická a onkologická klinika LF MU a FN, Brno; Interní hematologická klinika 3. LF a FN Královské Vinohrady, Praha; Dětská klinika LF UP a FN, Olomouc)

Úvod: Splenektomie (SE) představuje nejstarší léčebnou metodu používanou u pacientů s imunitní trombocytopenií. V současnosti je indikována jako možnost 2. nebo vyšší léčebné linie, zvláště u pacientů s chronickou formou onemocnění. V posledních 15 letech indikací SE ubývá. Příčinou jsou lepší terapeutické možnosti u ITP, širší povědomí o možných rizicích výkonu a následné asplenie i častější neochota pacientů podstoupit ireverzibilní chirurgický zákrok. Argumenty podporující splenektomii: kurativní léčebná metoda, nejvyšší podíl léčebných odpovědí v porovnání s dalšími modalitami (celková odpověď 88%, setrvalá 66%), dlouhodobé zkušenosti, dobře známa rizika a možnosti jejich prevence, vyšší bezpečnost laparoskopického přístupu, proveditelnost i v graviditě, ekonomická výhodnost. Argumenty proti splenektomii: ireverzibilní chirurgický zákrok odstraňující „zdravý orgán“, přítomnost perioperačního rizika mortality a morbidit, dlouhodobé riziko infekčních a trombotických komplikací, dostupnost alternativy k výkonu. Kumulativní incidence sepse u pacientů po SE je vyšší než u nesplenektomovaných nemocných s ITP (11,1% vs 10,1%), týká se časného i pozdního období po SE, u komorbidních pacientů riziko dále narůstá. U pacientů po SE je vyšší riziko žilních tromboembolických komplikací (viscerální i periferní oblasti).

Závěr: Splenektomie je nejstarší, ale stále neúčinnější léčebnou metodou u pacientů s chronickou ITP s vysokým kurativním potenciálem. Indikována je jako léčebná modalita 2. a vyšší linie. Z charakteru metody vyplývá nevratný charakter operačního výkonu, který je pro část pacientů důvodem k nesouhlasu s touto léčebnou modalitou. Vzhledem ke známým i potenciálním rizikům SE je při zvažování indikace nutné důsledné individuální komplexní zhodnocení rizikových faktorů spojených s onemocněním, operačním výkonem, komorbiditou, ale i aspektů případné nechirurgické léčby ITP a samozřejmě preferencí pacienta. Strategická pozice splenektomie v léčbě dětských pacientů s chronickou ITP je odlišná od dospělých. SE je u dětí třeba velmi pečlivě zvažovat v kontextu s uvedenými riziky a s reálnou možností dosažení spontánní remise choroby i několik let po stanovení diagnózy. Je indikována zásadně po 5. roce života a obvykle až po delší době trvání nemoci než je tomu u dospělých pacientů. Některá rizika spojená se SE jsou preventabilní. Prevence postsplenektomických infekcí by měla být samozřejmostí, stejně jako příp. prolongovaná prevence tromboembolické choroby po výkonu. Významnou roli v krátkodobých komplikacích operačního zákroku hraje zkušenost chirurgického týmu a taktika operačního zákroku. Indikace k SE u pacientů s ITP by měla být stanovena hematologem se zkušenostmi v uvedené problematice, na pracovišti s možností zajištění příslušné prevence, správné edukace pacienta a případného rychlého řešení ev. komplikací.

MNOHOČETNÝ MYELOM 2

82.

Indukční léčba na bázi bortezomibu pro nemocné s mnohočetným myelomem nevhodné k autologní transplantaci kostní dřevě: retrospektivní multicentrická analýza v České republice
Sandická V., Pour L., Straub J., Ščudla V., Maisnar V., Walterová L., Gregora E., Adam Z., Krejčí M., Štork M., Jarkovský J., Brožová L., Ševčíková S., Hájek R. (IHOK, FN, Brno; Interní klinika, VFN, Praha; Hemato-onkologická klinika FN, Olomouc; Oddělení klinické hematologie, FN, Hradec Králové; Oddělení klinické hematologie, Nemocnice, Liberec; Oddělení klinické hematologie, FN KV, Praha; Institut biostatistiky a analýzy, Lékařská fakulta Masarykove Univerzity, Brno; Oddělení patofyziologie při Lékařské fakultě Masarykove univerzity, Brno; CMG, Oddělení klinické hematologie, FN, Ostrava)

Úvod: Bortezomib (Velcade)- lék ze skupiny inhibitorů proteasomů, patří mezi neúčinnější léky v léčbě nově diagnostikovaných i předléčených nemocných s mnohočetným myelomem (MM). Tato retrospektivní analýza shrnuje zkušenosti s léčbou režimy na bázi bortezomibu u nemocných s nově diagnostikovaným MM, kteří nejsou vhodní k podstoupení autologní transplantace kostní dřevě.

Pacienti a metody: Od června roku 2005 do ledna roku 2017 bylo v České republice bortezomibem léčeno 1293 nemocných. Do statistické analýzy bylo zahrnuto 61.4% (794/1293) nemocných. Z analýzy bylo vyřazeno 20.7% nemocných pro přerušení léčebného režimu z jiného důvodu než progresi, 13.7% nemocných pro nekompletní údaje stran počtu léčebných cyklů, 6.1% nemocných pro změnu léčebného režimu a 2.4% nemocných pro nejasnou dobu sledování. Medián doby sledování od zahájení léčby byl 23.2 měsíců (1.5- 129.0). Průměrný věk v čase zahájení terapie byl 70 let. Z celkového souboru bylo 82% (651/794) léčených trojkombinačními režimy. Průměrný

počet podaných cyklů bortezomibu byl 8 (4.0- 12.0); průměrná jednorázová dávka byla 2,3 mg. Léčebné odpovědi byly hodnoceny dle IMWG kritérií z roku 2014.

Výsledky: Bez ohledu na typ použitého režimu bylo celkové léčebné odpovědi (ORR) dosaženo u 69.2% (478/691) nemocných, z toho velmi dobré parciální remise (VGPR) bylo dosaženo u 34.7% (240/691) a kompletní remise (CR) u 9.4% (64/691) nemocných. Srovnány byly skupiny nemocných, kteří byli léčeni bortezomibem ve dvoj-, troj- a čtyřkombinačních režimech. Mezi těmito třemi skupinami byly zjištěny rozdíly v dosažení OS (29.6 vs. 44.8 vs. Nedosaženo měsíců, jednotlivě; $p=0.012$), v mediánu TTP (15.1 vs. 18.6 vs. 21.7 měsíců, jednotlivě; $p=0.892$) a PFS (13.8 vs. 17.0 vs. 21.7 měsíců, jednotlivě; $p=0.716$). Režim BMP (bortezomib-melfalan-prednison) byl neúčinnější mezi trojkombinačními režimy a ve srovnání s režimem CBD (cyklofosamid-bortezomib-dexametason), BDD (bortezomib-doxorubicin-dexametason) a BTD (bortezomib-thalidomid-dexametason) byl medián OS jednotlivých režimů (49 vs. 41.7 vs. 37.9 vs. 32.2 měsíců, jednotlivě), medián TTP (20.5 vs. 16 vs. 13.5 vs. 13.8 měsíců, jednotlivě) a medián PFS (22.3 vs. 18.5 vs. 13.7 vs. 13.8 měsíců, jednotlivě). Nejčastější hematologickou toxicitou stupně 3 a vyšší byla anémie, vyskytla se v 17.5% (133/763) případů. Nejčastější non-hematologickou toxicitou stupně 3 a vyšší byly infekční komplikace, pozorovány byly v 17.3% (137/765) případů. Nejzávažnější toxicitou byla neuropatie stupně 2 a vyšší, pozorována byla ve 21.3% (169/762) případů.

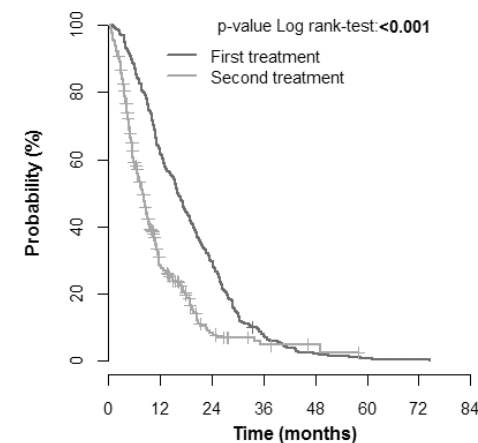
Závěr: Naše výsledky dokazují, že bortezomib v indukční léčbě patří mezi vysoce účinné léky pro nemocné s MM, kteří nejsou vhodní k provedení autologní transplantace kostní dřevě. Detailní analýza bude předmětem sdělení.

Vytvořeno s podporou grantů: NV15-29508A AZV MZČR

83.

Opakovaná léčba bortezomibem u pacientů s relabovaným mnohočetným myelomem

Štork M., Pour L., Brožová L., Špička I., Maisnar V., Minařík J., Jungová A., Gregora E., Hájek R. (Interní hematologická a onkologická klinika, FN, Brno; Institut Biostatistiky a Analýz, MUNI, Brno; I. interní klinika – klinika hematologie, VFN, Praha; IV. interní hematologická klinika, FN, Hradec Králové; Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc; Hematologicko-onkologické odd., FN, Plzeň; Interní hematologická klinika, FN Královské Vinohrady, Praha; Klinika hematoonkologie, FN, Ostrava)



Progression free survival (PFS)

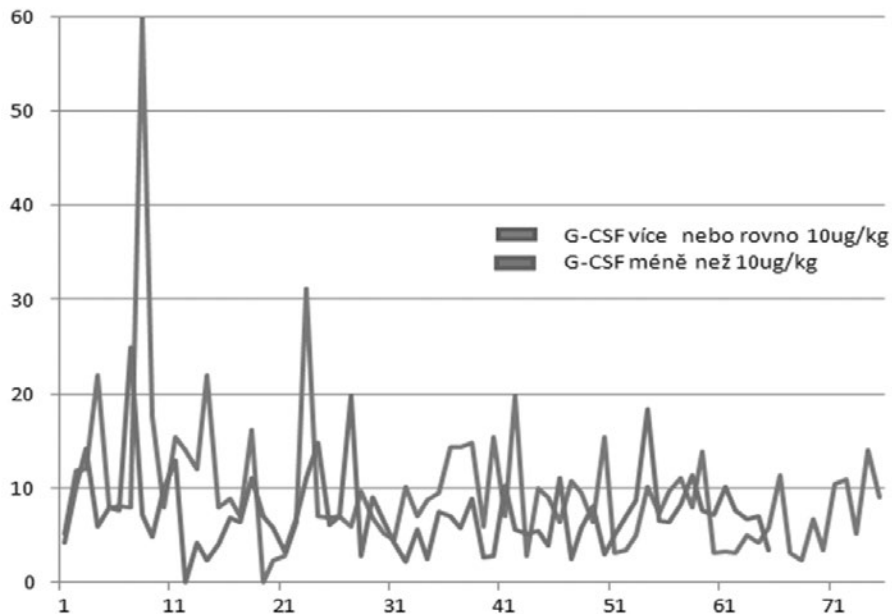
Bortezomib je široce používaný v léčbě jak nově diagnostikovaného, tak relabovaného mnohočetného myelomu. I přes současný obrovský pokrok v léčbě myelomu, je v klinické praxi řada nových anti-myelomových léků nedostupná. V této práci jsme analyzovali efektivitu opakované léčby bortezomibem u pacientů s relabovaným mnohočetným myelomem. Celkově bylo analyzováno 283 pacientů léčených opakovaně bortezomibem v ČR. Bortezomib byl podáván v standardním dávkování 1,3mg/m² a v kombinaci s kortikosteroidy, chemoterapií a/nebo thalidomidem. Před druhou léčbou bortezomibem bylo 61,5 % pacientů léčeno lenalidomidem, 42,5 % pacientů bylo léčeno thalidomidem a medián předchozích léčebných linií byl 3. Analyzována byla léčebná odpověď, intervaly přežití (PFS, TTP, DOR) a toxicita. Dále byly analyzovány rizikové faktory pro délku PFS a léčebnou odpověď u druhé léčby bortezomibem. Celková efektivita první léčby bortezomibem byla vyšší než u léčby druhé. ORR (PR a lepší) byla u první léčebné linie 72,7% oproti 34,5% ($p<0,001$). Interval TTP byl u první léčebné linie 16,1 (95% CI; 14,3-17,8) měsíce oproti 8,0 (95% CI; 6,9-9,2) měsícům ($p<0,001$). Interval PFS u první léčebné linie 16,1 (95% CI; 14,3-17,8) měsíce oproti 7,8 (95% CI; 6,7-8,9) měsícům ($p<0,001$). Interval DOR u první léčebné linie 17,5 (95% CI; 15,3-19,7) měsíce oproti 10,5 (95% CI; 8,0-13,0) měsícům ($p=0,001$). Toxicita včetně neuropatií byla u obou léčebných linií srovnatelná. Další výsledky týkající se rizikových faktorů budou publikovány.

Porovnání výtěžnosti mobilizace po indukční léčbě u pacientů s mnohočetným myelomem

Jungová A., Havlová E., Záborská T., Hrabětová M., Jindra P. (HOO FN, Plzeň; Ústav klinické biochemie a hematologie, FN Plzeň)

Úvod: Mnohočetný myelom (MM) je agresivní hematoonkologické onemocnění, které v ČR postihne až 600 lidí ročně. I v posledních letech zůstává nedílnou součástí léčebných protokolů autologní transplantace, proto je velmi důležitý priming a následná mobilizace periferních krvetvorných buněk (PBSC) pro následné úspěšné provedení transplantace. Jelikož se do indukčních protokolů dostaly nové léky jako je thalidomid a bortezomib, došlo v průběhu času k mírnému poklesu úspěšnosti odběrů PBSC oproti původním režimům na bázi adriamycinu či vincristinu. Pokles je jak v množství CD 34 buněk/kg, tak ve vyšším procentu méně úspěšných či neúspěšných odběrů. Standardní dávka pro podávání G-CSF je 10ug/kg hmotnosti. Z našeho souboru pacientů jsme porovnávali vliv dávky G-CSF a také vliv použitého indukčního protokolu na úspěšnost mobilizace. **Metoda:** Retrospektivní analýza 145 pacientů s MM léčených na Hematologicko onkologickém oddělení FN Plzeň mezi roky 2013-2016. **Výsledky:** Ze souboru 145 pacientů bylo 70 žen a 75 mužů. Nejčastěji byla podána indukční léčba dle protokolu CTD (43%), pak VD (27%), VTD (15%), ostatní protokoly (15%). Průměrná výtěžnost mobilizace byla 6,4 x 106CD34/kg po indukci CTD, 8,57 x 106CD34/kg u indukce VD a 13,53 x 106CD34/kg u VTD. Poměrně efektní byl odběr i po indukci BDD – 12,12 x 106CD34/kg, ale bylo jen malé množství pacientů (3pac.). Při porovnání obou thalidomidových režimů (CTD vs. VTD) byla signifikantně vyšší mobilizační úspěšnost u protokolu VTD ($p=0.0001$), stejně tak při porovnání bortezomibových režimů (VD vs.VTD) opět výrazně vyšší úspěšnost u režimu VTD ($p=0.026$). Při analýze zaměřenou na dávku G-CSF při mobilizaci vyšlo statisticky významné ($p=0.03$) použití dávky vyšší nebo rovno 10ug/kg hmotnosti pacienta ($n=79$ pac.) oproti dávce nižší než 10ug/kg hmotnosti pacienta ($n=66$ pac.)

Diskuse: U transplantabilních pacientů s mnohočetným myelomem je v době 1.linie léčby velmi důležitá úspěšnost mobilizace s odběrem dostatečného množství PBSC pro následnou autologní transplantaci. Z naší analýzy vyplývá, že je velmi důležité zvolit správný indukční režim jak podle standardních guidelines, tak s ohledem na úspěšnost plánované mobilizace. Jako nejideálnější protokol je vhodné použít režim VTD, event. BDD. Současně je velmi důležité podat dostatečnou dávku G-CSF, která by měla být minimálně rovna či více než 10ug/kg hmotnosti pacienta. Pro přesnější zhodnocení by byla samozřejmě vhodná podrobnější analýza pro přesnější porovnání skupin pacientů.



Opakovaná léčba lenalidomidem je efektivní u silně předléčených pacientů s refrakterním a relabovaným mnohočetným myelomem

Štork M., Adam Z., Krejčí M., Sandecká V., Ševčíková S., Brožová L., Král Z., Pour L. (Interní hematologická a onkologická klinika, FN, Brno; Babákova myelomová skupina, LF MUNI, Brno; Institut biostatistiky a analýz, MUNI, Brno)

Lenalidomid je efektivním lékem u relabovaného či nově diagnostikovaného mnohočetného myelomu. Kombinace lenalidomidu a dexamethasonu je současný zlatý standard v léčbě relabovaného mnohočetného myelomu. Cílem této práce je analyzovat efektivitu opakované léčby lenalidomidem ve dvou léčebných liniích u pacientů s relabovaným a refrakterním mnohočetným myelomem. Od 6/2009 do 12/2015 bylo prospektivně sledováno celkem 41 pacientů léčených na IHOK FN Brno. Lenalidomid byl podáván ve standardní dávce 25mg po 21 dnů v 28 denním cyklu v kombinaci s kortikosteroidy a/nebo chemoterapií. Maximální kumulativní dávka hrazená zdravotními pojišťovnami byla 4200mg. Léčba lenalidomidem nebyla hrazena, pokud pacient nedosáhl po 4 cyklech minimálně parciální remise. Před druhou léčbou lenalidomidem byli všichni pacienti refrakterní na poslední podávanou léčbu, 95% pacientů bylo předléčeno bortezomibem, 48% podstoupilo autologní transplantaci a medián předchozích linií léčby byl 3. Po první léčbě lenalidomidem 82,8% pacientů dosáhlo parciální remise či lepší léčebné odpovědi a medián PFS byl 15,2 měsíce. Po druhé léčbě lenalidomidem dosáhlo parciální remise či lepší léčebné odpovědi 14,2% pacientů, medián PFS byl 4,8 měsíce a medián OS 11,9 měsíce. Nebyl nalezen žádný rizikový faktor predikující délku PFS u druhé léčby lenalidomidem. Toxicita léčby byla srovnatelná u obou léčebných linií a nebyla závažná. Výsledky byly signifikantně ovlivněny pravidly zdravotních pojišťoven limitující hrazení léčby lenalidomidem. Opakovaná léčba lenalidomidem je efektivní léčebná alternativa pro silně předléčené pacienty s relabovaným a refrakterním mnohočetným myelomem. V nepřímém srovnání jsou výsledky opakované léčby lenalidomidem srovnatelné s léčbou pomalidomidem či daratumumabem.

POSTEROVÁ ČÁST

P1.

Advanced profiling of switching B cell precursor leukemia towards monocytic lineage

Mejstříková E., Žaliová M., Musilová A., Fišer K., Nováková M., Slámová L., Starková J., Rejlová K., Vášková M., Trka J., Hrušák O. (Klinika dětské hematologie a onkologie LF2 UK a FN Motol CLIP, Praha)

Transdifferentiation of B cell acute lymphoblastic leukemia (BCP ALL) into monocytic lineage is more frequent than expected (Slamova et al, McLellan et al.). Transdifferentiation is typically a stepwise process during which cells express monocytic and B-lymphoid markers simultaneously. Recently, transdifferentiation was also documented in patients receiving anti-CD19 targeted therapy (blinatumomab or CAR-T cells). So far we did not find a single unifying (epi)genetic background in transdifferentiating ALL (swALL), however, in comparison to other BCP ALLs, swALL is enriched for deletions, alterations and rearrangements of the ERG, IKZF1 and DUX4 genes, respectively. We observed signs of the transdifferentiation in 55 patients out of 1179 centrally analyzed BCP ALL cases. Whole exome was performed in 19 patients and transcriptome was performed in 28 patients at diagnosis, moreover we analyzed transcriptome of transdifferentiating cells in 6 samples. Cases can be further subdivided into following subgroups: patients with expression profile consistent with DUX4 rearrangement (n=35), hyperdiploidy (n=5), hypodiploidy (n=1), DUX4 low expression (n=6), patient with m.Down (n=1), ZNF384 fusions (n=2), MLL gene rearrangement (n=1), additional 4 cases need further analyses for classification. Aims of our study were to address the following questions: 1) What are the typical features of individual categories of swALLs? 2) Is it possible to define markers, ideally suitable for flow cytometry, differentially expressed at diagnosis of swALLs? 3) What is the expression pattern of transdifferentiating cells? How similar is to that of normal monocytic cells? Is it possible to define differences - targets - usable for MRD analysis?

Results: 1) Largest subgroup (64%) of swALLs represent patients with expression profile consistent with DUX4 gene rearrangement. They typically have no clear signs of transdifferentiation at diagnosis and their blasts start to transdifferentiate during the prednisone prophylaxis. Response to therapy is slow, frequently leading to high risk stratification. Cases with CD19posCD20pos ALL and low DUX4 expression (n=6) typically present with signs of transdifferentiation already at diagnosis. Both patients with ZNF384 fusion shared several immunophenotypic features with swALLs, but signs of transdifferentiation were so prominent that morphologically they fulfilled criteria for bilinear leukemia. 2) Among the 23 most significantly differently expressed genes between swALLs and control BCP ALLs, two encode proteins measurable by flow cytometry: CLEC12 (CLL-1, CD371) and MS4A1 (CD20) with higher and lower expression in swALLs, respectively. Other relevant differentially expressed genes were: PNMT, GLDC, CCNA1, ANGPT1, CHST13. 3) Although we frequently observe absence of B cell antigens (namely CD19) by flow cytometry on transdifferentiated blasts, the expression of B cell differentiation genes (e.g., EBF1 and BLK) is present at higher levels in comparison to healthy mature monocytes. Following markers are being tested for discrimination of switched and healthy monocytes: CD45RA, CD52, CD22, Ki-67, CD70 and CD21. Other promising markers include CD358, LARGE-1, CD66b and CD98.

Conclusion: The newly described subgroup of BCP ALL with DUX4 gene rearrangement largely overlaps with previously described swALL. CLL-1 seems to be a sensitive marker for identification of swALL. Transcriptomic profile of transdifferentiated monocytoid cells differ from that of healthy monocytes, and residual expression of B cell genes speaks for true transdifferentiation rather than for clone independence. Supported by 15-28525A, UNCE, GAUK 318217, 15-06049Y

P2.

The NPAT/JAK2 fusion gene: a novel aberration activating kinase signaling in childhood BCR/ABL1-like ALL

Potůčková E., Stuchlý J., Starková J., Stanulla M., Zuna J., Trka J., Žaliová M. (CLIP, Department of Paediatric Haematology and Oncology, Second Faculty of Medicine, Charles University, Prague; Pediatric Hematology and Oncology, Hannover Medical School, Hannover – D)

BCR/ABL1-like acute lymphoblastic leukemia (ALL) represents prognostically unfavorable, genetically heterogeneous ALL subgroup defined by the gene expression signature closely resembling that of BCR/ABL1-positive ALL. This signature reflects the activation of kinase signaling

which is in BCR/ABL1-like ALL subgroup triggered by various lesions, the most frequently lesions affecting genes encoding kinases or cytokine receptors. Similarly to BCR/ABL1, some of these lesions can be targeted by specific inhibitors and, thus, represent targets for alternative therapy in cases poorly responding to standard treatment. In our study we investigated a cohort of 25 childhood B-cell precursor ALL from BFM 2000 study with suboptimal response to therapy (involving 12 high risk and 13 intermediate risk cases) lacking routinely screened genetic risk factors including those with negative prognostic impact (thus belonging to "B-other ALL"). All cases included in the study harbored a deletion of the IKZF1 gene (IKZF1del), a known, yet relatively weak negative prognostic factor which was not involved in risk-assessment algorithm in the BFM 2000 study. We aimed to characterize the genomic background of these cases in more detail in order to reveal additional genetic factors that may contribute to and explain suboptimal therapy response and to identify potentially druggable lesions. Whole-genome gene expression profiling and subsequent hierarchical clustering showed that 8 of 25 cases belonged to the BCR/ABL1-like ALL. The high risk cases clustered among BCR/ABL1-like ALL more frequently compared to intermediate risk cases (7/12 versus 1/13 cases, $p=0.01$). Using targeted and whole transcriptome sequencing we identified known lesions of kinase / cytokine receptor genes in 7 of 8 BCR/ABL1-like cases: TERF2/JAK2 ($n=1$), PAX5/JAK2 ($n=2$), EBF1/JAK2 ($n=1$), EBF1/PDGFRB ($n=2$), JAK1 V651M ($n=1$). In the remaining case we identified a novel JAK2-involving fusion gene – NPAT/JAK2. In silico analysis showed that the partner genes are fused in frame within the fusion transcript and that this fusion gene potentially encodes chimeric protein with intact JAK2 kinase domain. We cloned the full length coding sequence of NPAT/JAK2 and studied its biological properties in model cell lines. We found that NPAT/JAK2 protein is localized both in cytoplasm and nucleus in transfected cells and that it is phosphorylated on tyrosines corresponding to tyrosines 1007 and 1008 in activation loop of JAK2 whose phosphorylation is essential for JAK2 kinase function. Next, we found that NPAT/JAK2 conferred growth factor independence to transduced murine pro-B cell line BaF3. Mutation of NPAT/JAK2 ATP binding site abolished autophosphorylation of above mentioned tyrosines and consequently the pro-proliferative/pro-survival effect of NPAT/JAK2 on BaF3. The pro-proliferative/pro-survival effect of NPAT/JAK2 on BaF3 cells was also fully blocked by therapeutically relevant doses of JAK1/2 inhibitor Ruxolitinib. These data demonstrate that NPAT/JAK2 encodes constitutively active chimeric kinase with oncogenic potential which is druggable by clinically available specific inhibitor. In conclusion, we demonstrated that significant proportion of IKZF1del-positive high risk B-other ALL cases belong to the BCR/ABL1-like ALL and harbor druggable kinase activating lesions the list of which we extended by identification and functional study of NPAT/JAK2 fusion. Supported by AZV 15-30626A, GAČR P302/12/G101 and by the project for the conceptual development of research organization (00064203, University Hospital Motol).

P3. Testování nové reagentie Q. F. A. Thrombin ke stanovení fibrinogenu na koagulometrech ACL TOP FAMILY

Palátová J., Korelusová I., Kilbergrová M., Štruncová P., Šlechtová J. (Ústav klinické biochemie a hematologie FN a LF UK, Plzeň)

Při hledání příčiny nevysvětlitelného krvácení nebo naopak trombotické příhody je klinicky významné kvantitativní stanovení fibrinogenu. Fibrinogen je také užitečným markerem při hodnocení závažných klinických stavů. Fibrinogen je glykoprotein syntetizovaný v játrech. Nachází se v plazmě a α -granulích trombocytů. Je substrátem pro trombin, který jej štěpí na fibrin nebo pro plazmin, který jej štěpí na fibrin-degradační produkty. Může však být štěpen i trombinu podobnými enzymy, např. hadími jedy. Fibrinogen je též důležitým mediátorem agregace trombocytů. Předmětem našeho testování bylo porovnat výsledky fibrinogenu získané s reagentii HemosIL Q. F. A. Thrombin a se stávající reagentii HemosIL Fibrinogen-C. Hladinu fibrinogenu jsme stanovili koagulační metodou dle Claussa na optických koagulometrech ACL TOP FAMILY. Principem je stanovení koagulačního času po přidání nadbytku trombinu k ředěné vyšetřované plazmě. Obě hodnocené soupravy dodávané firmou Werfen obsahují 10 lahvíček se 2 ml lyofilizovaného hovězího trombinu. Výrobce udává u reagentie Q. F. A. Thrombin delší stabilitu a větší rozsah měření a zmiňuje, že hodnoty fibrinogenu nejsou ovlivněny přímými orálními antikoagulanty (DOACs). Stabilita Q. F.

A Thrombin (cca 100 UNIH/ml) je po rozpuštění 7 dní při 2-8 °C v originální lahvičce nebo při 15 °C v analyzátoch ACL TOP FAMILY, rozsah měření je 2,0-10,0 g/l. Při koncentraci fibrinogenu pod 2,0 g/l dochází k automatickému nařazení vzorku pro získání přesnějšího výsledku. Stabilita Fibrinogen-C (cca 35 UNIH/ml) je 3 dny při 2-8 °C v originální lahvičce nebo při 15 °C v analyzátoch ACL TOP FAMILY a rozsah měření je 0,8-5,0 g/l. U tohoto typu reagentie řadí analyzátor vzorky s koncentrací fibrinogenu nižší i vyšší než je uvedený rozsah měření. Celkově jsme proměřili 108 patientských vzorků s hodnotami fibrinogenu ve fyziologických i patologických mezích. Porovnali jsme získané výsledky fibrinogenu mezi oběma přístroji. Korelační koeficient byl u nové reagentie $R^2 = 0,9717$ a u stávající reagentie $R^2 = 0,9859$. Dále jsme srovnali získané výsledky fibrinogenu obou reagentií mezi sebou. Hodnota korelačního koeficientu v tomto případě byla na ACL TOP 500 $R^2 = 0,9291$ a na ACL TOP R2 = 0,9397. Provedli jsme také ověření stability reagentie Q. F. A. Thrombin a údaje udávané výrobcem jsme potvrdili. V další fázi jsme testovali vzorky pacientů léčených DOACs a ověřili jsme, že výsledná hodnota fibrinogenu jimi není ovlivněna. Z dosažených výsledků je patrné, že nová reagentie Q. F. A. Thrombin je vhodná ke stanovení fibrinogenu na analyzátoch ACL TOP FAMILY. Jelikož v naší laboratoři stanovujeme nízké hodnoty fibrinogenu sporadicky, je nespornou výhodou zkrácení doby analýzy vzhledem k většímu rozsahu měření oproti stávající reagentii Fibrinogen-C. Testovaná reagentie je také vhodná pro stanovení fibrinogenu u pacientů léčených dabigatran etexilátem, jelikož se stávající reagentií vychází falešně nízké hodnoty fibrinogenu ($<1,0$ g/l). Na základě dosažených výsledků jsme se rozhodli pro zavedení reagentie Q. F. A. Thrombin do klinické praxe.

P4. Registrace hemaferetických výkonů ve WAA (World Apheresis Association) registru – desetileté výsledky

Bláha M., Lánská M., Tomšová H., Žák P. (IV. interní hematologická klinika, LF a FN, Hradec Králové)

Úvod: V současné době je obecně uznáváno, že klinická data o apheretických procedurách je nutné detailně registrovat. Takové požadavky splňuje WAA registr, kam hlásí výsledky také naše pracoviště. Detailní publikace výsledků WAA registru z r. 2017 nás vedly k shrnutí vlastních desetiletých výsledků a významu registrace pro činnost vlastního centra ve srovnání s výsledky celého registru. Materiál a metodika: Výsledky hemaferéz byly registrovány do centrály WAA registru v Umea, Švédsko. Každé centrum má vlastní kodovací listinu, kody chrání identitu pacientů. Po „log in“ bylo do předdefinovaného formuláře vyplňovány obecné údaje (věk, pohlaví, hmotnost, typ procedury, použitá technika atd.) nebo speciální údaje (výskyt a typy nežádoucích reakcí, zdravotní stav, kvalita života atd.).

Výsledky: Od 7.3.2006 do konce roku 2016 jsme ve WAA registru registrovali celkem 7927 hemaferetických výkonů u 956 pacientů. Z pacientů bylo 40,4 % mužů a 59,6 % žen v průměrném věku 53 + 15 let (median 57 let, range 12 – 90). Průměrně bylo registrováno u jednoho pacienta 8,3 výkonu. (Ve WAA registru je to 6,9 výkonu na pacienta.) V posledním roce, tj. v době 1.1. – 31.12.2016 bylo registrováno 855 výkonů, a to 152 plazmaferéz, 22 erythrocytaphereses, 119 leukocytaferéz nebo odběrů periferních kmenových buněk, dále 8 trombocytophereses, 160 imunoaphereses, 137 casca-de filtrations/rheophereses, and 238 fotophereses. Srovnání výkonů našeho centra a WAA registru: v jednotlivých výkonech většinou nejsou procentuálně významné rozdíly, ale značně se liší podíl kaksádových filtrací/reoferéz (9x vyšší v našem centru, tvoří 18,2 % výkonů - oproti WAA registru, kde celkově činí 2,1 %). Podíl lipidaferéz je v našem centru relativně malý a do současnosti klesá, ve WAA registru naopak stoupá. Relativně velký je podíl fotoferéz (32,1%) – vzhledem k zabezpečení kliniky provádějící transplantace kostní dřeně (provádění fotoferéz při jinak nezvládnutelné reakci štěpu proti hostiteli).

Diskuse: Registraci ve WAA registru provádíme od 7.3.2006 dosud; registrujeme výkony provedené v širokém spektru indikací. Podle našich zkušeností je účast pracoviště v registru významná z několika důvodů: • Při pravidelných kontrolách kvality práce (quality assessment) nemá obvykle jedno centrum dostatek údajů a zkušeností s některými výkony nebo chorobami. Porovnání s dalšími výsledky WAA registru je proto cenné. Jde jak o kvalitu provádění výkonů, tak i o výskyt nežádoucích účinků. • Na druhé straně je výhodou WAA registru, že každé centrum má vlastní kód a může pracovat zcela nezávisle. Mohou být prováděna rychlá a nezávislá hodnocení (bez kompetitivních obav), vlastní, ale i multicentrické studie. • V časově napjatém programu je významné,

že registrace není časově náročná. Podle našich zkušeností trvá jedna registrace v průměru do 5 minut, podle zkušeností WAA centra u zapracovaného administrátora jen asi 2 minuty. • Registrace je bezplatná. Závěr: Registrace výsledků aferéz se ukázala významnou činností, důležitou pro pravidelné "quality assessment" centra a technicky dobře proveditelnou. Rozbor našich výsledků (jak indikačního spektra, tak technického provedení, kvality výkonů nebo výskytu nežádoucích účinků za 10 let ukázal, že ve většině parametrů máme výsledky obdobné nebo i shodné jako u jiných pracovišť. Samozřejmě byly zaznamenány specifické odlišnosti pracoviště, jak je obvyklé mezi centry a jak upozornila i poslední zpráva z r. 2017 WAA registru. Rozbor vlastních výsledků i zkušeností WAA registru umožňují srovnávat výsledky práce s ostatními centry, což může vest k lepší kvalitě a bezpečnosti práce.

Poděkování: Práce byla provedena za podpory výzkumných úkolů MZ ČR AVZ 16-30366A, 17-31754A, 17-28882A a 17-29241A.

P5.

Bioinformatická analýza amplikonového sekvenování 16S rRNA

Vrbáčková F., Plíšková L., Bolehovská R., Hrochová K., Žák P. (IV. interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice, Hradec Králové; Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Fakultní nemocnice, Hradec Králové)

Mikrobiom, soubor veškerých mikroorganismů obývajících určité prostředí, je nedílnou součástí každého lidského organismu a jeho složení má velmi významný vliv na děje, které se v lidském těle odehrávají. Analýza složení mikrobiomu byla s ohledem na jeho komplexitu velmi komplikovaná. Až rozmach masivně paralelního sekvenování znamenal významný krok směrem k vyšší metodické dostupnosti a následnému rozvoji poznání v této oblasti. Pro získání správných výsledků je nezbytná kvalitní bioinformatická analýza sekvenáčnických dat, pro kterou lze využít komerční i zdarma dostupné nástroje, jejichž paleta se v posledních letech významně rozrostla. Základní problém, se kterým se tyto aplikace potýkají, je odstranění chyb vzniklých při amplifikaci a následné sekvenaci. Metody založené na tvorbě tzv. operačních taxonomických jednotek, sjednocujících sekvence s vysokou homologií a taxonomizací reprezentativní sekvence této jednotky, neumožňují dostatečně odlišit organismy s vysokou mírou sekvenční podobnosti (např. rozlišení na úroveň druhu). V naší laboratoři jsme proto zvolili novou metodu, která opravuje chyby odhalené v jednotlivých sekvencích na základě jejich statistické předpovědi a umožňuje tak odlišit i mnohem drobnějších změn. Jedná se o zdarma dostupný otevřený software DADA2, který funguje jako knihovna pro statistické prostředí R a provádí analýzu dat z námi používaného sekvenátoru Illumina MiSeq. Tento software ovládaný pomocí velmi snadného programátorského rozhraní vytváří grafy zobrazující kvalitu sekvenáčnických dat jednotlivých vzorků a provádí jejich následnou analýzu. Software umožňuje ořez začátků a konců analyzovaných sekvencí a odstranění sekvencí s nízkou kvalitou. Pomocí statistických metod podobných algoritmu "Expectation-maximization" je vytvořen model výskytu chyb, který je využit při opravě vstupních sekvencí. V případě párového sekvenování jsou oba konce spojeny a je vytvořena výsledná tabulka četnosti jednotlivých sekvencí v analyzovaných vzorcích s vyloučením sekvencí pocházejících z více zdrojů (tzv. chimerických sekvencí). DADA2 umožňuje automatické přiřazení taxonomických dat. Na našem pracovišti ovšem používáme vlastní algoritmus, ve kterém automaticky přiřadíme údaje ze 3 zdrojů (DADA2 s databází Silva, RDP a Blast s databází NCBI). Zkušený personál následně vybere relevantní taxonomie. Z takto zpracovaných dat vytvoříme výslednou tabulku četností jednotlivých taxonů ve vzorcích. Díky využití programů, vytvořených na našem pracovišti, je toto zpracování velmi rychlé a efektivní. Výsledky našich pilotních analýz dat pomocí DADA2 ukazují, že se jedná o velmi jednoduše použitelný, stále se rozvíjející nástroj, který odstraňuje velmi omezující slabiny principů založených na tvorbě operačních taxonomických jednotek, tj. splývání organismů, jejichž sekvence se liší pouze v několika nukleotidech. Umožňuje kvalitní identifikaci složení mikrobiomu v našich vzorcích při dobré časové náročnosti zpracování dat na cenově dostupné pracovní stanici. Ne zcela spolehlivé automatické přiřazování taxonomie z jednoho zdroje jsme nahradili časově náročnější, ale přesnější metodou, umožňující syntézu výsledků z více zdrojů. Implementace pochopitelně vyžaduje dostatečnou znalost práce v prostředí R. Pro běžné použití jsme v naší laboratoři tento problém odstranili vytvořením aplikace s grafickým rozhraním, kterou může obsluhovat i personál se základní znalostí práce s osobním počítačem.

P6.

Diferenciální molekulová diagnostika Waldenströmeyer makroglobulinémie

Tatayová L. (Odd. lékařské genetiky, Medirex a.s., Bratislava – SK)

Waldenströmova makroglobulinémie (WM) je lymfoproliferativní neoplázie B-buniek, ktorá patrí do skupiny non-Hodgkinových lymfómov. Primárnou črtou je infiltrácia kostnej drene patologickými lymfoplazmatickými bunkami (LPC) a prítomnosť monoklonálnych protilátok. Rutinné laboratorné vyšetrenia môžu spôsobiť komplikáciu v stanovení konkrétneho typu monoklonálnej gamapatie, nakoľko WM a mnohopočetný myelóm (MM) vykazujú do značnej miery obdobné výsledky. Zavedením vhodnej alelovo-špecifickej PCR (AS-PCR) v kombinácii so Sangerovým sekvenovaním sme detegovali somatickú mutáciu v géne MYD88 (L265P). Tá je jednoznačným diferenciálnym markerom WM, nakoľko sa u pacientov s MM nevyskytuje. Výsledky analýzy sme overili pomocou SALSA MLPA Kit P038 B1 (MRC-Holland). V časovom rozmedzí od marca 2016 do januára 2017 bolo vyšetrených 99 pacientov so susp. WM, pričom prítomnosť mutácie L265P bola detegovaná u 10 z nich. Pri uvedenej mutácii dochádza k zámene T→C v chromozómovej oblasti 3p22.2, ktorá vedie k abnormálnej aktivácii signálnych dráh NF-κB a Jak-STAT. Ďalším novopopísaným markerom WM je výskyt mutácií v C-X-C chemokínovom receptore (CXCR4). Vyskytnúť sa môžu nonsense (NS) alebo frameshift (FS) mutácie, na základe ktorých je možná presnejšia predikcia liečebnej odpovede a prežívania pacientov. C>A a C>G transverzie v nukleotidovej pozícii 1013 v géne CXCR4 vedú k vytvoreniu predčasného stop kodónu, čím dochádza k strate 15 aminokyselín v C-terminálnej doméne. Pre pacientov s mutáciou MYD88L265P a zároveň s CXCR4NS je typický agresívnejší priebeh ochorenia, vykazujú vyššiu hladinu sérových Ig monoklonálnych frakcií a tiež vyšší stupeň infiltrácie kostnej drene malígnymi bunkami. Nasledujúcim cieľom v diferenciálnej diagnostike pacientov s WM je zostavenie vhodnej AS-PCR a sekvenáčnej reakcie na detekciu najčastejších mutácií, medzi ktoré patrí S338X, S338fs, K333X a G332fs. Overenie výsledkov bude realizované pomocou SnaPshot Multiplex kitu (Applied Biosystems). Klúčové slová: diferenciálna diagnostika, Waldenströmova makroglobulinémie, MYD88, CXCR4

P7.

Granulocytferézy na Transfúzním oddělení Fakultní nemocnice Olomouc - analýza dárců

Entrová A., Zemanová M., Svobodová N., Galuszková D. (Transfúzní oddělení, FN, Olomouc)

Úvod: Od roku 2016 byla nabídka aferetických odběrů na Transfúzním oddělení FNOL rozšířena o odběr granulocytů z aferézy. Vzhledem k charakteru odběru musí být vybírání zkušeni dárce, s vyhovujícím žilním systémem na obou horních končetinách, s váhou >70 kg a splňující vstupní parametry dle platné legislativy.

Metody: Za období 1-12/2016 provést retrospektivní analýzu parametrů dárců, zhodnotit vývoj hodnot krevního obrazu po stimulaci kortikoidy a po vlastní separaci granulocytů se zaměřením na hodnoty neutrofilů a hemoglobinu.

Výsledky: Z retrospektivní analýzy dárců vyplynulo, že v období leden - prosinec 2016 absolvovalo odběr granulocytů z aferézy 20 dárců, všechny procedury byly provedeny na separátoru krevních elementů Spectra Optia, procedura sběr granulocytů (PMN) s použitím odběrové soupravy REF 10300 a 10% Voluvenu jako HES. Vstupní parametry dárců byly následující - všichni dárce byli muži se zkušenostmi s aferetickými odběry a s dobrým stavem žilního systému na obou horních končetinách, s průměrnou hmotností 91kg (74-115 kg) a výškou 182cm (173-195cm), průměrný věk dárců byl 39let (21-47 let), zastoupení KS dárců (7x A^{+} , 6x A^{-} , 2x B^{-} , 1x B^{+} , 3x O^{+} a 1x O^{-}). Dárce byli vybírání ABO RhD shodní, jejich kompatibilita byla potvrzena provedením testu kompatibility mezi dárcem a příjemcem ještě před stimulací dárce. Následná stimulace dárců byla provedena 40 mg Solu-Medrolu v krátké infuzi. Separace byla provedena za 4 hodiny po stimulaci kortikoidy. Dárcům granulocytů byly vyšetřeny hodnoty krevního obrazu před stimulací, po stimulaci (před odběrem) a po odběru. Vývoj hodnot leukocytů a neutrofilů - průměrné hodnoty leukocytů u dárců před stimulací byly 5,9x10⁹/l (4,1-5,8x10⁹/l), po stimulaci 8,6x10⁹/l (6,2-11,7x10⁹/l), po separaci 6,6x10⁹/l (4,3-9,6x10⁹/l). Průměrné hodnoty neutrofilů u dárců před stimulací byly 3,5x10⁹/l (1,9-6,59x10⁹/l), po stimulaci 7,8x10⁹/l (5,4-10,9 x10⁹/l), po separaci 6,1x10⁹/l (3,7-9,1 x10⁹/l). Stimulací kortikoidy došlo k vzestupu leukocytů u dárců o 46%, neutrofilů o 123%. Odběrem došlo k poklesu leukocytů u dárců o 23%, neutrofilů o 21%. Vývoj hodnot hemoglobinu (Hb) - průměrná

hodnota hemoglobinu u dárce před separací byla 152 g/l (130-168g/l), separací došlo k poklesu hemoglobinu průměrně o 19g (13-25g), což představovalo pokles o 12,5% (8,7-15,7%). Průměrná hodnota hemoglobinu u dárce po separaci byla 134g/l (115-151g/l). Výsledné jakostní parametry produktů granulocyty z aferézy byly následující - leu 33,1x10⁹/l, neutrofilů 27,9 x10⁹/l, Hb 54g/l, hct 0,162, ery 1,83 x10¹²/l, trombo 253 x10⁹/l. U dárce granulocytů se nevykly žádné komplikace související se stimulací kortikoidy, vlastní separací (hypokalcemie, potíže se žilním přístupem) ani s použitím roztoku 10% Volutenu.

Závěr: V roce 2016 darovalo na TO FNOL 20 dárce granulocyty z aferézy, odebrané produkty byly následně použity k hemoterapii 6 pacientů. Dárci 4 hodiny před separací podstoupili stimulaci kortikoidy, po které došlo k zvestupu počtu neutrofilů v průměru o 123%. Vlastním odběrem došlo k poklesu počtu neutrofilů o 21% a hladina hemoglobinu klesla v průměru o 19g/l (12,5%). Dárci byli vybíráni ze zkušných dárců, s vhodným žilním systémem na obou HK, všichni dárci zvládli odběr bez komplikací.

P8. Nová mutace v genu RUNX1 u familiární trombocytopenie s predispozicí k rozvoji akutní myeloidní leukémie

Pospíšilová D., Křupková L., Ludíková B., Divoká M., Holzerová M., Hluší A., Novák Z., Sztokowski T., Papajík T. (Dětská klinika, FN a LF UP, Olomouc; Hemato-onkologická klinika, FN a LF UP, Olomouc)

Úvod: Familiární trombocytopenie s predispozicí k rozvoji akutní myeloidní leukémie (FPD/AML) je klinicky heterogenní skupina vzácných chorob s autozomálně dominantní dědičností. Jako příčina FPD/AML byla u několika rodin identifikována vrozená mutace v genu RUNX1. RUNX1 hraje klíčovou roli ve zrání, diferenciaci a ploidizaci megakaryocytů a také při tvorbě trombocytů. Typy RUNX1 mutací u FPD/AML jsou velice heterogenní, často jsou specifické pro jednotlivé rodiny a nejčastěji se vyskytují v exonech 3-5 v RHD doméně blízko N-konci RUNX1. Přítomnost RUNX1 mutace v FPD/AML je asociována s 30-50% rizikem rozvoje AML. U více než 80 % asymptomatických FPD/AML ve věku 50 let je detekována klonální hematopoéza.

Cíl: Analyzovat mutační status genu RUNX1 a klinické a laboratorní markery u rodiny s hereditární trombocytopenií zahrnující 3 případy MDS/AML. Metody Agregace a aglutinace trombocytů byla měřena na 4-kanálovém agregometru APACT 4004. DNA a RNA byly izolovány z periferní krve standardními technikami. Mutační status genu RUNX1 byl určen pomocí přímého Sangerova sekvenování PCR produktu na DNA úrovni. Analýza délky alternativních transkriptů byla provedena PCR metodou s cDNA templátem a detekcí pomocí agarózové elektroforézy. Sekvence alternativních transkriptů byly získány pomocí Sangerova sekvenování. U 3 pacientů s MDS/AML bylo provedeno standardní cytogenetické G pruhování; nalezené chromozomální změny byly potvrzeny metodou FISH.

Výsledky: Bylo analyzováno 9 rodinných příslušníků (4 dospělí, 5 dětí) ze tří generací rodiny s FPD/AML. U 7 z nich byla nalezena nová mutace v genu RUNX1 NM_001754.4:c.509-13C>A jako pravděpodobná příčina vzniku FPD/AML. Mutace je lokalizována v intronu mezi exony 2 a 3 a narušuje správný sestřih RNA, což vede ke vzniku aberantního transkriptu o 11 nukleotidů delšího než jeho fyziologická varianta. Vlivem vzniku předčasného terminačního kodonu dochází ke zkrácení a narušení funkce transkripčního faktoru RUNX1. Všichni členové rodiny nesoucí mutaci měli různý stupeň trombocytopenie (60-128x10⁹/l), žádný z nich nevyžadoval léčbu. U 6 pacientů s mutací byla zjištěna snížená agregace v přítomnosti kolagenu a epinefrinu. Šest pacientů s RUNX1 mutací mělo anémii z nedostatku železa neznámého původu. Matka a dcera zemřely na AML ve věku 52 a 38 let. Matka měla karyotyp 47,XX,+9[4]/46,XX[16] a její dcera nesla dva patologické klony 45,XX,-7[5]/46,XX,-7,+8[3] a klon s normálním karyotypem. Druhá dcera je sledována pro pancytopenii s myelodysplastickými změnami (výrazná megakaryocytární dysplázie s normální cytogenetikou a těžkou poruchou agregace).

Závěr: Byla detekována nová kauzální mutace v genu RUNX1 u rodiny s familiární trombocytopenií. Detekce RUNX1 mutace potvrzuje diagnózu FPD/AML a identifikace heterozygotních nosičů může pomoci včasnému odhalení rozvoje MDS/AML. U pacientů s pancytopenií bude dále analyzován vliv dalších somatických mutací získaných v průběhu leukemogeneze.

Grantová podpora: IGA-LF-2017-007, NPU LO 1304.

P9.

Expresí inhibičních KIR receptorů po transplantaci hematopoetických buněk

Holubová M., Houdová L., Jindra P., Lysák D. (Hematologicko-onkologické oddělení, FN, Plzeň; ZČU, FAV, NTIS)

NK buňky jsou součástí nespecifické imunitní odpovědi a mají velký význam v protinádorové imunitě. Na svém povrchu mají spektrum aktivačních a inhibičních receptorů, jejichž nejvýznamnější skupinou jsou KIR (Killer-cell immunoglobulin-like receptors). Klasickým ligandem inhibičních KIRů jsou HLA molekuly třídy I, které bývají downregulované na virem napadených či nádorově transformovaných buňkách. Snížení exprese HLA I. třídy vede k omezení inhibičních a převaze aktivačních signálů NK buňkám, což má za následek likvidaci cílové buňky. NK buňky se v současnosti začínají využívat v buněčné terapii a představují slibnou terapii při léčbě maligních onemocnění. Při hledání vhodného dárce krvetvorných kmenových buněk pro alogenní transplantaci se vedle HLA shody (HLA-HLA match) uplatňují i další kritéria, která umožňují výběr optimálního dárce. Jedním z těchto non-HLA kritérií je zohlednění KIR repertoáru dárce. Optimální dárce má co nejnižší počet inhibičních KIR receptorů pro HLA molekuly příjemce (KIR-HLA mismatch). V případě perzistence leukemických buněk nedojde k inhibici NK buněčné populace, což umožňuje její protileukemické působení a likvidaci zbytku nádorových buněk popř. snížení rizika relapsů. KIR repertoár bývá obvykle stanoven genotypizací, která však ne vždy odpovídá expresnímu profilu KIRů. Cílem naší studie bylo sledování změny exprese inhibičních KIR receptorů po alogenní transplantaci hematopoetických buněk pomocí průtokové cytometrie. V rámci studie byly stanoveny inhibiční KIR receptory u 23 dárce hematopoetických buněk a následně u 23 pacientů (příjemců) 1-2-3 měsíce po transplantaci. Pro stanovení byly využity vzorky periferní krve, které byly zpracovány lyse-wash metodou a označeny kombinací monoklonálních protilátek specifických pro následující antigeny: CD45-Horizon (BD Bioscience, USA), CD3-Pacific Blue, CD16-PerCP, CD56-PeCy7 (vše Exbio, ČR), KIR2DL1-PE, KIR2DL2/2DL3-APC, KIR2DL3-FITC popř. KIR3DL1/DL2 PE, KIR3DL3-APC, KIR3DL5-FITC (vše Miltenyi, USA). Měření bylo provedeno na průtokovém cytometru BD FACSCanto II, analýza pomocí software FlowJo (FlowJo, LLC, USA). Studie prokázala změny exprese inhibičních receptorů po transplantaci krvetvorných buněk, avšak trend vývoje exprese byl u jednotlivých pacientů velmi rozdílný. U více než 80% pacientů došlo k redukci exprese KIR2DL1 o více než 50% původní hodnoty u dárce, která zůstala takto zásadně snížena po celou dobu sledování. Ligandem pro tento receptor je HLA-C skupiny 2. Další dva KIR receptory interagující s HLA-C v tomto případě se skupinou 1, KIR2DL2/DL3, byly sníženy v čase 1 měsíc u 67% pacientů a u zhruba poloviny pacientů zůstaly sníženy po celou dobu pozorování. Naopak KIR receptory interagující s HLA-A či B (KIR3DL1/3DL2) vykazovaly zvýšenou expresi oproti původní hodnotě u 70% pacientů v prvním a druhém měsíci po transplantaci, 3 měsíce po transplantaci došlo u většiny subjektů ke snížení exprese těchto receptorů. Neprokázala se spojitost změn s původní expresí u dárce ani závislost na míře imunosuprese. Ve sledované skupině došlo u 3 pacientů k relapsu onemocnění, dynamika KIR exprese byla u těchto pacientů různá a neměla prediktivní hodnotu. Z našich výsledků vyplývá, že exprese KIR receptorů v potransplantačním období je dynamický proces, který bude záviset na mnoha faktorech a vyžaduje další sledování. Naše zjištění poukazuje na rozdílné chování KIR receptorů v závislosti na ligandu, který se na ně váže. Projekt byl podpořen grantem Ministerstva zdravotnictví číslo 15-30661A a projektem MŠMT č. LO1506.

P10.

Výroba personalizované protinádorové vakcíny na bázi dendritických buněk

Janovská E., Vidláková P., Zdražilová Dubská L., Pilátová K., Flajšarová L., Matoulková E., Múdry P., Mazánek P., Pavelka Z., Hlaváčková E., Černá D., Demlová R., Štěrbá J., Valík D. (Masarykova univerzita, lékařská fakulta, Brno; KDO FN, Brno)

Veškeré zajištění výroby, včetně vlastních postupů výroby personalizované protinádorové vakcíny, se řídí předpisy pro výrobu léčivých přípravků, tzv. „správnou výrobní praxí“ (VYR-32 Pokyny pro správnou výrobní praxi). Výrobu je možné provádět pouze v tzv. čistých prostorách a všichni pracovníci jsou povinni dodržovat tyto přísné požadavky. Dodržování těchto předpisů je v pravidelných intervalech kontrolováno Ministerstvem zdravotnictví - Státním ústavem pro kontrolu léčiv. Čisté prostory jsou speciálně navrženy a vybudované prostory, ve kterých je vzduchotechnikou a s pomocí vhodných stavebních materiálů regulována čistota vzduchu. Dodržováním přísných hygienických a sanitačních postupů je tak dosaženo požadovaného standardu čistoty nezbytného pro zajištění sterility

vyráběného produktu. Výroba se skládá ze dvou oddělených výrobních částí. V prvním kroku výroby se u vybraného pacienta sterilně, přímo na operačním sále, odebere nádorová tkáň do připravené nádoby s fyziologickým roztokem. Z nádorové tkáně se následně v čistých prostorách jejím nařezáním a mechanickým rozmělněním vytvoří buněčná suspenze, která je lyzována opakovaným zamražením v tekutém dusíku. Z lyzovaných buněk se do roztoku uvolní proteiny, které se zamrazí a uchovají v parách tekutého dusíku až pro potřeby výroby samotné protinádorové vakcíny. V druhém kroku výroby (samotná výroba protinádorové vakcíny) se odseparují na separátoru krevních buněk leukocyty pacienta, z nichž se následnou centrifugací (tzv. elutriací) oddělí populace monocytů. Monocyty se nasadí do kultivačních lahví v daném počtu a týden jsou kultivovány ve speciálním kultivačním médiu s přídavkem růstového a diferenciacního koktejlů, tím dojde k diferenciaci monocytů v nezralé dendritické buňky. V poslední den kultivace se k nezralým dendritickým buňkám přidají maturační cytokiny a připravené proteiny (antigeny) z odebrané nádorové tkáně (1. krok výroby) a pomocí tohoto koktejlů dendritické buňky dozrají. Jsou ihned „sklizeny“ z kultivačních lahví a zamrazeny v suspenzi s kryoprotektivním roztokem, který je chrání před poškozením nízkými teplotami. Jsou uloženy do par tekutého dusíku, až do dne vlastní aplikace pacientovi. Před aplikací pacientovi musí být provedena tzv. kontrola kvality vyrobené protinádorové vakcíny. Pokud vakcína splní předem schválená kritéria kvality, je uvolněna k použití a je možné ji aplikovat pacientovi.

P11.

Diagnostikujeme a léčíme správně lymfom z pláštových buněk?

Lenčová N., Žmolíková J., Starostka D., Uvířová M., Koláček D., Skalíková R., Šimová J., Měch R., Heranová P. (Oddělení klinické hematologie, Nemocnice s poliklinikou Havířov, p. o., Havířov; CGB laboratoř a.s., Ostrava – Vítkovice)

Úvod: Lymfom z pláštových buněk (MCL) je zralá B-lymfoidní neoplázie charakteristická overexpresí cyklinu D1 (event. cyklinu D2, D3 či E) a translokací t(11;14)(q13;q32). Vyskytuje se v některé ze 4 morfologických variant. Typický imunofenotyp je CD20+, CD5+, FMC7+, CD43+, bcl-2+, cyklin D1+, SOX-11+, CD23-. Klinický průběh onemocnění je variabilní a většinou agresivní. Léčebné výsledky zlepšuje v vhodných pacientů ASCT a postremisní udržovací léčba rituximabem. Charakteristika souboru: Soubor tvořilo 21 pacientů s histologicky verifikovaným MCL (14 mužů a 7 žen) s věkovým mediánem 68 let. Celkem bylo v průběhu choroby cytologicky, flowcytometricky, geneticky a histologicky analyzováno 42 vzorků: 17x periferní krev (PK), 17x kostní dřev (KD), 5x lymfatická uzlina, 2x cerebrospinalní likvor, 1x pleurální punktát.

Metodika vyšetření: Retrospektivní analýza nálezů cytomorfologie (světelná mikroskopie), průtokové cytometrie (multiparametrová analýza, metoda lyse-wash, cytometr BD FACS Canto II, kvalitativní a kvantitativní hodnocení povrchové exprese), histologie s imunohistochemií (CD20, CD5, CD23, CD10, cyklin D1), genetiky (cytogenetika KD, FISH PK/KD – t(11; 14), klinického stádia a indexu MIPI (Mantle cell International Prognostic Index) při diagnóze, léčebné odpovědi, průběhu choroby).

Výsledky: Cytomorfologie: Klasický typ MCL u 47.4 %, malobuněčná varianta u 23.6 %, pleomorfní varianta u 21.1 %, blastoidní varianta u 5.3 % a varianta podobná MZL u 2.6 % vzorků. Imunofenotyp: Povrchová pozitivita CD19, CD20 - 100 %, CD5+ 84.2 % vzorků, FMC7+ 84.2 % vzorků, CD38+ 81.6 % vzorků, CD43+ 26.3 % vzorků, CD11c+ 7.9% vzorků, CD23-, CD95-, CD103- 100 % vzorků, CD10+ u 1 vzorku, CD200 + u 2 vzorků. 1 z případů měl imunofenotyp příznačný pro CLL a 1 případ imunofenotyp charakteristický pro CD5- MZL (oba případy CD200+). Histologie s imunohistochemií: CD20+, cyklin D1+ a CD23- u všech případů, CD5- u 2 případů.

Genetika: Komplexní karyotyp s delecí TP53 a t(11;14) – 1 případ, t(11;14) v PK/KD (FISH z aspirátu či tkáňových řežů) – přítomna u 15 případů, nepřítomna u 5 pacientů (z toho u 3 pacientů nebylo histologicky prokázáno postižení KD), nevyšetřena u 1 pacienta. Klinické stádium: IIIIE – 1 případ, IV – 20 případů, postižení KD (cyklin D1) – 19 případů. MIPI: Nízké riziko - 2 případy, střední riziko – 5 případů, vysoké riziko – 14 případů. Pacienti s absencí t(11;14) v KD měli častější výskyt variantní cytomorfologie a MIPI low/int-risk v porovnání s pacienty s t(11;14).

Léčba: Primoterapie: režim na bázi R-CHOP 8x, R-CHOP/R-AraC 8x, sekvenční protokol s ASCT 3x. Udržovací léčba u 14 pacientů. Léčba relapsu nebo progresu: režim R-bendamustin 1x, FCR-lite 1x, R-HAM/EDHAP 1x, RCD 1x, R-CHOP 1x, R-AraC 1x. Léčebná odpověď po primoterapii: CR 13/19, PR 3/19, PD 3/19. Průběh onemocnění: Relaps 6x (3x CNS relaps po 1. CR). Indolentní průběh bez nutnosti léčby u 2 nemocných. Úmrtí u 9 nemocných (MCL 7x, ostatní 2x).

Závěr: Naše výsledky a recentní literární údaje naznačují, že CD5- forma MCL bez prokázání t(11;14) v KD a s pozitivitou cyklinu D1 vykazuje indolentní průběh onemocnění bez nutnosti léčby a souvisí s nízkým rizikem dle MIPI. Naopak MCL s komplexním karyotypem a delecí 17p13.1 (TP53) vykazuje předpokládaný vysoce agresivní průběh onemocnění a vysoké riziko dle MIPI. Diagnostickou translokací lze prokázat metodou FISH ve tkáňových řezech i v případech její absence v aspirátu KD. Diagnostika a léčba MCL musí být komplexní a individualizovaná. Pro určení prognózy a volbu správné léčby je nutno vzít v úvahu všechny dostupné údaje: klinické, cytomorfologické, histologické, genetické i imunofenotyp.

P12.

Anaplastický velkobuněčný lymfom – diagnostika a sledování minimální reziduální nemoci
Kalinová M., Hilská I., Mrhalová M., Kabičková E., Říha P., Prouzová Z., Kodet R. (Ústav patologie a molekulární medicíny 2.LF UK Praha a FN v Motole, Praha; Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK Praha a FN v Motole, Praha)

Anaplastický velkobuněčný lymfom (ALCL) je zařazen do skupiny T lymfomů. V případě ALK protein pozitivní ALCL dochází k patologické aktivaci onkogenu ALK ležícím na 2p23 (gen anaplastic lymphoma kinase). Aktivace je způsobena chromozomální translokací, při které vznikají fúzní geny s různými translokačními partnery. Nejčastěji (75 %) nacházíme translokaci t(2;5) (p23;q35), kdy dochází k fúzi s genem NPM (gen nukleofosmin). Cílem práce byla: 1) detekce nejčastějšího fúzního genu NPM/ALK 2) u pacientů bez prokázání fúze NPM/ALK bylo provedeno hledání translokačního partnera genu ALK pomocí metody 5´ RACE. 3) u všech ALK protein pozitivních ALCL jsme vyšetřili kvantitativně expresi translokované části genu ALK, která sloužila jak k diagnostice ALK pozitivních ALCL, tak ke sledování minimální reziduální nemoci (MRN). Výsledky genové analýzy jsme porovnávali s imunohistochemickým průkazem (IHC) exprese proteinu ALK a jeho lokalizací v buňce a dále s výsledky fluorescenční in situ hybridizace na interfázických jádrech (I-FISH). Hladiny MRN jsme porovnávali s klinickým průběhem onemocnění. Celkem jsme vyšetřili 70 pacientů s ALCL (2-80 let; medián 17 let) s IHC prokázanou expresí proteinu ALK. U 65 pacientů jsme vyšetřili zlom chromozomu 2, v oblasti 2p23 a ve všech případech byl zlom detekován. V 52 případech jsme detekovali fúzní gen NPM/ALK (74 %), v 5 případech ATIC/ALK, ve dvou případech CLTC/ALK, 1x jsme detekovali TPM4/ALK, TPM3/ALK, ALO17/ALK a MYH9/ALK. U 6 pacientů NPM/ALK negativních, ALK protein pozitivních jsme neměli dostatek materiálu (RNA) pro následné vyšetření metodou 5´ RACE. U všech vyšetřených pacientů (67) jsme detekovali vysokou hladinu exprese translokované části genu ALK s mediánem 55534 kopií, kterou jsme u 29 pacientů využili ke sledování MRN bez ohledu na přítomný fúzní gen v době diagnózy. Z 29 sledovaných pacientů šest podstoupilo transplantaci kostní dřevě. Celkem jsme vyšetřili 352 reziduálních vzorků (141xKD, 211xPK) s mediánem doby sledování 706 dnů. Hladina MRN korelovala s klinickým průběhem onemocnění. Molekulární diagnostika umožňuje detekovat translokační partnery genu ALK u ALK pozitivního ALCL. Kvantitativní detekce exprese translokované části genu ALK slouží jak k diagnostice ALK pozitivních ALCL, tak ke sledování MRN.

Podpořeno projektem (Ministerstva zdravotnictví) koncepčního rozvoje výzkumné organizace 00064203 (FN MOTOL) a OPK CZ.2.16/3.1.00/24022.

P13.

Využití interim 18F-FDG PET/CT pro prognostickou stratifikaci pacientů s primárním mediastinálním velkobuněčným B-lymfomem

Henzlová L., Koranda P., Procházka V., Papajík T., Zapletalová J. (Klinika nukleární medicíny, FN, Olomouc; Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc; Ústav lékařské biofyziky, LF UP, Olomouc)

Úvod: Pro primární mediastinální velkobuněčný B-lymfom (PMBCL) je typický rychlý nárůst velké nádorové masy v předním mediastinu. V době imunochemoterapie je 5-leté přežívání až 80-90 %, přesto u části pacientů dochází již v prvním roce po ukončení terapie k časnému relapsu, jehož prognóza je špatná. Pro stážování i monitorování léčby je široce využívána pozitronová emisní tomografie kombinovaná s výpočetní tomografií (PET/CT) s využitím 18F-fluorodeoxyglukózy (18F-FDG). Při jejím hodnocení se vedle vizuálního hodnocení používá také Deauvilleské skóre a procentuální pokles SUVmax.

Soubor a metodika: Retrospektivně bylo hodnoceno 44 pacientů s diagnózou PMBCL, u kterých bylo provedeno PET/CT před léčbou (26 pacientů) a interim PET/CT po 2-3 cyklech chemoterapie (36 pacientů). Nálezby byly hodnoceny vizuálně a pomocí Deauvilleské škály. Změřeny byly hodnoty SUVmax na vstupním a interim vyšetření a vypočten jejich procentuální rozdíl - Δ SUVmax.

Výsledky: Statisticky signifikantním prediktorem přežívání bez progresu nemoci (PFS) je Deauvilleské skóre při rozdělení na kategorie 1-3 a 4-5 ($p=0,028$). Pomocí ROC analýzy byla zjištěna optimální hodnota cut-off Δ SUVmax 68 %. Významný pokles metabolické aktivity nádorové tkáně s použitím této hodnoty i hodnoty uváděné v literatuře (Δ SUVmax 66 %) byl spojen se signifikantně vyšší předpokládanou dobou přežití ve srovnání se skupinou s Δ SUVmax ≤ 68 %, resp. Δ SUVmax ≤ 66 % (v obou případech $p=0,014$).

Závěr: Při hodnocení interim PET/CT u pacientů s PMBCL má hodnocení pomocí Deauvilleské 5-bodové škály lepší prognostickou hodnotu k určení PFS než prostě vizuální dichotomické hodnocení. Podobně silným prediktorem progression free survival (PFS) je i hodnocení interim PET/CT pomocí Δ SUVmax, a to jak s cut-off hodnotou 66 %, uváděnou v literatuře pro pacienty s DLBCL, tak s cut-off hodnotou 68 %, vypočtenou pro náš soubor pacientů.

P14.

Biologická léčba u pacientov s rezistentným/relabujícím T-NHL

Pizurová R. (KHaT UN, Martin – SK)

T-bunkové lymfómy sú, v porovnaní s B-bunkovými lymfómami, pomerne zriedkavé, tvoria približne 10-15% malígnych lymfómov. Najčastejšie sa vyskytujúcim typom T-bunkového lymfómu je periférny T-bunkový lymfóm (26%), ďalej sú to angioimunoblastický T-lymfóm (18%), systémový anaplastický veľkobunkový lymfóm (12%) a extranodálny NK/T-bunkový lymfóm nazálneho typu (10%). Ide o biologicky aj klinicky veľmi heterogénnu skupinu zriedkavých ochorení. Väčšina T-bunkových lymfómov sa vyznačuje agresívnym správaním a nepriaznivou prognózou. Príčína neuspokojivých liečebných výsledkov v tejto skupine malígnych lymfómov, v porovnaní s B-bunkovými lymfómami, nie je známa. I napriek relatívne vysokému počtu odpovedí na iniciálnu liečbu je problémom v manažmente vysoký výskyt relapsov. V snahe zlepšiť liečebné výsledky sa objavujú stále nové lieky. Cieľená liečba pomocou nových monoklonálnych protilátok otvorila novú kapitolu v možnostiach liečby malígnych lymfómov. Súčasťou tohto posteru je popis 2 pacientov s dg. T-NHL, typ systémový veľkobunkový anaplastický (ALCL), ktorým bola podaná biologická liečba brentuximab vedotínom.

P15.

Potenciál inhibice proteinu Chk1 u chronické lymfocytární leukémie s mutacemi v genu TP53

Boudný M., Zemanová J., Borský M., Hložková M., Malčíková J., Divišková E., Brychtová Y., Paruch K., Trbušek M. (Interní hematologická a onkologická klinika, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, Brno; Ústav Chemie, CZ Openscreen, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno)

Chronická lymfocytární leukémie (CLL) zůstává i přes nesporné pokroky nevléčitelným onemocněním. Vedle inhibitorů signalizace z B-buněčného receptoru (BCRi), které jsou již dobře etablovány v klinice, je v preklinickém testování řada dalších nadějných látek. Z nich mohou být obzvláště cenné ty, jež by dokázaly efektivně nebo dokonce přednostně eliminovat buňky s mutacemi v genu TP53. Příslušní pacienti s delecí 17p a/nebo mutací TP53 totiž tvoří i nadále skupinu s nejhorší prognózou. U primárních lymfocytů CLL s charakterizovanými defekty v genech TP53 a ATM (regulační kináza p53) jsme testovali efekt inhibice proteinu Chk1 (checkpoint kináze 1). Kináza Chk1 hraje důležitou roli v kontrolních bodech buněčného cyklu, zejména během replikace. V pilotní studii jsme tento potenciál testovali u 85 primárních kultur CLL, bez stimulace jejich proliferace. Aplikovali jsme inovativní a vysoce specifický inhibitor MU380, a vedle efektu na buněčnou viabilitu (test wst-1) jsme částečně analyzovali rovněž jeho mechanismus účinku. U naprosté většiny testovaných kultur vyvolal MU380 výrazný pokles viability a to již při aplikaci nízkých koncentrací inhibitoru (100-400 nM; doba působení 72 h). U nejvyšší použité dávky 400 nM byly mediány viability ve srovnání s neošetřenou kontrolou následující: 50 % u vzorků s defekty TP53 ($n=21$); 32 % u kultur s mutací ATM ($n=15$); 48 % u vzorků se samotnou delecí 11q (bez narušení druhé alely ATM; $n=16$); a 48 %

u kultur bez defektů (wt; $n=33$). CLL buňky s inaktivací TP53 tedy reagovaly stejně jako skupina wt a vzorky s inaktivací (mutací) ATM byly dokonce významně citlivější ($p=0,002$ oproti wt; ANOVA). Tyto efekty byly výrazně větší než v případě inhibitoru SCH900776 (klinicky testovaná sloučenina, ze které je inovativní inhibitor odvozen). Kontrolní zdravé mononukleární buňky z periferní krve ($n=2$) a kultury nenádorových fibroblastů ($n=3$) byly naopak inhibitorem MU380 postiženy jen mírně nebo vůbec. Koncentračně závislý nárůst apoptózy po aplikaci MU380 byl pak pozorován (dle flow-cytometrické analýzy Annexin V/PI) u dvou testovaných vzorků plné krve od pacientů s CLL odebraných do anti-koagulantu lepirudin. Protože analýza viability neprokázala rozdíl v reakci na MU380 mezi p53 mutovanými a p53-wt buňkami CLL, ověřovali jsme pomocí real time PCR, zda inhibitor vyvolává expresi pro-apoptotických genů p21, PUMA, BAX a GADD45 indukovanou proteinem p53. K této indukcii docházelo pouze po aplikaci fludarabinu (pozitivní kontrola), nikoli však MU380, což se zdá v souladu s hypotézou, že indukce apoptózy probíhá po inhibitoru p53-nezávislou cestou. A to navzdory skutečnosti, že inhibitor zjevně vyvolával v CLL buňkách zvýšený genotoxický stres, jak jsme prokázali analýzou proteinu γ -H2AX (marker dvouřetězcových zlomů DNA a replikačního stresu). V souhrnu, primární buňky CLL z periferní krve, které se nacházejí v G0/G1 fázi buněčného cyklu, byly překvapivě velmi citlivé k inhibitoru kinázy Chk1. Defekty v genu TP53 nevedly ke zvýšené rezistenci, zatímco inaktivace proteinu ATM byla dokonce spojena s prohloubenou citlivostí na inhibitor. To by teoreticky mohlo být v souladu se syntetickou letalitou v drahých reagujících na poškození DNA vyvolané společnou inaktivací signalizačních kináz ATM a Chk1. Inhibitor MU380 bude dále studován u CLL buněk stimulovaných k proliferaci. Práce byla podpořena projekty AZV 16-32743A, MUNI/A/1106/2016 a FNBr 65269705.

P16.

Ibrutinib moduluje expresi HLA-DR na leukemických buňkách pacientů s chronickou lymfocytární leukémií

Gabčová G., Manukyan Gayane, Papajík T., Gajdoš P., Mikulková Z., Urbanová R., Kraiczová V., Kudělka M., Turcsányi P., Ryznerová P., Kriegová E. (Ústav imunologie, FN a LF UP, Olomouc; Ústav molekulární biologie NAS RA, Yerevan – Armenia; Hemato-onkologická klinika LF UP a FN, Olomouc; Fakulta elektrotechniky a informatiky, Vysoká škola báňská - Technická univerzita, Ostrava)

ÚVOD: Ibrutinib, inhibitor Brutonovy tyrozinokinázy, představuje efektivní léčebnou modalitu pro pacienty s chronickou lymfocytární leukémií (CLL). Přestože se řada studií zabývá jeho imunomodulačním efektem, dosud nebyl studován jeho vliv na expresi HLA-DR, která představuje klíčovou molekulu pro nastolení účinné protinádorové imunitní odpovědi. CÍL: Studium vlivu ibrutinibu na expresi HLA-DR u CLL pacientů in vitro a in vivo.

METODY: Do studie bylo zahrnuto 27 pacientů s CLL a 14 věkově shodných zdravých jedinců. Expresie HLA-DR byla měřena pomocí průtokového cytometru BD FACSCanto II (Becton Dickinson) a kvantitativní RT-PCR byla použita k měření mRNA exprese. U 13 pacientů s CLL byl sledován vliv ibrutinibu in vitro; u 9 CLL pacientů byla exprese HLA-DR studována před a po podání ibrutinibu in vivo. Statistické testy byly provedeny pomocí softwaru GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc).

VÝSLEDKY: HLA-DR byl exprimován na leukemických buňkách a míra jeho exprese (MFI) se nelišila od exprese na nenádorových B-lymfocytech zdravých jedinců ($P>0,05$); vykazoval však vysokou variabilitu mezi pacienty s CLL. In vitro studie prokázala významné snížení exprese HLA-DR na leukemických buňkách získaných od pacientů s CLL kultivovaných 24h a 48 h s ibrutinibem ($P<0,001$). Pokles exprese HLA-DR byl prokázán i na úrovni mRNA. In vivo studie u pacientů léčených ibrutinibem prokázala snížení exprese HLA-DR v průběhu prvního měsíce léčby. Od třetího měsíce léčby se HLA-DR exprese u 6 z 9 CLL pacientů zvýšila na stejnou nebo vyšší úroveň než v době před zahájením léčby a u 3 pacientů zůstala snížená během celé doby sledování. Podobná změna expresního profilu HLA-DR byla také pozorována na T-lymfocytech u ibrutinibem léčených pacientů in vivo.

ZÁVĚR: Naše studie prokázala modulaci exprese HLA-DR na leukemických buňkách i T-lymfocytech získaných z periferní krve u CLL pacientů po podání ibrutinibu in vitro a in vivo. Další studie budou nezbytné k objasnění biologické podstaty a možných klinických dopadů těchto změn.

DEDIKACE: MZ ČR VES16-32339A, IGA_LF_2017-009, IGA_LF_2017-001

P17.

Expresní profilování chemokinových receptorů v periferních mononukleárních buňkách u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií

Petráčeková A., Gayane Manukyan, Papajik T., Fillerová R., Kraiczová V., Mikulková Z., Gabčová G., Urbanová R., Turcsányi P., Ryznerová P., Krůzová L., Schneiderová P., Kriegová E. (Ústav imunologie LF UP a FN, Olomouc; Hemato-onkologická klinika FN, Olomouc)

Chemokiny a jejich receptory jsou zapojené v regulaci migrace, proliferace a přežívání neoplastických buněk u chronické lymfocytární leukémie (CLL), současný výzkum prokázal také prognostický význam exprese CXCR4 a CXCR3 na vývoj onemocnění. Dosud však chybí znalost komplexního expresního profilu známých chemokinových receptorů u CLL. Cílem naší studie bylo popsat expresní profil 16 kanonických a 4 atypických chemokinových receptorů u CLL pacientů a jejich podskupin dle cytogenetických aberací. Studovali jsme genovou expresi v periferních mononukleárních buňkách u CLL pacientů (n=88) a zdravých jedinců (n=34) metodou vysokokapacitní kvantitativní RT-PCR (SmartChip, WaferGen Bio-systems). Expres CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR7 a CCR7 byla také studována metodou průtokové cytometrie. Mezi deregulovanými chemokinovými receptory bylo 5 receptorů (CCR7, CCR10, CXCR3, CXCR4, CXCR5) se zvýšenou expresí a 9 receptorů (CCR2-CCR6, CCR8, CCR12, CXCR1, CXCR2) se sníženou expresí; exprese ostatních se nelišily mezi CLL a kontrolní skupinou (P>0,05). U podskupiny pacientů s del(17p) jsme pozorovali vyšší mRNA expresi CXCR6, CXCR7 a CCR10 receptorů ve srovnání se skupinou pacientů s del(13q). Proteinová analýza chemokinových receptorů prokázala vyšší expresi CXCR4, CXCR5 a CCR7 u neoplastických B-buněk oproti normálním B-buňkám (P<0,05). Naopak u CXCR7 bylo detekováno významně nižší zastoupení u neoplastických buněk ve srovnání s normálními B-buňkami (P<0,05). Po srovnání MFI (střední hodnota intenzity fluorescence) mezi CLL pacienty a zdravými jedinci (n=20) byl zjištěn výrazný nárůst exprese u CXCR4 (P<0,001) a CCR7 (P<0,001) u CLL pacientů. Naše studie popsala komplexní obraz expresního profilu chemokinových receptorů v mononukleárních buňkách CLL pacientů a jejich podskupinách. Řada deregulovaných receptorů dosud u CLL nebyla popsána a studium jejich role v patogenezi CLL bude určitě předmětem dalšího výzkumu.

Grantová podpora: MZ ČR VES16-32339A, IGA_LF_2017_009, IGA_LF_2017_001.

P18.

Studium klonality AML v imunodeficientní myši

Kosařová Z., Čulen M., Ježíšková I., Folta A., Chovancová J., Loja T., Tom N., Semerád L., Šustková Z., Dvořáková D., Ráčil Z. (Interní hematologická a onkologická klinika, Fakultní nemocnice, Brno; Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, Brno; Středoevropský technologický institut (CEITEC), Masarykova univerzita, Brno)

Tabulka 1: Charakteristika odběrů analyzovaného souboru AML

Odběry	Počet pacientů	Počet klinických vzorků
Pouze diagnóza	6	6
Pouze relaps	1	1
Diagnóza + relaps	2	4
Diagnóza + primární rezistence	1	2
Celkem	10	13

kovanými u jejich štěpů po přijetí v myši umožňuje charakterizovat subklony s leukemogenním potenciálem.

Metody: Leukocyty z kostní dřeně 10 AML pacientů (tab. 1) byly intravenózně xenotransplantovány do ocasní žíly myši kmene NOD scid gamma v počtu 1 klinický vzorek na 2–4 myši. Přítomnost engraftmentu (>1% lidských leukocytů hCD45+) byla stanovena po 12–16 týdnech z kostní dřeně myši průtokovou cytometrií (FACSARIA II, BD Biosciences) a tyto buňky FACS-sortovány (FACSA-Verso, BD Biosciences) a použity pro izolaci DNA. Pro NGS (next generation sequencing) analýzu byl použit panel ClearSeq AML Haloplex HS (20 genů asociovaných s AML, Agilent Technologies) a přístroje MiSeq a NextSeq (Illumina).

Úvod: Akutní myeloidní leukémie (AML) představuje heterogenní skupinu onemocnění vyznačující se akumulací somatických genetických aberací a častou přítomností několika leukemických klonů současně. Pro in vivo studium AML je nejčastěji využíváno xenotransplantace leukemických buněk do imunodeficientních myši. Porovnání mutačních profilů klinických vzorků s mutacemi detekovanými u jejich štěpů po přijetí v myši umožňuje charakterizovat subklony s leukemogenním potenciálem.

Výsledky: NGS byly hodnoceny pomocí algoritmů VarDict, VarScan a Pindel. Hranice pro detekci mutací byla nastavena na 2% VAF (variant allele frequency). Pokud byla mutace detekována alespoň v jednom vzorku v průběhu sledovaného období, jsou uvedeny i mutace s nižší VAF.

Výsledky: NGS analýza byla provedena na 13 klinických vzorcích a odpovídajících xenograftech (celkem 37 myši). Fenotyp 12/13 transplantovaných vzorků představoval myeloidní engraftment (>80% CD33+ a/nebo CD34+ buněk z hCD45+), u 1 vzorku pak smíšený engraftment s >10% CD19+ B-lymfocytů. U klinických vzorků byly přítomny somatické mutace v 1–3 genech a to NPM1 (n=8), FLT3-ITD (n=7), DNMT3A (n=6), TP53 (n=2), NRAS (n=1), ASXL1 (n=1), U2AF1 (n=1), IDH2 (n=1), TET2 (n=1). V 7/13 vzorcích byly dané mutace identifikovány v odpovídajících myších se srovnatelným VAF. Změny v klonalitě byly pozorovány primárně na úrovni subklonů, ve třech vzorcích došlo po xenotransplantaci k expanzi subklonů nesoucích interní tandemové duplikace v genu FLT3 (nárůst VAF >10%). U jednoho vzorku z doby diagnózy se subklon s NRAS mutací uchytil pouze v 1/3 myši a to s nízkou frekvencí (klinický vzorek VAF=28,0% vs. xenograft VAF=1,5%), v čemž se engraftment podobal pozdějšímu relapsu AML u daného pacienta, při kterém byla NRAS mutace detekována s VAF=1,3%. Při xenotransplantaci klinického vzorku pacienta z doby diagnózy a relapsu, byl hlavní klon identifikován na základě přítomnosti mutací v genech NPM1 a DNMT3A, které byly zastoupeny ve většině buněk v době diagnózy (>30% VAF). Obě mutace byly rovněž detekovány v době relapsu i ve všech xenograftech. Dále byly detekovány FLT3-ITD mutace s nízkou VAF (<2%), které ukazovaly na výskyt 2 minoritních subklonů v době diagnózy a 3 v době relapsu, z nichž pouze 1 se vyskytoval v obou odběrech. V xenograftech odvozených z buněk tohoto pacienta byly pozorovány pouze některé z daných subklonů a navíc nové FLT3-ITD mutované subklony, které se nenacházely v odpovídajících klinických vzorcích.

Závěr: Výsledky naznačují, že NOD scid gamma myši jsou vhodným modelem pro simulaci klonality AML, přičemž fenotyp i mutační spektrum uchycených AML xenograftů v našem souboru odpovídaly původnímu stavu v klinických vzorcích. Rozdíly byly pozorovány pouze v uchycení minoritních subklonů, což bylo zřejmě dáno jejich odlišnou proliferací kapacitou. Xenotransplantace většího souboru párových vzorků diagnóza-relaps může ukázat, nakolik tato klonální selekce v myši koresponduje s pozdějším vývojem onemocnění u pacienta.

Podpořeno z projektu MUNI/A/1106/2016 a z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. 15-25809A. Veškerá práva podle předpisů na ochranu duševního vlastnictví jsou vyhrazena.

P19.

CSPG4/NG2 - potenciální význam pro sledování molekulární zbytkové nemoci u vzácného nádoru z blastických plasmacytoidních dendritických buněk

Hisemová M., Petrboková R., Pešek A., Šálek C., Hájková H., Marková M., Novotová E., Mertová J., Soukup P., Novák J., Válková V., Vydra J., Nováková L., Vítek A., Cetkovský P., Marinov I., Polák J. (Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha; FNKV, Praha)

Úvod: Nádor z blastických plasmacytoidních dendritických buněk (BPDCN) je vzácnou hematologickou malignitou s agresivním průběhem a špatnou prognózou. Jeden z hlavních prognostických faktorů je odpověď na terapii a míra zbytkové nemoci (MRN). Vzhledem k „unikátnímu“ fenotypu, multiparametrová průtoková cytometrie (MFC) je vhodnou metodou pro detekci a sledování MRN. V literatuře existuje omezené množství dat ohledně molekulární podstaty onemocnění a možnosti detekce a sledování MRN. Cíl. Primárním cílem bylo charakterizovat expresní profil vybraných genů a definovat vhodný molekulární marker pro detekci a sledování MRN. Pacienti a metody. Studie zahrnuje 4 pacienty diagnostikované v období 2009 – 2016 (35r. F.T., 53 r. Š.M., 44 r. S.P., 66 r. Š.J.). Pacienti dosáhli hematologické remise po intenzivní indukční chemoterapii (ALL-like nebo AML-like) u dvou z nich byla následně provedena alogenní transplantace. MRN status byl definován na základě sledování leukemického fenotypu (LAIP) CD45d,CD4+,CD43+,CD56+,CD123+ metodou MFC. Pro nízkou expresi WT1 genu, byla studována exprese 11 vybraných antigenů asociovaných s leukémií (LAA), dále byla kvantifikována exprese dalších 7 genů vytvářených na základě údajů z již publikované kazuistiky. Genová exprese byla měřena pomocí TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems). Výsledky relativní exprese a kvantifikace byly vyhodnoceny pomocí 2-ΔΔCt metody RT-qPCR s kontrolním genem ABL. Získaná data metodou PCR byla porovnáována s výsledky MFC analýzy

a s klinickým průběhem. Výsledky kvantifikace exprese genů. U všech 4 pacientů byla nalezena vysoká exprese genu chondroitin sulphate proteoglycan 4/ neuro-glial protein CSPG4/NG2 a to o 1 – 2 řády vyšší než horní normální limit. Imunofenotypizační MRN negativita vždy korelovala s nízkou expresí markéru.

Závěr: Předběžné výsledky analýzy exprese 11 vybraných LAA poukazují na potenciální význam CSPG4/NG2 proteinu pro sledování molekulární zbytkové choroby u pacientů s BPDCN.

Podpořeno institucionálním grantem 00023736, MZ ČR.

P20.

Význam průtokové cytometrie v diagnostice myelodysplastického syndromu

Zábranská T., Holubová M., Lysák D., Jindra P. (Hematoonkologické odd. FN, Plzeň)

Úvod: Myelodysplastický syndrom (MDS) je heterogenní soubor klonálních poruch krvetvorby s dominující neefektivní hemopoezou a morfológickou dysplazií krvetvorných buněk se současnou periferní cytopenií v jedné či více řadách. Diagnostika se opírá především o kombinaci morfológického a cytogenetického vyšetření kostní dřeně.

Cíl: ověřit význam průtokové cytometrie (FCM) v diagnostice MDS ve srovnání s morfológickým vyš. kostní dřeně a cytogenetikou.

Soubor pacientů: Provedli jsme retrospektivní analýzu u 28 pacientů konsekutivně vyšetřovaných v letech 2016-2017 pomocí FCM pro susp. MDS na základě morfológického vyšetření kostní dřeně. V souboru bylo 15 žen a 13 mužů, medián věku byl 66 let (7-90).

Metoda: Pomocí FCM byl analyzován vývoj charakteristických povrchových znaků a event. přítomnost aberantní exprese povrchových znaků na monocyttech (CD14/CD64/CD11b/HLA-DR/CD56), granulocytech (CD16/CD10/CD11b/CD13/HLA-DR) a myeloidních progenitorech (CD117/CD34/HLA-DR, CD7/CD19/CD56). Vyšetření bylo provedeno na průtokovém cytometru BD FACS Canto II, analýza v software Diva. Pro vyhodnocení byl použitý MDS skórovací systém dle Ogata K et al. (FACS skóre 0-4, FACS MDS status A-C).

Výsledky: Sledovali jsme korelaci mezi FCM skórováním a morfológickým hodnocením myelodysplastických změn kostní dřeně, změnami v krevním obraze, prognostickým rizikem cytogenetických změn a rizikovou kategorií dle IPSS-R. U všech pacientů (28/28) byly morfológicky zaznamenány dysplastické změny různého stupně. Pouze diskrétní myelodysplastické změny v jedné či více řadách byly přítomny u 6/28 (21%) a prezentovaly se FACS MDS statutem A (4/6,67%), A/B (2/6,33%), B/C (0/6,0%), C (0/6,0%) a FACS skóre 0 (5/6,83%), 1 (1/6,17%), 2 (0/6,0%), 3 (0/6,0%). MDS-SLD byl diagnostikován u 3/28 (11%) pacientů, z toho 2/3 vykazovali dysplastické změny v erytrocytární řadě a 1/3 v granulocytoární řadě. Pomocí FCM byl identifikován FACS MDS status A (1/3,33%), A/B (1/3,33%), B/C (1/3,33%), C (0/3,0%) a FACS skóre 0 (0/3,0%), 1 (2/3,67%), 2 (1/3,33%), 3 (0/3,0%). MDS-MLD byl zastižen u 16/28 (57%) pacientů s odpovídajícím FACS MDS statutem A (0/16,0%), A/B (1/16,6%), B/C (3/16,19%), C (12/16,75%) a FACS skóre 0 (3/16,19%), 1 (4/16,25%), 2 (5/16,31%), 3 (4/16,25%). Pacienti s MDS EB-2 (3/28; 11%) vykazovali FACS MDS status A (0/3,0%), A/B (0/3,0%), B/C (0/3,0%), C (3/3,100%) a FACS skóre 0 (0/3,0%), 1 (0/3,0%), 2 (2/3,67%), 3 (1/3,33%). Byla zaznamenána významná korelace mezi mírou vyjádření myelodysplastických změn na základě morfológického vyšetření a hodnotou FACS MDS statusu i FACS skóre ($r = 0,85$, resp. $r = 0,61$, $p < 0,05$). Při hodnocení změn v krevním obraze byla u 15/24 pacientů (u 4 pacientů nebyly hodnoty krevního obrazu k dispozici) přítomna anemie s distribucí FACS MDS statusu A (1/15,7%), A/B (1/15,7%), B/C (2/15,13%), C (11/15,73%) a FACS skóre 0 (3/15,20%), 1 (3/15,20%), 2 (4/15,27%), 3 (5/15,33%). Byla zaznamenána významná korelace mezi hodnotou FACS MDS statusu a přítomností anemie ($r = 0,66$, $p < 0,05$), při porovnání s ostatními parametry krevního obrazu či s počtem cytopenií v krevním obraze nebyla nalezena významná korelace. Nepodařilo se prokázat závislost mezi hodnotou FACS skóre, resp. FACS MDS statusu a míry cytogenetického rizika či kategorie dle IPSS-R.

Závěr: Morfológické vyšetření u MDS je zatíženo chybou subjektivního hodnocení a cytogenetické vyšetření v řadě případů vykazuje normální karyotyp. Na základě naší analýzy je FCM metodou přispívající k zpřesnění diagnostiky MDS, která vyžaduje komplexní diagnostický přístup. Naším cílem je další sledování a vytvoření většího souboru pacientů s možností lepšího statistického zhodnocení.

Práce byla podpořena grantem MZ ČR-RVO (Fakultní nemocnice Plzeň-FNPI, 00669806).

P21.

Léčba azacytidinem ve Fakultní nemocnici Hradec Králové – zkušenosti centra

Kupsa T., Bělohávková P., Víšek B., Horáček J. M., Žák P. (IV. interní hematologická klinika, FN, Hradec Králové; KVVLVH, FVZ, Hradec Králové)

Úvod: Léčebné možnosti pacientů s myelodysplastickým syndromem (MDS) vysokého rizika jsou omezené. Jednou z možností je podávání hypometylačních látek – v podmínkách našeho pracoviště azacytidinu.

Cíl: Posoudit efektivitu a bezpečnost léčby azacytidinem u nemocných s MDS ve Fakultní nemocnici Hradec Králové.

Metodika: Byl studován soubor 42 pacientů (28 mužů a 14 žen) s MDS vysokého rizika (intermediate-2 a high-risk dle IPSS), léčených na našem pracovišti v letech 2009 – 2016. Léčebná odpověď byla posuzována dle IWG kritérií.

Výsledky: U 13 nemocných se jednalo o léčbu před provedením alogenní transplantace krvetvorných buněk (aloT). Tito jedinci byli signifikantně mladší ve srovnání s ostatními jedinci souboru ($60,7 \pm 4,4$ vs. $69,6 \pm 5,0$ let). Ve 2 případech byli nemocní léčeni pro relaps MDS po aloT. Azacytidin byl podáván v dávce 75mg/m² v prvních 7 dnech cyklu, redukce dávky minimálně v 1 cyklu azacytidinu byla nutná u 18 nemocných. Celkem bylo podáno 208 cyklů azacytidinu. Kompletní remise bylo dosaženo u 3 nemocných (7%), léčebné odpovědi umožňující pokračování v léčbě azacytidinem bylo dosaženo u 76% léčených jedinců. Před zahájením léčby bylo vstupní ANC < 1000/μl u 48% nemocných, přesto se komplikace v souvislosti s léčbou azacytidinem vyskytly jen v 8 případech. Nebylo zaznamenáno úmrtí v přímé souvislosti s podáním azacytidinu.

Závěr: Azacytidin může být podáván v léčbě MDS vysokého rizika samostatně, jako bridging k aloT, tak při relapsu onemocnění po aloT. Většina nemocných dosáhne léčebné odpovědi, kompletní remise na léčbě jsou vzácné. Léčba azacytidinem je bezpečná i při nízkých počtech granulocytů a je dobře tolerována většinou nemocných.

P22.

Využití hmotnostní cytometrie k analýze dětské akutní lymfoblastické leukémie s přesmykem do monocytární linie

Vášková M., Kužilková D., Thurner D., Kalina T., Hrušák O., Mejstříková E. (CLIP, Klinika dětské hematologie a onkologie, 2.LF UK a FN Motol, Praha)

Transdiferenciace blastů B prekurzorové akutní lymfoblastické leukémie (BCP ALL) do monocytární linie je fenomén asociovaný s některými genotypovými aberacemi jako je např. delece genu ERG nebo byl pozorovaný u části pacientů léčených anti-CD19 cílenou léčbou (blinatumomab nebo CAR-T buňky). Tato změna imunofenotypu leukemických buněk, ke které dochází v časně fázi léčby, komplikuje stanovení hladiny minimální reziduální nemoci (MRN), která je ve své současné podobě cílena na buňky s imunofenotypem B prekurzorů. Buňky monocytárního charakteru, ve kterých jsou u těchto pacientů detekovatelné přestavby imunoreceptorových genů shodné s leukemickými blasty, této analýze unikají a výsledkem je diskrepance s molekulárně geneticky stanovenou hladinou MRN. Cílem projektu je sestavení panelu protilátek určeného k analýze této vzácné podskupiny dětských BCP ALL metodou hmotnostní cytometrie. Hmotnostní cytometrie je metoda, která využívá k detekci proteinů na buněčné úrovni, stejně jako průtoková cytometrie, monoklonální protilátky. Ty však nejsou označeny fluorescenčními značkami ale izotopy vzácných prvků, které se v buňkách normálně nevyskytují. Použití těchto značek eliminuje omezení průtokové cytometrie způsobené přesvitěním fluorescenčních značek, autofluorescencí buněk a počtem laserů, resp. detektorů. Umožňuje tak měřit desítky proteinů na úrovni jedné buňky najednou (prakticky bylo použito kolem 40 znaků a je možné počet zvýšit až na 100 v závislosti na dostupnosti purifikovaných značek). Přístroj CyTOF2 využívá hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS, Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry). Roztok obsahující buňky je v přístroji rozdělen a kapičky s jednotlivými buňkami jsou rychle odpařeny ve vysokoteplotním plazmatu (7000 K). Tím se přeruší všechny chemické vazby a vzniká směs jednotlivých atomů. Směs atomů je zároveň ionizována a převedena do prostředí vysokého vakua, kde dochází k detekci iontů. Ionty jsou vedeny tak, aby na detektor dopadaly v pořadí dle jejich hmotnosti. Tím je

umožněno rozlišit a kvantifikovat jednotlivé typy iontů. Změřené množství jednotlivých prvků původně navázaných na protilátky tak odpovídá množství proteinu přítomného v buňce. Touto metodou lze získat komplexní data, která umožňují analyzovat heterogenitu testovaných vzorků a pokročilou analýzou zhodnotit vztahy mezi buněčnými podtypy a případně odhalit nové minoritní subpopulace. Byl sestaven panel protilátek, který umožňuje sledovat dynamiku liniových přesmyků a je určen k následné analýze imunofenotypu fyziologických monocytů a monocytů transdiferencovaných z leukemických buněk. Obsahuje znaky definující B prekurzory (CD19, CD10, CD20, CD34, CD45, CD38), znaky, jejichž exprese na leukemických buňkách při diagnóze může případný přesmyk předpovědět (CD2, CLL1, VNN2) a především řadu myeloidních/monocytárních znaků (CD4, CD13, CD14, CD15, HLA DR, CD117, CD11b, CD11c, CD33, CD64, CD16, CD163, CD206, CD32, CD56, CD116). Byla provedena analýza několika pilotně změřených vzorků, jak při diagnóze, tak v průběhu následného liniového přesmyku. Je zřejmé, že pomocí hmotnostní cytometrie lze zachytit imunofenotyp přechodných stádií mezi leukemickými buňkami B linie a monocyty. U leukemických buněk monocytárního charakteru lze hodnotit jejich komplexní imunofenotyp ve vztahu k fyziologickým monocytům. Další analýzy budou směřovat k nalezení znaků, které tyto populace pomohou vzájemně odlišit. Práce byla podpořena z grantů AZV 15-26588A, UNCE 204012, NPU I LO1604.

P23.

Využití NGS technologie pro monitorování MRD u ALL pacientů – pilotní studie

Hrochová K., Petrová L., Vrbacký F., Horáček J., Šimkovič M., Žák P. (Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Fakultní nemocnice, Hradec Králové; IV. interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice, Hradec Králové)

Sledování minimální reziduální nemoci (MRN) je nejdůležitější prognostický faktor pro další stratifikaci léčby pro dětské i dospělé pacienty s akutní lymfoblastickou leukémií (ALL). Standardní metodou pro stanovení MRN je kvantitativní real-time PCR (RQ-PCR) přestavěb imunoglobulinového (IG) nebo T-buněčného receptoru. Tato metoda umožňuje sledovat pouze patologickou klonální přestavbu přítomnou v době diagnózy. Díky rychlému rozvoji masivního paralelního sekvenování můžeme využít tuto technologii nejen pro stanovení MRN, ale také pro sledování IG/TR klonálního vývoje. NGS nám dovoluje nahlédnout na celý B nebo T buněčný repertoár. Cílem našeho projektu je využití NGS technologie pro monitorování MRD u dospělých ALL pacientů.

Metoda: Klonální přestavba v době záchytu byla identifikována Sangerovým sekvenováním a byla dále sledována při NGS MRN analýze. Amplikonová knihovna pro masivní paralelní sekvenování je připravována pomocí Biomed2 primerů. Midování vzorků se provádí Multiplicom MID kitem. Pair end sekvenace probíhá na přístroji MiSeq Illumina. Pro analýzu hrubých dat používáme vlastní pipeline a on-line software Vidjil (<http://www.vidjil.org>).

Výsledky: V současné době sledujeme 15 dospělých ALL pacientů. Vzorky jsou odebírány dle standardního léčebného protokolu. Identifikaci diversity B repertoáru provádíme na základě CDR3 sekvence. Citlivost metody záleží nejen na hloubce čtení, ale také na množství přidané gDNA do PCR. **Závěr:** Implementace NGS technologie pro monitorování MRN u ALL pacientů do rutinní klinické praxe stále vyžaduje standardizaci a validaci metody. Zároveň má vysoké nároky na technickou vyzrállost laboratoře a na hluboké znalosti imunologie a molekulární biologie laboratorních pracovníků. Klíčové je zpracování dat, které by měl navrhnout či provádět zkušený bioinformatik. Tato metoda přináší možnost sledování diversity případně klonálního vývoje B/T buněčného repertoáru.

P24.

Serum levels of cytokines and adhesion molecules and their association with prognostic factors in newly diagnosed ALL

Horáček J. M., Kupsa T., Vaněk J., Jebavý L., Žák P. (Department of Military Internal Medicine and Hygiene, University of Defence, Faculty of Military Health Sciences, Hradec Králové; Department of Informatics and Quantitative Methods, Faculty of Informatics and Management, University of Hradec Kralove; Department of Internal Medicine IV – Hematology, University Hospital and Charles University, Faculty of Medicine, Hradec Kralove)

Background: Dysregulated production of cytokines and adhesion molecules has been implicated in the onset and progression of various types of leukemia. Further knowledge gained from multiple cytokine and adhesion molecule evaluation could help to improve treatment outcomes. The aim of this study was to evaluate baseline levels of cytokines, cytokine receptors and adhesion molecules in newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients and to assess their correlation with baseline characteristics and prognostic factors.

Methods: A total of 30 newly diagnosed ALL patients (median age 46, range 22–75 years, 20 males) were included in this study. We evaluated serum levels of 31 analytes, specifically 21 cytokines, 4 soluble cytokine receptors, 5 soluble adhesion molecules and Matrix Metalloproteinase-9. From cytokines, we measured Interleukins (IL-1 α , IL-1 β , 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- γ (IFN- γ), Macrophage Inflammatory Protein-1 α (MIP-1 α), Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), Tumour Necrosis Factor- α (TNF- α), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and soluble receptors for IL-2 (sIL-2R α), IL-6 (sIL-6R), TNF- α type I and II (sTNFR-1,2). From soluble adhesion molecules, we measured E-Selectin (E-SEL), L-Selectin (L-SEL), P-Selectin (P-SEL), Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1). All analytes were measured by biochip array technology on Evidence Investigator analyzer (Randox). Serum levels of tested analytes were correlated with baseline characteristics and prognostic factors, such as age, sex, risk group according to GMALL (SR 9, HR 9, VHR 12 patients), full blood count parameters (including percentage of blasts), biochemical parameters (LDH, CRP), response to induction therapy (CR rate after induction), progression-free survival (PFS) and overall survival (OS). Statistical evaluation was done by a professional statistician using software R 3.3.2 (R Core Team 2016).

Results: Comparing analytes with baseline characteristics, we found significant negative correlations between IL-7 and leukocyte count ($r=-0.633$; $p=0.032$), percentage of blasts in peripheral blood ($r=-0.695$; $p=0.004$) and LDH ($r=-0.604$; $p=0.075$). Furthermore, we found significant positive correlations between IL-7 and platelet count ($r=0.801$; $p<0.0001$), VCAM-1 and LDH ($r=0.664$; $p=0.012$). Correlations with baseline risk stratification according to GMALL did not reach statistical significance. In the study population, CR rate after induction was 86% (MRD negative in 29%), 1-year PFS 68% and 1-year OS 73% (2 patients died during induction therapy). Higher levels of EGF were associated with failure to achieve CR after induction therapy ($r=0.686$; $p=0.073$). So far, no significant correlations between baseline analyte levels and inferior PFS or OS were found. In newly diagnosed ALL patients, we found statistically significant correlations between sTNFR-1 and sTNFR-2 ($r=0.805$; $p<0.0001$), IL-1 α and IL-4 ($r=0.700$; $p=0.008$), sTNFR-2 and MIP-1 α ($r=0.657$; $p=0.037$), sTNFR-2 and VCAM-1 ($r=0.652$; $p=0.044$). Other correlations between analytes did not reach statistical significance.

Conclusion: Our findings show that serum levels of IL-7 and VCAM-1 are associated with some baseline characteristics of newly diagnosed ALL patients and EGF with response to induction therapy. Better understanding of leukemia microenvironment is essential for development of new treatment approaches. Further studies in this field are warranted.

The work was supported by a long-term organization development plan 1011 (FMHS) and MH CZ – DRO (UHHK, 00179906).

P25.

Vysoké hladiny mRNA pro Fli-1 a cereblon v mononukleárních buňkách pacientů MDS s del(5q) a trizomií chromozomu 8

Fuchs O., Polák J., Bokorová R., Kostečka A., Vostrý M., Jonášová A., Šišková M., Stopka T., Lauermannová M., Čermák J., Šálek C., Soukupová Maaloufová J., Mikulenková D., Březinová J., Zemanová Z., Michalová K., Neuwirtová R. (Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha; VFN, Praha)

Úvod: Transkripční faktor Friend leukemia virus integration-1 (Fli-1) náleží do skupiny transkripčních faktorů ETS (pojmenovaných podle specifické sekvence charakteristické pro transformaci retrovirem E26 ptačí erytroblastozy), které se vyznačují společnou sekvencí vazebné oblasti v DNA (5'-GGAA/T-3'). Fli-1 hraje důležitou úlohu v tvorbě krevních buněk z pluripotentních kmenových buněk a ve vývoji a diferenciaci megakaryocytů. Fli-1 inhibuje erytroidní diferenciaci a indukuje megakaryocytární diferenciaci společného megakaryocytárního a erytroidního progenitoru (MEP). Cereblon (CRBN) je receptor pro substrát v komplexu kulin 4 RING E3 ubikvitinligázy. Porovnali jsme hladiny mRNA pro Fli-1 a CRBN mRNA v mononukleárních buňkách kostní dřeně (BM)

a periferní krve (PB) pacientů MDS s izolovanou delecí dlouhého raménka 5. chromozomu [27 BM a 44 PB vzorků], pacientů MDS s del(5q) a trizomií 8 ve dvou nezávislých klonech [14 BM a 16 PB], pacientů MDS s trizomií 8 [22 BM a 18 PB vzorků], pacientů MDS s normálním karyotypem [39 BM a 53 PB vzorků] a zdravých kontrol [29 BM a 63 PB vzorků].

Metody: Mononukleární buňky byly izolovány separací pomocí centrifugace na gradientu Ficoll-Paque PLUS, promytím fosfátovým roztokem (PBS) a lýzou buněk červené řady. Analyzovali jsme expresi genu pro CRBN na úrovni mRNA pomocí kvantitativní TaqMan PCR z celkové cDNA za použití primerů v exonech 9 a 10 a sondy na exon 9. Hladina mRNA pro Fli-1 a glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenázu (GAPDH) byla také stanovena TaqMan PCR.

Výsledky: Nalezli jsme vysoké hladiny mRNA pro CRBN a Fli-1 v mononukleárních buňkách kostní dřeně a periferní krve pacientů MDS s del(5q) a trizomií 8 jako u pacientů MDS s izolovanou del(5q). Hladiny CRBN mRNA byly také zvýšené u pacientů MDS s trizomií 8. Vysoké hladiny CRBN mRNA a proteinu CRBN jsou důležité pro účinnost terapie lenalidomidem. Vysoká hladina CRBN mRNA u pacientů s trizomií 8 odpovídá výsledku studie Sugimoto et al. (J Hematol Oncol 5, 4, 2012), kde zjistili, že pacienti MDS normálním chromozomem 5 a trizomií 8 byli citliví na terapii lenalidomidem. Také jsme našli, že lenalidomid snižuje hladinu Fli-1 mRNA v mononukleárních buňkách většiny pacientů MDS s del(5q) odpovídajících na terapii lenalidomidem. Na modelu linie lidských MDS-L buněk, získaných od prof. Tohyama, Kawasaki Medical School, Japonsko, jsme ukázali, že inhibice Fli-1 pomocí polyetherového antibiotika a transportéru vápníku kalcimycinu (A23187), produkovaného bakteriemi rodu *Streptomyces chartreusensis*, snižuje hladinu E3 ubikvitinligázy HDM2. Tento nálezn odpovídá studii Truonga et al. (Oncogene 24, 962-9, 2005), kde Fli-1 stimuloval expresi MDM2 na transkripční úrovni. Zvýšení hladiny E3 ubikvitinligázy HDM2 jako odpověď na vysokou hladinu Fli-1 by mohlo být klíčovým mechanismem pro efektivní megakaryopoézu u MDS pacientů s del(5q) nebo s del(5q) a trizomií 8. Zvýšená hladina HDM2 by snížila hladinu p53 v megakaryocytech polyubikvitinylací p53 a jeho zvýšenou degradací v proteazomech a ochránila tak megakaryocyty před ribozomální stresem, který vede k apoptóze buněk červené řady.

Závěr: Potvrdili jsme důležitou úlohu vysokých hladin mRNA pro Fli-1 a CRBN pro dobrou odpověď pacientů MDS s del(5q) a s del(5q) a trizomií 8 ve dvou nezávislých klonech na terapii lenalidomidem. Práce byla podpořena MZ ČR - výzkumný projekt pro koncepční rozvoj výzkumné organizace (00023736; ÚHK, Praha), grantovou agenturou UK-projekt č. 924616, MZ ČR 0064165 a ProgresQ28.

P27.

Vysoká hladina cereblonu na úrovni mRNA i proteinu je důležitá pro účinnost lenalidomidu u nízkorizikových pacientů MDS

Fuchs O., Polák J., Bokorová R., Kostečka A., Vostrý M., Neuwirtová R., Šišková M., Stopka T., Lauermannová M., Šálek C., Soukupová Maaloufová J., Mikulenková D., Čermák J., Březinová J., Zemanová Z., Michalová K., Jonášová A. (Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha; VFN, Praha)

Úvod: Ukázali jsme, že vysoká hladina cereblonu (CRBN) mRNA o plné délce v mononukleárních buňkách kostní dřeně a periferní krve pacientů s myelodysplastickým syndromem (MDS) o nižším riziku transformace do akutní myeloidní leukemie (AML), závislých na transfuzích a s izolovanou delecí krátkého raménka 5. chromozomu je důležitá pro účinnost lenalidomidu u těchto pacientů (Eur J Hematol 95, 27-34, 2015). Nyní předkládáme výsledky, které svědčí pro důležitost vysoké hladiny CRBN mRNA o plné délce a odpovídajícího proteinu také v mononukleárních buňkách kostní dřeně a periferní krve pacientů MDS s normálním chromozomem 5 a nižším rizikem transformace do AML pro účinnost lenalidomidu u těchto pacientů.

Metody: Mononukleární buňky byly izolovány separací pomocí centrifugace na gradientu Ficoll-Paque PLUS, promytím fosfátovým roztokem (PBS) a lýzou buněk červené řady. Analyzovali jsme expresi genu pro CRBN na úrovni mRNA pomocí kvantitativní TaqMan PCR z celkové cDNA za použití primerů v exonech 9 a 10 a sondy na exon 9. Hladina proteinu CRBN byla detekována Western blotem a imunodetekcí s odpovídající protilátkou.

Výsledky: Pouze jeden pacient z 10 analyzovaných pacientů MDS s normálním chromozomem 5, kteří byli v rámci studie na terapii lenalidomidem dosáhli nezávislosti na transfuzích. Tento pacient s refrakterní anémií, prstenčitými sideroblasty a trombocytózou (RARS-T) bez mutace JAK2 V617F a s normálním karyotypem měl vysokou hladinu CRBN mRNA a proteinu CRBN v mononukleárních buňkách. Ostatní pacienti MDS s normálním chromozomem 5 měli nízkou hladinu CRBN mRNA v mononukleárních

buňkách a neodpovídali na terapii lenalidomidem. Také jsme potvrdili na dalších pacientech s izolovanou delecí chromozomu 5, že prudký pokles hladiny cereblonu mRNA v mononukleárních buňkách během terapie lenalidomidem je spojen se ztrátou citlivosti na lenalidomid a s progresí onemocnění. **Závěr:** Ukázali jsme, že vysoká hladina CRBN mRNA a proteinu CRBN je důležitá pro odpověď pacientů MDS s nižším rizikem transformace do AML na lenalidomid a pro dosažení nezávislosti na transfuzích. Tato práce byla podpořena výzkumným projektem pro koncepční rozvoj výzkumné organizace (00023736; ÚHK, Praha), grantovou agenturou UK-projekt č. 924616, MZ ČR 0064165 a ProgresQ28.

P28.

CALR mutační profil pacientů se suspektní Ph-negativní myeloproliferací

Sláviková M., Šimová J., Kubová B., Mazurová J., Měch R., Žmolíková J., Kantorová B., Vrzalová Z., Skalíková R., Heranová P., Uvírová M., Pospíšilová Š., Doubek M. (Sofigen spol. s.r.o., Brno; CGB laboratoř a.s., Ostrava; CEITEC Masarykova univerzita, Brno)

Úvod: Do skupiny chronických Ph-negativních myeloproliferativních neoplázií (MPN) řadíme polycytemii vera (PV), esenciální trombocytémii (ET) a primární myelofibrózu (PMF). V roce 2013 byly detekovány aberace v 9. exonu genu calreticulin (CALR). Celkově bylo zaznamenáno více než 50 typů různých mutací CALR v souvislosti s MPN. Alterace v exonu 9 CALR genu se vyskytují přibližně u 20-25 % pacientů s ET nebo PMF. Nejčastěji, a to ve více než 80 % případů, se jedná o delecii 52-bp (c.1092_1143del, p.L367fs*46) označovanou jako typ 1 a 5-bp inzerci (c.1154_1155insTTGTC; p.K385fs*47) označovanou jako typ 2 mutace.

Metodika: Do analýzy bylo zahrnuto 231 vzorků pacientů se suspektní Ph-negativní myeloproliferací. DNA byla izolována převážně z periferní krve popř. granulocytů. Analýza mutací v exonu 9 genu CALR byla provedena pomocí Sangerova přímého sekvenování. **Výsledky:** Na základě výsledků sekvenační analýzy jsme detekovali mutace v genu CALR u 18,2 % analyzovaných vzorků (42/231). Nejčastěji byla detekována alterace označovaná jako typ 1 a to ve třídavaceti případech (10 %) a mutace typ 2 v jedenácti případech (4,8 %). U osmi vzorků byl detekován jiný typ mutací než typ 1 a 2. Rovněž jsme detekovali 3 typy mutací, které nebyly dosud publikované/ uvedené v COSMIC databázi a ani v dostupné literatuře.

Závěr: Frekvence i typy nalezených mutací v CALR genu jsou v našem analyzovaném souboru lehce nižší, než uvádí publikované údaje. To může být dáno zařazením i MPN suspektních pacientů, u nichž nakonec nebyla tato diagnóza potvrzena. Po mutaci p.V617F v genu JAK2 se jedná se o druhé nejčastější mutace u myeloproliferativních neoplázií. Uvedené mutace mají význam nejen diagnostický při diferenciální diagnostice, ale i prognostický.

Supported by TE - The Technology Agency programme "Competence Centres", TE02000058, Center of competence for molecular diagnostics and personalized medicine.

P29.

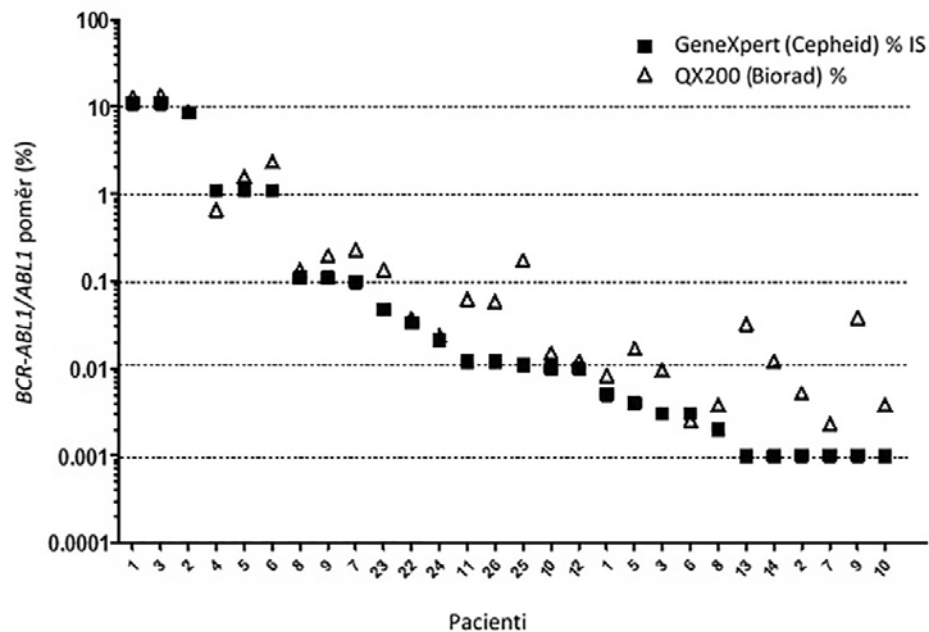
Zvyšování limitu detekce BCR-ABL1 pro monitorování zbytkové choroby u pacientů s CML použitím metody ddPCR

Smitalová D., Jurček T., Dvořáková D., Mayer J., Ráčil Z., Romžová M. (Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno; Centrum molekulární biologie a genové terapie, Fakultní nemocnice, Brno; Interní hematologická a onkologická klinika, Fakultní nemocnice, Brno; Středoevropský technologický institut, Masarykova univerzita, Brno)

Chronická myeloidní leukémie (CML) je klonální nádorové onemocnění vznikající neoplastickou transformací hemopoetické kmenové buňky. CML je charakterizována přítomností fúzního genu BCR-ABL1 v leukemických buňkách. Molekulární stanovení hladin transkriptu BCR-ABL1 metodou kvantitativní RT-PCR je základem pro monitorování minimální zbytkové nemoci a následné vyhodnocení účinnosti léčby CML. Nepřítomnost BCR-ABL1 nemusí nutně znamenat vymezení zbytkové choroby, nebo „vyléčení“ CML pacientů, protože senzitivita použité standardní RT-PCR pro kvantifikaci transkriptu BCR-ABL1 je limitovaná. Mnoho laboratoří již v současnosti testuje metodu digitální PCR (dPCR) umožňující přímou absolutní kvantifikaci, která může zvýšit citlivost měření BCR-ABL1. Cílem této studie bylo zavedení dropletové digitální PCR (ddPCR) pro co nejspolehlivější detekci minimální zbytkové choroby u pacientů s CML a stanovení její funkčnosti a efektivity v porovnání se standardně používanou kvantitativní metodou

GeneXpert (Cepheid). Pro měření absolutního počtu kopií BCR-ABL1 a ABL1 transkriptu pomocí ddPCR na systému QX200 (Biorad) byly použity primery a sondy dle EAC protokolu (Gabert et al., 2003). Reakční podmínky byly nastaveny podle instrukcí výrobce s modifikací ve finální koncentraci primerů a sond. RNA byla přepsána pomocí SuperScript® VILO™ cDNA kitu (Invitrogen). Pro stanovení limitu blanku (LOB) pro každý gen byly měřeny kontroly bez cDNA templátu (n=45). Míra falešné positivity (FPR) byla stanovena na vzorcích od zdravých dobrovolníků pod věkovou hranicí 30 let v triplikátech (n=45/gen). Linearita byla testována na pDNA BCR-ABL1 kalibrantu v triplikátech (ERM AD623, Sigma-Aldrich). Pro stanovení senzitivity byla použita cDNA od CML pacienta s hodnotou BCR-ABL1/ABL1 poměru 10 % IS nařazená na pozadí zdravé kontroly (6x sériové ředění). Vzorky 28 CML pacientů s různými hladinami molekulární odpovědi (10 %-0.001 % BCR-ABL1/ABL1 poměru) a 11 CML pacientů BCR-ABL1 negativních, změřených pomocí GeneXpert, byly použity pro stanovení shody mezi kvantitativní a digitální PCR. LOB pro BCR-ABL1 a ABL1 eseje byl stanoven jako 0. FPR pro BCR-ABL1 byla v závislosti od prahu intenzity signálu 8.9 % (minimální) 4.4 % (střední) a 2.2 % (maximální). Absolutní počty kopií ABL1 se při různých hranicích amplitudy neměnily. Test linearity ukázal vysokou korelaci mezi naměřeným a očekávaným absolutním počtem kopií u obou genů - R (BCR-ABL1)= 0,9906, R (ABL1)=0,9948. Při testování senzitivity na ddPCR byla nejnižší detekovatelná hladina BCR-ABL1 0,022 kopie/ul (průměrný počet v triplikátu), odpovídající hladině 0.0001% IS. Spodní limit detekce v pozitivních vzorcích zdravých kontrol odpovídal 0,047 kopií BCR-ABL1/ul (1 pozitivní droplet na triplikát). Limit senzitivity ddPCR pro BCR-ABL1 byl proto posunut nad tuto hranici a byl určen jako 0,080 kopií BCR-ABL1/ul a vzorky s počtem kopií BCR-ABL1 pod touto hranicí tak byly hodnoceny jako BCR-ABL1 negativní. Pomocí ddPCR byly detekovány přibližně o 1 řád vyšší hladiny BCR-ABL1 transkriptu u 25 % MR3.0, respektive 36 % MR4.0-4.5 CML pacientů ve srovnání s GeneXpert (graf č. 1). 2/11 (18 %) vzorků, které byly GeneXpert určeny jako negativní, byly ddPCR vyhodnoceny jako pozitivní. Metoda ddPCR byla schopná detekovat i velmi nízké koncentrace transkriptu BCR-ABL1 - 0,08 kopie/ul při specifitě 97.8 %, a u části vzorků CML pacientů MR3.0-4.5 došlo k posunu hladiny molekulární odpovědi až o jeden řád výš oproti GeneXpertu. Při zohlednění falešné positivity (z měření zdravých kontrol) a maximální hranici amplitudy (co nejbližší k pozitivním signálům) je ddPCR možné použít k sledování pacientů ve stádiu hluboké léčebné odpovědi. Tento projekt byl podpořen grantem na specifický výzkum MUNI/A/1106/2016.

Korelace BCR-ABL1/ABL1 poměrů měřených pomocí kvantitativní (GeneXpert) a digitální dropletové (QX200) PCR



P30.

Kazuistika: Nádor z blastických plazmocytoidních dendritických buněk

Čerňan M., Szotkowski T., Rusiňáková Z., Dušková M. (Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc; Ústav klinické a molekulární patologie LF UP a FN, Olomouc)

Nádory z blastických plazmocytoidních dendritických buněk představují raritní hematologickou malignitu s agresivním průběhem a nepříznivou prognózou. Pro onemocnění jsou charakteristické primární kožní léze, často se současným postižením kostní dřeně a extramedulárních orgánů. Diagnostika je založena na imunohistochemickém a flowcytometrickém průkazu ko-exprese znaků CD4 a CD56, s variabilním vyjádřením dalších markerů specifických pro dendritické buňky. Medián věku v době diagnózy je 60-70 let, onemocnění se 3krát častěji vyskytuje u mužů. Poznatky o léčbě tohoto onemocnění jsou limitovány na retrospektivní analýzy malých souborů nemocných. Navzdory obecně dobré iniciální léčebné odpovědi na chemoterapii dochází v odstupu řádu měsíců k časnému relapsu a následně rychlé systémové diseminaci. Publikovaná data ukazují na vyšší účinnost indukční léčby pro akutní lymfoblastickou leukémií následovanou alogenní transplantací křetvorných buněk ve srovnání s jinými režimy indukční resp. konsolidační chemoterapie. Prezentovaná kazuistika popisuje případ 22letého nemocného, u něhož byla stanovena diagnóza nádoru z blastických plazmocytoidních dendritických buněk s izolovaným kožním postižením. Pacient podstoupil indukční a jeden cyklus konsolidační chemoterapie podle protokolu GMALL pro akutní lymfoblastickou leukémii, následovanou alogenní transplantací křetvorných buněk od nepříbuzenského dárce v 1. kompletní remisi onemocnění. Podání chemoterapie i provedení transplantace proběhlo bez závažných komplikací a nemocný zůstává v remisi onemocnění s dobrou kvalitou života, v době vzniku této práce, 20 měsíců od alogenní transplantace. Kazuistika dokumentuje úspěšný léčebný přístup k prognosticky nepříznivému onemocnění. Cílem sdělení je také zvýšit povědomí o této vzácné nozologické jednotce a přispět tak k rychlejší diagnostice a včasnému zahájení intenzivní terapie nutné ke kontrole průběhu nemoci. Tato práce byla podpořena grantem IGA_LF_2017_007.

P31.

Molekulárno-cytogenetická analýza mnohopočetného myelómu – přínos zavedení metody arrayCGH

Mlynářčiková M., Balcárková J., Ščudla V., Píka T., Minařík J., Krhovská P., Urbánková H. (Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc)

Chromozómové aberácie sa u mnohopočetného myelómu z prognostického hľadiska delia na dve skupiny. Hyperdiploidná, prognosticky priaznivejšia skupina pacientov, je spojená so zmnženiami nepárnych chromozómov, hlavne 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 a 21 a menej častými prestavbami genu IgH. Na rozdiel od non-hyperdiploidnej skupiny, ktorá sa vyznačuje vysokou incidenciou IgH translokácií a je spojená s horšou prognózou. Heterogénny génový profil mnohopočetného myelómu naznačuje prítomnosť množstva ďalších génových aberácií s doposiaľ neznámym prognostickým významom. Array komparatívna genómová hybridizácia (aCGH) prispieva k odhaleniu nových nebalansovaných zmien a objasneniu ich asociácie s dobre definovanými prognostickými cytogenetickými znakmi. Kombináciou metód konvenčnej cytogenetiky, FISH a aCGH sme schopní tieto zmeny detegovať a prispieť tak k správne určenie prognózy pacientov a zároveň k objasneniu patogenézy MM. Analyzovaný súbor tvorilo 57 pacientov s MM, ktorý boli vyšetrení metódami klasickej, molekulárnej cytogenetiky a aCGH. Súbor tvorilo 30 žien a 27 mužov, s mediánom veku 68 rokov. V dobe diagnózy bolo vyšetrených 35 pacientov a 23 pacientov v dobe progresie/relapsu. Opakovane sme vyšetrili 5 pacientov z dvoch po sebe nasledujúcich odberov kostnej drene, čo nám umožnilo sledovať u nich klonálny vývoj. Na samotnú analýzu aCGH bola použitá DNA pacientov izolovaná zo vzoriek kostnej drene, ktorú sme hybridizovali spolu s kontrolnými vzorkami DNA najčastejšie s použitím oligonukleotidového čipu 4x180K + SNP, v niektorých prípadoch 4x44K, 8x60K (Agilent). Pomocou metódy aCGH sme u 54 pacientov (95%) zachytili chromozomálne zmeny, pričom u každého z nich boli pozorované ďalšie prídavné zmeny oproti konvenčnej cytogenetiky a FISH. Identifikovali sme vysokú frekvenciu zmien chromozómu X, až u 36 % žien bola preukázaná strata celého chromozómu X. Okrem prítomnosti prognosticky známych aberácií sme detegovali mnohé ďalšie rekurentné aberácie, napr.: del(12q) u 18 % pacientov a del(16q) u 12%. Výsledky analýz naznačujú, že aCGH je efektívnu

metódou pre určenie početných chromozómových zmien, ktoré môžu pri použití cytogenetiky a FISH uniknúť, ako aj pre identifikáciu nových rekurentných nebalansovaných zmien v genóme MM. Používanie aCGH v rutinej diagnostike MM má však ešte v tejto chvíli mnohé obmedzenia a prekážky (nízka infiltrácia plazmatickými bunkami, výskyt viacerých patologických klonov a ďalšie). Každá z dostupných cytogenetických metód plní dôležitú úlohu a ich kombináciu sa efektívne stanoví výsledný karyotyp.

Táto práca je podporovaná grantom: IGA-LF-2017-007

P32.

Zmena typu ľahkého reťazca u nemocné s mnohočetným myelomem

Novák M., Minařík J., Pika T., Lochman P., Ščudla V. (Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc; Oddělení klinické biochemie, FN, Olomouc)

Referujeme kazuistiku raritní změny lehkého řetězce u nemocné s mnohočetným myelomem. Pacientka ročník 1937 byla diagnostikována jako mnohočetný myelom IgA kappa stádia IIA dle DS. Po osmi cyklech CVD senior a osmi cyklech RD dosahuje parciální remise. Pomocí mnohobarevné průtokové cytometrie (BD FACS Canto II, analytický software BD Diva 7) bylo v kostní dřeni zastiženo 0,45% plazmatických buněk CD38+/CD138+, z nichž 92% exprimuje patologický imunofenotyp CD19+/CD56+/CD45+/CD117low/CD28-/CD33-, klonalita lehkých řetězců: kappa chain 92%, lambda chain 8%. Klonalita byla verifikována biochemicky, stanovením volných lehkých řetězců: Kappa free 785,44 mg/l, lambda free 7,81 mg/l. Pro následnou progresi onemocnění je léčena kombinací Carfilzomib + Dexametazon. Při kontrolním vyšetření kostní dřenež je průtokovou cytometrií zachyceno 0,8% plazmocyty s identickým imunofenotypem, avšak s odlišnou expresí cytoplazmatických lehkých řetězců: kappa 2%, lambda 98%, což bylo potvrzeno biochemickým stanovením volných lehkých řetězců: kappa free 22,16 mg/l, lambda free 843,96 mg/l. Zatímco klonální evoluce spojená se změnou exprese povrchových markerů je relativně běžná, námi pozorovaný switch cytoplazmatických lehkých řetězců doposud nebyl popsán.

Výzkum byl podpořen z prostředků IGA_LF_2017_007

P33.

Cirkulující plazmatické buňky u mnohočetného myelomu: flowcytometrická a molekulární analýza

Sedlaříková L., Bezděková R., Říhová L., Almáši M., Kuřaczková V., Radová L., Penka M., Štok M., Pour L., Ševčíková S. (Babákova myelomová skupina, Ústav patologické fyziologie, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno; Oddělení klinické hematologie, Fakultní nemocnice, Brno; Středoevropský technologický institut, Masarykova univerzita, Brno; Interní hematologická a onkologická klinika, Fakultní nemocnice, Brno)

Úvod: Mnohočetný myelom (MM) je hematoonkologické onemocnění vyznačující se především infiltrací kostní dřenež (KD) monoklonálními plazmatickými buňkami (PC). V periferní krvi (PK) se PC obvykle nevyskytují. PC však někdy expandují z KD do PK a to pak ve formě tzv. cirkulujících plazmatických buněk (cPC). Jedná se o negativní prognostický znak asociovaný s kratším přežitím MM pacientů. MikroRNA (miRNA) jsou krátké nekódující jednořetězcové molekuly RNA, které regulují genovou expresi a jsou zapojeny do patofyziologie MM. Tato práce si klade za cíl porovnat expresi miRNA a imunofenotyp PC z KD s cPC v PK u pacientů s MM.

Materiál a metody: Bylo analyzováno 8 párových vzorků MM pacientů (KD a PK) v době diagnózy. Detekci PC jsme provedli na základě znaků CD38, CD45 a CD138. Pro další analýzu PC byly využity: CD19 pro odlišení reziduálních normálních PC (N-PC), CD56 pro detekci abnormálních PC (A-PC) a CD20 pro odlišení populace plazmablastů (prekurzorů PC) a k detekci A-PC. Izolace cPC byla provedena magnetickou separací pomocí Plasma Cell Isolation Kit II na autoMACSpro (Miltenyi Biotec). Pro analýzu exprese miRNA bylo vybráno 6 párových vzorků cPC s čistotou > 92 %, kdy byly miRNA izolovány pomocí miRNeasy Mini Kit (Qiagen) a analýza exprese byla provedena pomocí miRNA Ready-to-Use PCR, Human panel I, V4.R (Exiqon) dle doporučení výrobce. S pomocí lineárních modelů jsme párovým testem ověřili statisticky významný rozdíl exprese miRNA a výsledné p-hodnoty párových testů adjustovali Benjamini-Hochberg korekcí pro mnohonásobné porovnání.

Výsledky: V rámci prováděných analýz u nově diagnostikovaných pacientů s MM jsme identifikovali 8 MM pacientů s adekvátním počtem cPC vhodných pro následné zpracování (flow cytometrická

detekce > 1 % cPC ze všech leukocytů). V PK byl medián cPC 1,76 % (rozsah 1,28-3,55). Souběžně s PK byla u daných pacientů analyzována i KD s mediánem 23,95 % (rozsah 10,8-69,9) PC v KD, kdy přítomnost cPC bylo možné sledovat u pacientů s vyšší infiltrací PC v KD. Znak CD56 byl s obdobnou mírou exprimován u většiny pacientů (6/8) v PK i KD. CD19 byl na patologických PC exprimován zřídka (2/8) a CD20+ PC nebyly v analyzovaných vzorcích vůbec identifikovány. Molekulární analýza profilu miRNA pak odhalila 19 miRNA, které jsou signifikantně méně exprimovány ve vzorcích cPC oproti PC z KD (p < 0,05).

Závěr: Prvotní analýza ukázala, že exprese vybraných znaků na cPC je ve všech případech shodná s nálezem v KD. Profilování exprese miRNA u párových vzorků odhalila 19 rozdílně exprimovaných miRNA, které by mohly mít vliv na přežívání PC mimo mikroprostředí KD.

Práce byla podpořena grantovým projektem AZV 15-29508A.

P34.

Liečba mnohopočetného myelómu podľa protokolu Total Therapy 3 - pilotné skúsenosti pracoviska

Setteyová L., Roziaková L. (Klinika hematológie a transfuziologie LF UK, SZU a UN, Bratislava – SK)

Intratumorálna heterogenita sa progresívne zvyšuje od štádia monoklonovej gamapatie nejasného významu (MGUS) k symptomatickému mnohopočetnému myelómu (MM). Genómová nejednotnosť vytvára predpoklad pre použitie metód liečby MM podľa protokolu Total therapy 3 od Barlogieho zameraných na preventívnu eradikáciu rezistentných subklonov. Totálna terapia 3 je intenzifikovaný liečebný režim, ktorý pozostáva z podania dvoch cyklov VTD-PACE ako iniciálnej a konsolidačnej liečby pred a po tandemovej transplantácii, s následnou udržiavacou liečbou. Protokol VTD-PACE sme použili v rámci indukčnej a chemomobilizačnej terapie. Práca predstavuje pilotné skúsenosti pracoviska. Materiál a metódy Štyria pacienti vo veku 43 až 61 rokov (medián veku v čase vyšetrovania 49,5 roka) s novodiagnostikovaným alebo progredujúcim MM po viacerých cykloch terapie (bortezomib, carfilzomib, lenalidomid, pomalidomid) vhodní na autológnu transplantáciu kmeňových krvotvorných buniek (TPKB) podstúpili dve kúry VTD-PACE, spolu 8 cyklov. VTD-PACE. Terapia pozostáva z bortezomibu podávaného subkutánne v dávke 1 mg/m²/deň v deň 1, 4, 8 a 11, dexametazónu podávaného perorálne v dávke 40 mg/deň v deň 4 až 7 a perorálne podávaného talidomidu v dávke 200 mg/deň v deň 4 až 7, v kombinácii so štvordňovou kontinuálnou infúziou cisplatiny v dávke 10 mg/m²/deň, doxorubicínu 10 mg/m²/deň, cyklofosfamidu 400 mg/m²/deň a etopozidu 40 mg/m²/deň. Mobilizácia periférnych krvotvorných buniek. Na mobilizáciu krvotvorných buniek bol podávaný granulocytové kolónie stimulujúci faktor v dávke 10 ug/kg/deň subkutánne od piateho dňa po ukončení kúry VTD-PACE. Výsledky Odpoveď U troch zo štyroch sledovaných pacientov sme zaznamenali po dvoch cykloch liečby významný pokles monoklonového proteínu a ľahkých reťazcov (60 % až 84%). Jeden pacient na uvedenú terapiu neodpovedal. Odber krvotvorných buniek Dvaja z troch pacientov, ktorí odpovedali na stimuláciu, absolvovali odber kmeňových krvotvorných buniek po prvom cykle liečby VTD-PACE, jeden pacient po druhom cykle. Aferézy boli realizované na krvinkovom separátore Spectra Optia do celkového počtu viac ako 12x10⁶/CD34+ buniek/ kg telesnej váhy. U dvoch pacientov bolo potrebné na zozbieranie stanoveného počtu kmeňových krvotvorných buniek odber uskutočniť v dvoch dňoch, u jedného pacienta sa dostatočný počet buniek získal počas jedného odberu. Toxicita liečby Neutropénia 4. stupňa bola hlavným prejavom toxicity liečby a objavila sa u všetkých pacientov. U žiadneho pacienta sa nevyskytli klinicky významné nehematologické komplikácie (obštipácia, hlboká žilová trombóza, synkopa, tremor, periférna neuropatia). Záver Pilotné skúsenosti pracoviska s liečbou VTD-PACE preukázali, že ide o efektívnu liečbu, ktorú možno použiť ako mobilizačnú terapiu pred autológnu TPKB. V našom súbore sme nepotvrdili signifikantnú nehematologickú toxicitu, hematologická toxicita sa však vyskytla u všetkých sledovaných pacientov. Tento liečebný postup môže byť prínosom predovšetkým u mladých pacientov s novodiagnostikovaným MM vhodných na transplantáciu kmeňových krvotvorných buniek.

P35.

Molekulárne cytogenetická analýza u nemocných s monoklonální gamapatií nejasného významu

Balcárková J., Mlynářčiková M., Šmídová Š., Pika T., Minařík J., Krhovská P., Ščudla V., Urbánková H. (Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc)

Monoklonální gamopatie nejasného významu (MGUS) je premaligní onemocnění plazmatických buněk spojené s trvale vyšším rizikem vzniku mnohočetného myelomu (MM). Cytogenetické studie ukázaly, že u nemocných s MGUS se vyskytují chromozomové abnormality shodné jako u MM: delece RB1 genu/monozomie chromozomu 13, translokace zahrnující IgH gen, trizomie lichých chromozomů a zmožení oblasti 1q. Další genetické změny jako jsou delece genu TP53, přestavby genu MYC, jsou spojeny spíše s progresí a relapsem MM. Biologická podstata přechodu MGUS do MM není zcela přesně objasněná, ale je spojena s expanzí geneticky pozmeněného klonu patalogických plazmatických buněk. Cílem práce bylo analyzovat geny IgH, RB1, TP53, CKS1B(1q21), trizomie chromozomů 15 a 17 metodou FICTION v souboru nemocných s MGUS, určit frekvenci jednotlivých cytogenetických změn, u opakovaně vyšetřených nemocných studovat klonální vývoj. Soubor 70 nemocných tvořilo 35 mužů a 35 žen s mediánem věku 65 let, kteří byli diagnostikováni a léčeni na III. interní klinice a Hemato-onkologické klinice FN a LF UP v Olomouci v letech 2000-2016. Cytogenetická a molekulární cytogenetická vyšetření byla provedena na nestimulovaných buňkách kostní dřve, s minimálním zastoupením 1,5 % plazmatických buněk. Opakovaně bylo vyšetřeno 18 nemocných. Alespoň jedna z vyšetřovaných cytogenetických změn byla zjištěna u 62 (89 %) nemocných, nejčastěji byla zastoupena změna (přestavba, delece, duplikace) v IgH genu u 31 (44 %) nemocných. Trizomie chromosomu 15 nebo 17 byla prokázána u 27 (39 %), delece RB1 genu byla zjištěna u 20 (28 %) nemocných, ale u žádného pacienta nebyla zjištěna jako samostatná změna. Zmožení oblasti 1q21 bylo detekováno u 16 (23 %) nemocných. Delece genu TP53 byla zjištěna jen u 2 nemocných. Klonální vývoj byl pozorován u 3 (17%) nemocných. Naše výsledky naznačují, že cytogenetické abnormality se vyskytují u většiny diagnostikovaných MGUS a ačkoli jsou heterogenní, mohou sloužit k charakterizaci a identifikaci rizikových pacientů a ke sledování klonálního vývoje onemocnění. Práce je podporována grantem IGA_LF_2017_007

P36.

Kazuistika ženy s HELLP syndromem

Cieslarová H., Mrovcová L. (Klinika hematologie, Fakultní nemocnice, Ostrava; KHO JIP FN, Ostrava)

HELLP syndrom neboli H- hemolýza, EL - elevace jaterních enzymů v séru a LP – pokles počtu trombocytů, je velmi vážná komplikace těhotenství a šestinedělí, která je v desítkách procent případů smrtelná. U těhotné nebo ženy v šestinedělí začne docházet k masivnímu rozpadu krevních buněk, poškození jater a aktivaci krevní srážlivosti na mnoha místech zároveň. V této práci popisujeme kazuistiku 35leté ženy, která byla přijata na JIP hematologické kliniky FNO šest dní po urgentním porodu císařským řezem ve 35. týdnu gravidity pro těžký HELLP syndrom s přechodem do multiorgánové dysfunkce. Popisujeme průběh její dvanáctidenní hospitalizace na JIP, zakončené přeložením ve stabilizovaném stavu na gynekologické oddělení.

P37.

Detekce respiračních virů v nasofaryngeálních stěrech a tekutině z bronchoalveolární laváže u hematologických pacientů

Pantůčková D., Pospíšilová J., Volfová P., Langer J., Lengerová M., Weinbergerová B., Mayer J., Ráčil Z. (Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematologická a onkologická klinika LF MU a FN, Brno; Interní hematologická a onkologická klinika LF MU a FN, Brno)

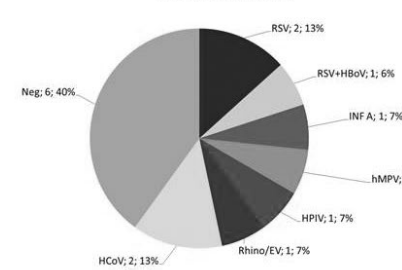
Úvod: Respirační viry (RV) jsou příčinou různě závažných onemocnění v průběhu celého roku. U imunokompromitovaných pacientů pak infekce RV často progredují do dolních cest dýchacích a mohou se stát život ohrožující infekční komplikací. Rychlá detekce RV pomocí molekulárně biologických metod umožňuje rozlišení infekcí způsobených RV od jiných s podobnými klinickými příznaky, zejména infekcí bakteriálních. Naším cílem bylo zjistit přínos komerčních kitů (Argene, bioMérieux) založených na real-time PCR pro detekci respiračních virů v klinických vzorcích. Testovány byly vzorky bronchoalveolární laváže (BAL) a nazofaryngeálních stěrů (NFS) od pacientů léčených na oddělení Interní hematologické a onkologické kliniky Fakultní nemocnice Brno (IHOK FN Brno).

Metody: Do testování bylo zařazeno celkem 87 vzorků (15 BAL, 72 NFS) od celkem 74 pacientů odebraných v období od ledna 2016 do února 2017. Vzorky byly vyšetřeny sadou komerčních kitů pro detekci respiračně syncytiálního viru (RSV), lidského metapneumoviru (hMPV), influenza virů A a B (INF A a INF B), parainfluenza virů 1-4 (PIV), adenovirů 1-7 (AdV), lidských koronaviřů (HCoV),

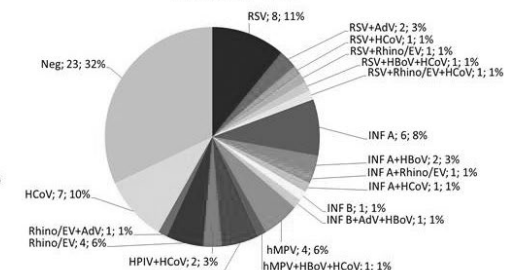
lidských bokavirů (HBoV), lidský rhinovirů (HRV) a lidský enterovirů (HEV). Součástí kitů je také interní kontrola pro ověření účinnosti izolace virové RNA a následné PCR amplifikace. Výsledky: Pozitivní na některé z respiračních virů bylo celkem 9/15 (60%) vzorků BAL a 49/72 (68%) vzorků NFS. Spektrum virů detekovaných v pozitivních vzorcích je znázorněno v grafech (Graf 1, Graf 2). V obou materiálech převažovala pozitivita RSV (BAL – 19%, NFS – 18%). Ve vzorcích NFS byly také četně zastoupeny vzorky pozitivní na INF A (13%) a HCoV (18%). Velmi častá byla pozitivita několika virů současně. Více než jeden RV byl detekován v 15/49 (31%) vzorků NFS, ale pouze v 1/9 (11%) vzorků BAL.

Závěr: Přestože jsou komerční kity ve srovnání s doposud používanými in-house metodami nákladnější, je jejich nespornou výhodou kromě zkrácení doby odezvy do vydání výsledku a možnosti standardizace, rychlé rozšíření spektra vyšetřovaných patogenů. Testování komerčními kity lze získat výsledky detekce všech výše uvedených RV již během 3 hodin. Spektrum získaných výsledků s nejčastějším záchytem RSV a INF A odpovídá lokální epidemiologické situaci a dříve publikovaným výsledkům. Pro zhodnocení významu vysokého záchytu HCoV a smíšených RV infekcí bude nutné korelovat s výsledky dalších vyšetření a klinickými daty pacientů.

Graf 1 Záchyt respiračních virů ve vzorcích BAL



Graf 2 Záchyt respiračních virů ve vzorcích NFS



P38.

Nábor dárců na Transfuzním oddělení Fakultní nemocnice Olomouc

Šýbbarová P., Lysá L., Vybíralová L., Koukalová A., Galuszková D. (Transfúzní oddělení, FN, Olomouc)

Tab.č.1 – Přehled typů odběrů

Typ odběru	Počet
Běžný odběr	58 305
Plazmaferéza	66 519
Trombocytaferéza	5 857
Erytrocytaferéza	453
Granulocytaferéza	20

Tab.č.2 – Detailní rozložení věku dárců:

Věk dárců krve	%
18 - 30 let	32,81
31 - 40 let	34,66
41 - 50 let	22,72
51 - 65 let	9,81
Věkový průměr	36 let

Tab.č.3 Složení dárcovské základny na našem oddělení:

	2012	2013	2014	2015	2016
Pravidelní dárci	5 126	4 956	5 406	5 549	5 589
Prvodárci	814	947	1 058	900	1 041

Tab.č.4 Rozložení dárcovské základny podle pohlaví:

	2012	2013	2014	2015	2016
Muži	3 654	3 810	3 777	3 756	3 893
Ženy	1 804	1 774	2 116	2 180	2 248

Úvod: Dárcovství krve hraje významnou roli i v současné medicíně. Krev se nedá uměle vyrobit, ani nahradit, proto je nutné bezpříspěvkové dárcovství krve podporovat a rozvíjet. Podle WHO může darovat krev 5 % - 6 % populace, v ČR je to asi jen 3,7%. Proto je cílem našeho oddělení informovat o dárcovství krve, získávat nové dárcy a udržet si naši stávající dárcovskou základnu.

Metodika a cíl: Prezentovat data o nábových akcích a dárcovství krve za období 2012–2016. TO FNOL pořádá náborové akce, tematické odběry a pravidelně odměňuje dárcy v měsíčním nebo čtvrtletním losování o ceny. Nedílnou součástí je prezentace dobrovolného dárcovství krve na učilištích, středních a vysokých školách s cílem získávat mladé dárcy. Novým trendem v náboru dárců je používání sociálních sítí www.facebook.com/470ml.

Výsledky: viz. tabulka č. 1-4 Ve sledovaném období jsme provedli 131 184 odběrů. Moderním trendem dárcovství krve a námi osvědčeným prostředkem je komunikace s dárci krve pomocí sociálních sítí. Využívá jich velké procento mladých, převážně žen (57 %), přestože dárci krve jsou převážně muži (68 %). **Závěr:** Ročně organizujeme kolem 80 náborových akcí na oddělení i mimo něj. Díky těmto akcím se nám daří počty dárců rozšiřovat. Každý rok získáme průměrně až 1000 nových prvodárců. Naši snahou je dárcy co nejvíce motivovat, informovat a následně jim zpříjemnit pobyt na transfúzním oddělení, aby se k nám rádi vraceli.

P39.

Problematika dlouhodobých žilních přístupů na HOK FN Olomouc

Hájková V., Szotkowski T., Hubáček J., Rohoň P., Vykydalová J., Hlaváčková J., Labudíková M. (Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc)

Diagnóza	
nehodgkinský lymfom	290
Hodgkinův lymfom	207
akutní lymfoblastická leukemie	15
chronická lymfatická leukemie	10
myelodysplastický syndrom	10
mnohočetný myelom	8
akutní myeloidní leukemie	3
karcinom prsu	2
karcinom střev	2
ostatní	14

Intravenózní port nabízí možnost dlouhodobého přístupu do žilního řečiště, proto se implantuje nejčastěji onkologickým pacientům, jejichž onemocnění vyžaduje opakované a dlouhodobé podávání protinádorové a/ nebo podpůrné léčby a provádění krevních odběrů. Umožňuje větší komfort během celé léčby jak pro pacienta, tak pro zdravotnický personál. V letech 1997 - 2016 bylo na Hema-

to-onkologické klinice FN Olomouc implantováno celkem 561 venózních portů. Jednalo se o 327 žen a 234 mužů ve věku 18-86 let (medián 46let). Nejčastěji zvoleným žilním přístupem byla v.subclavia (527), v.jugularis interna (33) a jednou byla využita v.femoralis. Nejčastější základní diagnózou byl u 290 pacientů nehodgkinský lymfom a u 207 pacientů Hodgkinův lymfom, zbývajících 64 pacientů mělo jinou diagnózu (viz tabulka). 550 implantací proběhlo bez komplikací, u 6 pacientů vznikl významný hematom a u 5 pacientů plášťový pneumotorax. Důvodem k extrakci portu bylo u 306 pacientů ukončení terapie, u 37 pacientů infekční komplikace, u 19 pacientů trombóza a u 8 pacientů sanace potenciálních infekčních fokusů před transplantací křevetvorných buněk. U 7 pacientů byla indikována extrakce pro poškození portu a 6 pacientů pro dekubitus kožního krytu nad portem. 108 nemocných zemřelo se zavedeným portem. Medián doby používání venózního portu byl k 31.12.2016 718 dní (7 - 3976). V letech 1997 - 2002 bylo provedeno pomocí dotazníkového šetření hodnocení spokojenosti pacientů s venózním portem. Výsledky dotazníků od celkem 59 respondentů ukazují, že během pobytu v nemocnici většinu pacientů (96,7%) port nijak neomezoval. Nepříjemné pocity mimo terapii nemělo 94,9% pacientů, při používání 89,8% pacientů. Žádné omezení v práci nevnímalo 91,5%, ve volném čase 94,9%, ve vztazích s lidmi 93,2% a v sexuálním životě 91,5% respondentů. Dotazníkové šetření máme v plánu opakovat.

P40.

První psychologická pomoc ve FNO (představení práce intervenčního týmu)

Vzorkova M. (Klinika hematologie, Fakultní nemocnice, Ostrava)

První psychologická pomoc ve FNO (představení práce intervenčního týmu) Martina Vzorková, Dis - Klinika hematologie Součástí naší práce není jen péče o pacienty. Do blízkého kontaktu se dostáváme také s jejich blízkými. Primárně se na vysoké úrovni věnujeme pacientům, ale jejich příbuzným, v nemocnici často přítomným, se obvykle příliš nevěnujeme. Ti pak zůstávají osamoceni a ponecháni bez podpory v čekárnách nemocnice. Proč k tomu dochází? Jedním z důvodů bývá nedostatek času ze strany zdravotníků. Jsou to ale také rozpaky, jak s blízkými vážně ohroženého či již zemřelého pacienta jednat. Co s tím můžeme dělat? - věnovat těmto osobám pozornost - postarat se o jejich aktuální psychologické potřeby - poskytnout jim tzv. první psychologickou pomoc Intervenční tým FNO Tým tvoří speciálně vyškolení pracovníci s různých, převážně akutních oddělení. V činnosti je tým od roku 2012. Celkem je vyškolen 23 interventů. Jsou aktivní pro celou nemocnici. Slouží 24 hodinově službu na telefonu. K čemu intervenční tým slouží? * snižuje psychologickou zátěž ošetřujícího personálu * z kvalitňuje komunikaci mezi rodinou a personálem v psychologicky náročných situacích * pracuje s příbuznými a pozůstalými, kteří jsou ve stavu akutní stresové reakce

P41.

Autologní transplantace křevetvorných buněk: potransplantační komplikace u pacientů v reverzní izolaci a bez reverzní izolace

Novotná J., Vodíčková M., Labudíková M. (Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc)

Předložená práce je zaměřena na problematiku komplikací spojených s autologními transplantacemi a jejich přípravným režimem u pacientů s mnohočetným myelomem, který je dle mezinárodní klasifikace nemocí označen jako Dg. C90.0. Výzkumné šetření proběhlo u výzkumného vzorku 16 pacientů transplantovaných na oddělení s reverzní izolací v roce 2013, kdy jejich průměrný věk činil 58 let, a u 19 pacientů transplantovaných na oddělení bez reverzní izolace v roce 2015, kdy byl průměrný věk 59 let. Všichni pacienti podstoupili přípravný režim s Melphalanem, jenž měl za následek cytoredukcí kostní dřeně, ta následně vedla k imunosupresi pacienta, která s sebou přináší řadu komplikací. Mezi běžné potransplantační komplikace lze zařadit mukosiditu gastrointestinálního traktu spojenou s četnými průjmy, nauzeou a zvracením, která se někdy neobejde bez parenterální výživy. Dále se jedná o stomatitidu a v neposlední řadě febrilní neutropenii, která může, ale také nemusí být způsobena grampozitivními či gramnegativními bakteriemi. Na oddělení s reverzní izolací prodělalo běžné potransplantační komplikace všech 16 transplantovaných pacientů, při průměrné délce hospitalizace 20 dnů. Mukositida gastrointestinálního traktu spojená s průjmy trvala v průměru 6 dnů a proběhla u 12 pacientů. Oproti tomu na oddělení bez reverzní izolace prodělalo běžné potransplantační komplikace 17 pacientů z 19 transplantovaných, přičemž u 2 pacientů proběhl potransplantační režim zcela bez komplikací. Mukositidou gastrointestinálního traktu spojenou s průjmy v tomto případě trpělo taktéž 12 pacientů, avšak trvala o jeden den déle, než u pacientů v reverzní izolaci, tedy 7 dnů. Mezi další běžné potransplantační komplikace patří stomatitis acuta, kterou v reverzní izolaci i bez reverzní izolace prodělal stejný počet pacientů, tedy 9. Průměrná délka trvání byla v obou případech 7 dnů. Tyto dvě výše zmíněné potransplantační komplikace mohou v některých případech znemožnit perorální příjem stravy a tím si vyžadat nutnost parenterální výživy. V režimu s reverzní izolací byla parenterální výživa indikována u 5 pacientů s průměrným trváním 4 dnů, kdežto v režimu bez reverzní izolace byl tento problém řešen v 8 případech s průměrným trváním 9 dnů. Posledním řešeným problémem byla febrilní neutropenie, která v obou případech proběhla u 14 pacientů, se stejnou délkou trvání a to 4 dnů. Pozitivní záchyt v hemokulturách byl potvrzen u 6 pacientů v reverzní izolaci, kdy byly hlášeny 3x grampozitivní koky v hloučcích a 3x gramnegativní tyčky. U pacientů bez reverzní izolace byl problém febrilní neutropenie s pozitivním záchytem v hemokulturách řešen v 8 případech, přičemž grampozitivní koky v hloučcích byly hlášeny 6x a gramnegativní tyčky 2x. Výsledky výzkumného šetření poukazují, na fakt, že potransplantační komplikace u pacientů s mnohočetným myelomem proběhly s téměř totožnou mírou a závažností jak u pacientů transplantovaných v reverzní izolaci, tak u pacientů bez reverzní izolace. Z výsledků tedy vyplývá, že reverzní izolace nemá na průběh potransplantačních komplikací významný vliv.

P42.

Imunomodulační účinek mesenchymálních kmenových buněk – porovnání pěti šarží

Vrbová J., Holubová M., Vlas T., Jindra P., Lysák D. (Hematologicko-onkologické oddělení, FN, Plzeň; Ústav imunologie a alergologie, FN, Plzeň)

Mesenchymální kmenové buňky (MSC) jsou v současnosti využívány v různých oblastech medicíny. Používají se v různých indikacích z oblasti regenerativní medicíny či při potřebě mírnit aktivitu imunitního systému. V hematologické oblasti se využívá jejich potenciál tlumit reakci imunitního systému a snižovat tak závažnost reakce štetu proti hostiteli. MSC používané v klinické praxi pocházejí z různých zdrojů jako je tuková tkáň, kostní dřeň či pupečnicková krev. Naše pracoviště připravuje léčivý přípravek z MSC pro léčbu reakce štetu proti hostiteli u pacientů, u kterých selhala standardní léčba. Různé šarže léčivého přípravku pocházejí od různých dárců. Cílem této studie bylo zjistit, zda se liší imunomodulační účinek pěti různých šarží. MSC byly izolovány z 20ml kostní dřeně a kultivovány po zhruba 3 týdny. Z každé šarže byl následně zamražen vzorek, který byl po rozmrazení krátce rekultivován a poté použit na testování schopnosti potlačit aktivaci, proliferaci či metabolickou aktivitu aktivovaných alogenních mononukleárních buněk (MNC). MNC byly izolovány z krve 10-ti dárců gradientovou centrifugací s použitím separačního roztoku (Histopaque, Sigma, USA). Buňky byly poté naředěny na koncentraci 2x10⁶/ml v kultivačním médiu RPMI (Gibco, USA) + 10% pHPL (místní zdroj). Jako aktivní látka byl zvolen phytohemagglutinin (PHA; Sigma) v koncentraci 5mg/ml. K MNC byly

poté přidány MSC (1x10⁶) a buňky byly kultivovány po dobu 4 dní. Po uplynutí doby kultivace byly odebrány vzorky na jednotlivá měření. Pro sledování aktivace T-lymfocytů na průtokovém cytometru byly ke 150 μ l přidány následující protilátky: CD45-Horizon, CD25-APC (obě BD Bioscience, USA) a CD3-PerCP (Exbio, ČR). Po 15-ti minutové inkubaci a promytí byly vzorky ihned měřeny na průtokovém cytometru BD FACSCanto (BD Bioscience), analýza byla provedena softwarem FlowJo (hodnocení intenzity fluorescence CD25 na CD3+ lymfocytech). Na testování proliferace byl použit BD Cell Cycle test (BD Bioscience), který využívá barvení buněk (DNA) propidium iodidem (PI) a rozlišení buněk s různým obsahem DNA, které je specifické pro jednotlivé fáze buněčného cyklu. Fáze cyklu byly hodnoceny software MultiCycle AV DNA analysis (Beckman Coulter, USA). Metabolická aktivita buněk byla měřena pomocí AlamarBlue, což je látka, která jako nefluorescenční forma resazurin vstupuje do buňky, kde je metabolizována (pomocí oxidoreduktáz) na fluorescenční resorufin. Fluorescence je poté změřena na destičkovém readeru (Synergy HTX, Biotek, USA), kdy nižší fluorescence indikuje sníženou metabolickou aktivitu buněk. Všechny testované šarže vykazovaly imunomodulační účinek ve srovnání s kontrolní skupinou (tj. MNC s PHA bez MSC). Intenzita fluorescence aktivčního znaku CD25 v kontrolní skupině měla medián MFI=53587, po přidání jednotlivých šarží MSC byl medián fluorescence v rozmezí MFI= 24587 – 31208. Zastoupení buněk v S+G2/M fázi buněčného cyklu bylo s mediánem 45% u kontrolní skupiny, u vzorků s přidáním MSC se medián pohyboval v rozmezí 4,4%-10,6%. Medián fluorescence AlamarBlue byl u kontrolní skupiny 4034, ve skupinách s MSC byl v rozmezí 2424-2678. Mezi kontrolní skupinou a skupinami s MSC byl signifikantní rozdíl ve všech testech, mezi jednotlivými skupinami nebyl signifikantní rozdíl zaznamenán ($p < 0,05$). Naše studie prokázala, že jednotlivé šarže MSC (tj. od různých dárců) vykazují stejné imunomodulační schopnosti. Proto účinnost léčivého přípravku MSC nezávisí na tom, jaká šarže je pro výrobu použita.

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

P43.

Naše zkušenosti se zkušebními provozními imunohepatologickými analyzátoři v laboratořích TO FNOL – retrospektivní analýza

Vodičková M., Palovská E., Holusková I., Entrová A., Galuszková D. (Transfúzní oddělení, FN, Olomouc)

Im analyzátoř	A-1	A-2	A-3	A-4
Technologický stupeň automatizace	řevně laser plyné	SAI plyné	SAV poloautomat	SAI plyné
Počet vyšetřovacích míst	12/2/7	2/2/3	0/0	9/9/2/9
Počet diskvalifikací nálezu	4	malý počet vzorků s pozitivním SP	0	2
Státníový mód	Ne	Ne	Ne	Ano
Průměrná doba vyšetření (8 sávek)	Nedostupné	46 min	46 min	64 min
Dostupnost servisu ihned	Ano	Ano	Ano	Ne
Frekvence akontaminace	Měsíční	Týdní	Týdní	Měsíční
Výhody	1 náklady KS	Státníový mód, 1 náklady na provozní kapalniny, 0,000845 min	Back-up analyzátoř	Státníový mód
Nevýhody	Abnorme státníového módu, nezachycení 11 klinicky významných krevních skupin	1 náklady KZ, nestabilita vzorku	Poloautomat	1 náklady KZ, 0,000845 min

Tabulka 1: Přehled o jednotlivých zkušebních analyzátořích

tierytrocytárních protilátek (SP) a test slučitelnosti, do testování byly vždy zařazeny vzorky s pozitivním SP, výsledky byly porovnány s rutinním vyšetřením na analyzátoři Techno TwinStation (pozitivní nálezy byly konfirmovány v referenční laboratoři ÚHK Praha). Dále byla sledována stabilita krevního vzorku 4. až 7. den od odběru a doba vyšetření předtransfúzních vzorků v režimu statim. Zkušební provoz byl zahájeny zaškolením potřebného počtu zdravotních laborantů a vysokoškolského pracovníka, který za celý ZP odpovídal, včetně vypracování plánu a závěrečné zprávy.

Výsledky: viz. tabulka č. 1

Závěr: Naším záměrem ZP byla především obměna přístrojové techniky, zlepšení doby odezvy u statimových vzorků a převedení manuálních metod na automat. Obecným doporučením pro ZP je standardizace sestavování plánu ZP, zařazení jednotného počtu testovaných vzorků, stejně tak i vzorků s pozitivním SP ve stejném poměru k celkovému počtu vzorků, hodnocení nákladů na provoz, validace a reference.

P44.

Jak ovlivnila potrubiční pošta dobu odezvy u statimových vyšetření na TO ve FNOL Palovská E., Vodičková M., Dvořáková K., Holusková I., Galuszková D. (Transfúzní oddělení, FN, Olomouc)

EBR a ERD	Čas mezi odběrem a příjmem vzorku (hod.)	Čas mezi příjmem a nakřížením vzorku (hod.)	Čas mezi příjmem vzorku a výdejem TP (hod.)	Čas mezi odběrem vzorku a vydáním TP (hod.)
říjen 2016 (před PP)§	1:05:14	1:13:41	1:46:47	3:04:43
únor 2017 (po PP)§	0:39:35	1:14:47	1:34:36	2:17:28
rozdíl (po PP - před PP)	0:25:39	0:01:06	0:12:11	0:47:15

Tabulka č. 1: Výsledky rozdílů času odběru vzorku, příjmu na TO a vydání TP před a po zavedení PP u erytrocytárních TP

TA a PA	Čas mezi odběrem a příjmem vzorku (hod.)	Čas mezi příjmem a nakřížením vzorku (hod.)	Čas mezi příjmem vzorku a výdejem TP (hod.)	Čas mezi odběrem vzorku a vydáním TP (hod.)
říjen 2016 (před PP)§	0:54:30	1:04:13	1:10:13	2:04:43
únor 2017 (po PP)§	0:54:00	0:51:00	0:44:15	1:38:15
rozdíl (po PP - před PP)	0:00:30	0:13:13	0:25:58	0:26:28

Tabulka č. 2: Výsledky rozdílů času odběru vzorku, příjmu na TO a vydání TP před a po zavedení PP u plazem a trombocytárních TP

Jak ovlivnila potrubiční pošta dobu odezvy u statimových vyšetření na TO ve FNOL Palovská E., Vodičková M., Dvořáková K., Holusková I., Galuszková D. Transfúzní oddělení Fakultní nemocnice Olomouc (TO FNOL)

Úvod: Koncem roku 2016 proběhla instalace, proškolení personálu a zkušební provoz potrubiční pošty (PP) na Transfúzním oddělení (TO) Fakultní nemocnice Olomouc (FNOL). V lednu 2017 byl spuštěn ostrý provoz PP.

Cíl: Naším cílem bylo zjistit, jak ovlivnilo zavedení PP dobu mezi odběrem vzorku a jeho příjmem na TO a dobu odezvy, tedy čas vydání transfúzního přípravku (TP) na oddělení.

Metodika: Srovnání doby od času odběru krevního vzorku po čas příjmu na TO, od času příjmu krevního vzorku po čas nakřížení TP a celkového času od příjmu vzorku do výdeje TP na oddělení. Zaměřili jsme se na sledování statimových vyšetření testů slučitelnosti (TS) ze všech oddělení FNOL. Porovnání bylo provedeno zvlášť pro požadavky na přípravu erytrocytárních TP, u kterých se vyšetřuje krevní skupina (KS), screening protilátek (SP) i test slučitelnosti, a zvlášť pro požadavky na přípravu plazmy (PA) a trombocytárních TP (TA), u nichž se vyšetřuje pouze KS. Porovnávali jsme období říjen 2016 před zavedením PP a únor 2017 po zavedení PP.

Výsledky: viz Tabulka č. 1 a 2

Závěr: Zavedení PP na TO FNOL příznivě ovlivnilo dobu transportu vzorku krve na TO. Srovnáním dat z října 2016 a února 2017 bylo v průměru zjištěno zlepšení času mezi odběrem vzorku krve a příjmem na TO o 26 minut. Celkový čas odezvy TO na statimový požadavek erytrocytárních TP na oddělení se tedy v průměru zlepšil o cca 47 minut. U plazem a trombocytárních TP byla průměrná doba transportu srovnatelná, přičemž se vydání TP urychlilo v průměru o cca 26 minut. Podle těchto výsledků nejen že splňujeme doporučení Společnosti pro transfúzní lékařství ČLS JEP č. STL2015 ze dne 1. 09. 2015 verze 1, které udává v režimu statim obvyklou dobu vydání TP do 90-ti minut, ale oproti roku 2016 před zavedením PP jsme se dobou odezvy zlepšili v průměru o 25%.

BALCÁRKOVÁ J.	24, 71, 73
BAUER T.	10
BELADA D.	17, 18, 20
BĚLOHLÁVKOVÁ P.	35, 43, 65
BENEŠ P.	9
BLÁHA M.	53
BOUDNÝ M.	60
BURDA P.	7
CIESLAROVÁ H.	74
ČERMÁK J.	30, 43, 67, 68
ČERŇAN M.	71
ČUŘÍK N.	7, 13
D'AMORE F.A.	4
DANIELOVÁ L.	8
DOUBEK M.	2, 26, 28, 69
DOUSSET CH.	6
DRAHOŠOVÁ R.	15
DULÍČEK P.	2
ŘURINÍKOVÁ A.	30
DUŠEK L.	4
DVOŘÁKOVÁ Z.	38
DYNTEROVÁ A.	39
ENTROVÁ A.	55, 78
FUCHS O.	67, 68
GABČOVÁ G.	12, 61, 62
GEHROVÁ M.	10

HÁJEK R.	41, 42, 43, 46, 47
HÁJKOVÁ V.	76
HATALOVÁ A.	33, 36
HENZLOVÁ L.	59
HISEMOVÁ M.	63
HLOŽKOVÁ M.	28, 60
HLUŠÍ A.	34, 45, 56
HOLUBOVÁ M.	57, 64, 77
HORÁČEK J.M.	31, 65, 66
HROCHOVÁ K.	35, 54, 66
HUŠKOVÁ M.	16
CHIRON D.	5, 6
JANOVSKÁ E.	57
JONÁŠOVÁ A.	28, 33, 68
JUNGOVÁ A.	43, 47, 48
KALINOVÁ M.	59
KALVODOVÁ L.	22
KARAS M.	21, 32
KARVUNIDIS T.	21
KESSLER P.	42
KLENER P.	7, 17
KOLAŘÍK L.	39
KOPÁLOVÁ N.	14
KOSAŘOVÁ Z.	30, 62
KREJČÍ M.	26, 46, 49
KREMLOVÁ H.	23

KROPÁČKOVÁ J.....	24
KRŮZOVÁ L.....	27, 62
KULA R.	22
KUPSA T.....	31, 65, 66
LENČOVÁ N.	58
LHOTOVÁ P.....	23
LYSÁK D.	21, 36, 32, 57, 64, 77
MAISNAR V.....	42, 43, 46, 47
MANUKYAN GAYANE.....	12, 61
MARINOV I.	40, 63
MARKOVÁ J.....	20
MEJSTŘÍKOVÁ E.....	45, 51
MINAŘÍK J.	4, 23, 24, 42, 43, 47, 71, 72, 73
MLYNÁRČIKOVÁ M.	24, 71, 73
MOCIKOVÁ H.	17, 18, 20
MRÁZ M.....	5, 28
NAVRÁTILOVÁ J.....	34, 37
NOSÁL M.....	44
NOVÁK M.	23, 72
NOVOTNÁ J.	76
ORVISKÁ M.	24, 37
PALÁTOVÁ J.....	52
PALOVÁ M.	34
PALOVSKÁ E.....	78, 79
PANTŮČKOVÁ D.	74
PETRÁČKOVÁ A.....	62

PIZUROVÁ R.	60
PLANK L.....	4
POLGÁROVÁ K.	33
POLÍVKA J.....	22
POSPÍŠILOVÁ D.	45, 56
POTŮČKOVÁ E.	51
POUR L.	43, 46, 47, 49, 72
ROHOŇ P.....	3, 36, 43, 76
SANDECKÁ V.	46, 49
SEDLAŘÍKOVÁ L.	72
SETTEYOVÁ L.....	73
SLÁVIKOVÁ M.	69
SLEZÁKOVÁ K.....	33, 36
SMETANA K.	41
SMITALOVÁ D.	69
SMOLEJ L.	2, 18
STAROSTKA D.	17, 40, 58
STRATILOVÁ I.	16
SVATOŇ M.	45
SÝKOROVÁ A.....	17, 18, 20
ŠČUDLA V.	2, 4, 46, 71, 72, 73
ŠEBELOVÁ H.	9
ŠIMEČKOVÁ R.	41
ŠKROBÁNKOVÁ A.	22
ŠPATENKOVÁ N.....	14
ŠPÍŠEK R.....	11

ŠPORCROVÁ I.	22
ŠTASTNÝ M.	11
ŠTORK M.....	46, 47, 49, 72
ŠTÝBNAROVÁ P.	75
TATAYOVÁ L.	55
TRNAVSKÁ I.	37
TRNĚNÝ M.	17, 18, 41
URBANOVÁ R.	12, 25, 27, 61, 62
VÁCHA M.	5
VÁŠKOVÁ M.	51, 65
VODIČKOVÁ M.	76, 78, 79
VODIČKOVÁ P.	10
VRÁBLOVÁ L.	36
VRBACKÝ F.....	35, 54, 66
VRBOVÁ J.	77
VZORKOVÁ M.	76
ZÁBRANSKÁ T.....	48, 64
ŽÁK P.	29, 30, 31, 35, 53, 54, 65, 66, 66

GENERÁLNÍ PARTNEŘI

AMGEN s.r.o. / Bristol-Myers Squibb spol. s r.o. / Gilead Sciences s.r.o.
Janssen - Cilag s.r.o. / Roche s.r.o.

**HLAVNÍ PARTNEŘI**

Celgene s.r.o. / sanofi-aventis, s.r.o. / SERVIER s.r.o. / Takeda Pharmaceuticals Czech Republic s.r.o.

**VÝZNAMNÍ PARTNEŘI**

AbbVie s.r.o. / Angelini Pharma Česká republika s.r.o. / Sismex CZ s.r.o.
Terumo BCT Europe, N.V. / Werfen Czech s.r.o.

**PARTNEŘI**

Abbott Laboratories, s.r.o. / Alexion Pharma Czech s.r.o. / AOP Orphan Pharmaceuticals AG - org. složka
Astellas Pharma s.r.o. / Baxalta Czech spol. s r.o. / Bayer s.r.o. / Beckman Coulter Česká republika s.r.o.
Becton Dickinson Czechia s.r.o. / BIOHEM s.r.o. / Biomedica ČS s.r.o.
BioVendor - Laboratorní medicína a.s. / Carl Zeiss spol. s r.o. / DŠ Soft Olomouc, spol. s r.o.
Exbio Praha, a.s. / Fresenius Kabi s.r.o. / GRIFOLS s.r.o. / GUTTA Česká republika spol. s r.o.
I.T.A.-Intertact, s.r.o. / Medista spol. s r.o. / Merck Sharp & Dohme s.r.o. / Novartis s.r.o.
Octapharma CZ s.r.o. / Pfizer, spol. s r.o. / Sandoz s.r.o. / SARSTEDT spol. s r.o.
Siemens Healthcare, s.r.o. / The Binding Site s.r.o. / YBUX s.r.o.

ZA PODPORY



XXXII.

Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí

Rádi Vás
v Olomouci uvidíme
i příští rok

27. - 29. 5. 2018

www.olhemdny.cz