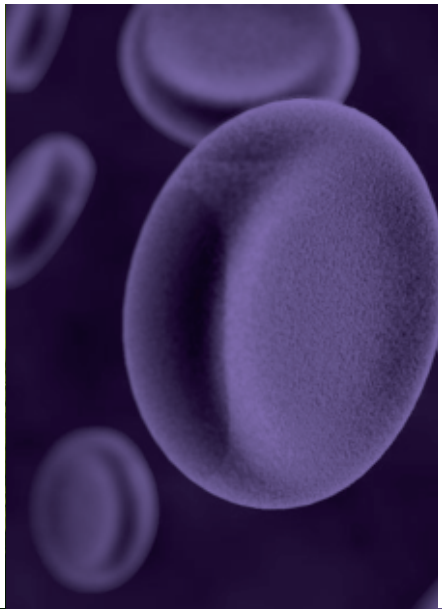


SBORNÍK ABSTRAKT

OHD

XXVI. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí

XVI. Konference ošetřovatelství a zdravotních laborantů

5th Symposium on Advances in Molecular Hematology

www.olhemdny.cz

Akreditováno EHA

24. – 26. 6. 2012

NH Hotel a OMEGA centrum Olomouc

POŘÁDAJÍ

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

POD ZÁŠTITOU

rektora UP v Olomouci Prof. RNDr. M. Mašláně, CSc.
děkana LF UP v Olomouci Prof. MUDr. M. Koláře, Ph.D.
hejtmana Olomouckého kraje Ing. M. Tesaříka

GENERÁLNÍ PARTNEŘI

Bristol - Myers Squibb spol.s.r.o. / Novartis s.r.o.

HLAVNÍ PARTNEŘI

GlaxoSmithKline s.r.o. / Roche s.r.o.

VÝZNAMNÍ PARTNEŘI

AOP Orphan Pharmaceuticals AG / Hospira Czech Republic s.r.o. / Astellas Pharma s.r.o. / Janssen - Cilag s.r.o. / Merck Sharp & Dohme s.r.o. / Sysmex CZ s.r.o. / Amgen s.r.o.

PARTNEŘI

Bayer s.r.o. / Baxter Czech spol. s r.o. / Beckman Coulter Česká republika s.r.o. / Berlin-Chemie / A. Menarini Ceska republika s.r.o. / Biohem spol. s r.o. / Celgene s.r.o. / CSL Behring s.r.o. / Fresenius Medical Care Česká republika spol. s r.o. / Grifols s.r.o. / KRD obchodní společnost s.r.o. / LabTechnik s.r.o. / Medista spol. s r.o. / Octapharma CZ s.r.o. / OMS-ZOLL s.r.o. / Pfizer Inc. / S.A.B. Impex s.r.o. / Sandoz s.r.o. / Sanofi-Aventis s.r.o. / Terumo BCT / Teva Pharmaceuticals ČR s.r.o. / The Binding Site s.r.o. / Werfen Czech s.r.o.

Haimaom

Nadace na podporu transplantace kostní dřeně

Hemato-onkologická klinika
Fakultní nemocnice Olomouc

DĚKUJEME ZA PŘÍZEŇ A PODPORU!

Nadace na podporu transplantace kostní dřeně, pomoc lidem s krevními nádory a vrozenými poruchami krevního srážení, Hemato-onkologická klinika FN Olomouc, I.P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc, tel. 588 444 360, fax 588 442 517, IČO: 66935610, bankovní spojení: KB Olomouc, a.s., č.ú. 19-1012660297/0100, **www.haimaom.cz**

Created by BastArt.cz

RÁDI VÁS V OLOMOUCI UVIDÍME I PŘÍŠTÍ ROK

OHD

XXVII. OLOMOUCKÉ HEMATOLOGICKÉ DNY
12.–14. 5. 2013

OBSAH

PŘEDNÁŠKY

2–3 PH NEGATIVNÍ MYELOPROLIFERACE
4–8 OŠETŘOVATELSTVÍ
9–11 5TH SYMPOSIUM ON ADVANCES IN MOLECULAR HEMATOLOGY 1
12–14 MNOHOČETNÝ MYELOM
15–16 LABORANTSKÁ SEKCE 1
17–20 5TH SYMPOSIUM ON ADVANCES IN MOLECULAR HEMATOLOGY 2
21–24 CHRONICKÁ LYMFATICKÁ LEUKEMIE
25–27 LABORANTSKÁ SEKCE 2
28–31 NE–HODGKINSKÉ LYMFOMY 1
32–34 TRANSPLANTACE 1
35–38 NE–HODGKINSKÉ LYMFOMY 2
39–41 TRANSPLANTACE 2
42–45 CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKEMIE / MYELOPROLIFERATIVNÍ ONEMOCNĚNÍ
46–48 VARIA

POSTEROVÁ ČÁST

50 OŠETŘOVATELSTVÍ
50–52 CHRONICKÁ LYMFATICKÁ LEUKEMIE
53 LABORANTSKÁ SEKCE
54–55 MNOHOČETNÝ MYELOM
56 NE–HODGKINSKÉ LYMFOMY
57 TRANSPLANTACE
58–60 CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKEMIE / MYELOPROLIFERATIVNÍ ONEMOCNĚNÍ
61–62 VARIA
63 ANÉMIE
64 MDS
64–67 AKUTNÍ LEUKEMIE
68–70 HEMOSTÁZA
71–72 LABORATORNÍ HEMATOLOGIE

POUZE PUBLIKACE

74–77 SDĚLENÍ POUZE K PUBLIKACI

78–81 REJSTŘÍK AUTORŮ

Sborník abstrakt vydalo
Vydavatelství UP Olomouc
Univerzita Palackého v Olomouci
Křížkovského 8
771 47 Olomouc
ISBN 978-80-244-3157-4
Olomouc, 2012
1. vydání

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

PH-NEGATIVNÍ MYELOPROLIFERACE

2159.
Diferenciální diagnostika a léčba polycytemií
Prchal Josef *(Salt Lake City, UT – USA)*

ND.
Diagnostika a liečba esenciálnej trombocytémie a primárnej osteomyelofibrózy
Tóthová Elena *(Klinika hematológie a onkohematológie, Univerzitná nemocnica L. Pasteura, Košice – SVK)*

2222.
Biopsia kostnej drene pri myeloproliferatívnych neopláziách – potreba či prežitok?
Marcinek Juraj, Szépe Peter, Plank Lukáš *(Ústav patologickej anatómie a Konzultačné centrum hematopatológie Jesseniovej lekárskej fakulty Univerzity Komenského a Univerzitnej nemocnice, Martin - SVK)*

Klasifikácia Svetovej zdravotníckej organizácie je dnes jediná, celosvetovo akceptovaná a v praxi používaná klasifikácia nádorových ochorení KD, založená na korelácii morfológie nádorových buniek s klinickými údajmi, výsledkami laboratórnych a genetických vyšetrení. MPN sú pestrá skupina ochorení s dynamickým rozvojom z počiatočných štádií, cez štádiá s rozvinutou a typickou klinickou manifestáciou až do terminányých štádií fibrotickej resp. blastickej transformácie. Morfologický a laboratórny obraz týchto ochorení a ich klinická manifestácia preto závisia na štádiu, v ktorom je toto ochorenie zachytené. Najmä v počiatočných štádiách je klinická manifestácia MPN podobná (zvyčajne trombocytóza v periférnej krvi-PK) a ich odlíšenie na základe klinicko-laboratórnych údajov je nespoľahlivé. Rozvinuté štádiá MPN majú typický klinicko-laboratórny obraz, ktorý sa však v terminálnych štádiách MPN stiera (pancytopénia v PK). V skupine Ph1 negatívnych MPN nachádzame často mutáciu JAK2V617F a menej často aj iné mutácie. Ich prítomnosť potvrdzuje klonalitu ochorenia, avšak diferenciálne-diagnostický význam je limitovaný (výskyt pri viacerých typoch Ph1- MPN ako aj iných myeloidných neopláziách). Podobne absencia genetických mutácií neumožňuje vylúčenie MPN, resp. potvrdenie reaktívneho pôvodu myeloproliferácie. Bioptické vyšetrenie KD umožňuje okrem potvrdenia MPN (vrátane prípadov bez genetických mutácií) aj ich bližšiu subtypizáciu, ktorá má rozhodujúci význam najmä pre prognózu a čiastočne aj terapiu pacienta. Zároveň umožňuje odlíšenie reaktívnych zmien hemopoézy (klinicky imitujúcich MPN bez genetických mutácií), zhodnotenie prognosticky významných morfologických znakov (stupeň myelofibrózy a množstvo blastov KD) a sledovanie progresie ochorenia do terminálnych štádií, kde už (rovnako ako u pacientov po cytoredukčnej terapii MPN) však bližšia typizácia MPN na základe morfológie KD nie je možná. Výpovedná hodnota bioptického vyšetrenia je do značnej miery závislá na kvalite a kvantite vyšetrovaného materiálu a hodnotenie morfológie KD je relatívne subjektívne, závislé na množstve vedomostí a skúseností vyšetrujúceho patológa. Správna interpretácia bioptického obrazu KD nie je možná bez dostatočného množstva základných klinických informácií, výsledkov laboratórnych vyšetrení a v zložitých prípadoch je aj neodceniteľná pomoc genetických vyšetrení. Podporené grantovými projektami Centra excelencie CEPV II (IMTS 26220120036) a MBRKM (IMTS 26220220113).

2182.
Prevencia, diagnostika, prognóza a liečebný prístup ku trombotickým komplikáciám pri Ph-myeloproliferatívnych ochoreniach (MPO)
Bátorová Angelika *(Klinika hematológie a transfuziológie Lekárkej fakulty UK, SZU, Univerzitná nemocnica, Bratislava – SVK)*

Vaskulárne komplikácie predstavujú závažný faktor morbidity a mortality klasických Ph-negatívnych MPO, pravej polycytémie (PV) a esenciálnej trombocytémie (ET). Pri PV vzniká trombóza až u 40–50% pacientov, pričom až u 20–40% jedincov môže byť bezprostrednou príčinou smrti. Frekvencia trombotických komplikácií pri ET je 20–50%. Až 2/3 trombotických prejavov predstavujú arteriálne

trombózy a približne 1/3 trombózy venózneho systému, z nich medzi najzávažnejšie patria trombózy splanchnických žíl. Patogenéza trombózy pri MPO stále nie je celkom objasnená, úlohu môžu zohrávať abnormality trombocytov a leukocytov,ich aktivácia a vzájomné interakcie, hyperviskozita a hemoreologické poruchy. Absolútny počet trombocytov a funkčné abnormality zisťované in vitro nemajú prediktívny význam pre trombózu, rovnako nejasný ostáva význam klasických kardiovaskulárnych rizikových faktorov a vrodených a získaných trombofilných stavov. Za jednoznačné rizikové faktory trombózy pri PV a ET sa považujú vek >60 rokov a prekonaná trombóza v anamnéze, ktoré charakterizujú „vysoké riziko trombózy". Nedávno definované, s chorobou súvisiace potenciálne determinanty trombózy sú iniciálna leukocytóza a prítomnosť mutácie JAK2V617F. Podľa odporučení ELN (European Leukemia Net) sú pacienti stratifikovaní do rizikových skupín trombózy, ktoré determinujú rozhodnutie o cytoredukčnej liečbe. Výsledky štúdie ECLAP potvrdili priaznivý efekt užívania aspirínu na zníženie incidencie infarktu myokardu, mozgových príhod, veľkých venóznych trombóz a kardiovaskulárnych úmrtí pri PV, bez signifikantného zvýšenia krvácania. Využitie týchto poznatkov pri liečbe ET ukázalo menej presvedčivé výsledky. U vysoko-rizikových pacientov je indikovaná cytoredukčná liečba. Predpokladá sa, že hydroxyurea (HU) môže mať komplexnejší efekt v prevencii vaskulárnych príhod ako anagrelid, keďže HU môže okrem počtu trombocytov ovplyvniť aj leukocytózu, aktiváciu leukocytov a tvorbu trombocyto-neutrofilných agregátov. Diagnostika a liečba trombózy pri MPO sa riadi štandardnými zásadami, zvlášť náročné na manažment sú abdominálne trombózy. Pri trombóze splanchnických žíl je iniciálne indikovaná plne dávkovaná heparinizácia aj napriek riziku gastrointestinálneho krvácania, a následne celoživotná antikoagulačná liečba warfarínom (INR 2,0-3,0). Pri Budd-Chiariho syndróme je nutná intenzívna medikamentózna liečba vrátane antikoagulačnej liečby, v najťažších prípadoch sú indikované chirurgické postupy prípadne až transplantácia pečene.

2178.
Molekulární genetika v diagnostice a stanovení prognózy Ph-negativních myeloproliferativních neoplázií
Katrincsáková Beáta, Jarošová Marie, Indrák Karel *(Hemato-onkologická klinika, FN a LF UP, Olomouc)*

2210.
Cytogenetika v diagnostice a stanovení prognózy u Ph-negativních myeloproliferací
Jarošová Marie, Holzerová Milena, Nedomová Radka, Mičková Pavla, Reptová Silvie, Hanzlíková Jana, Kropáčková Jitka, Prekopová Ivana, Indrák Karel *(Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc)*

2240.
Molekulární biologie v diferenciální diagnostice erytrocytóz
Prchal Josef *(Salt Lake City, UT – USA)*

2242.
Současný pohled na diagnostiku a léčbu Ph-negativních myeloproliferatiivních onemocnění v dětském věku
Pospíšilová Dagmar *(Dětská klinika FN, Olomouc)*

MEDICÍNSKÉ PRÁVO

Právní aspekty poskytování zdravotní péče a nová zdravotnická legislativa
– problematiku přednáší Dostál O. a Těšínová J. *(Praha)*

OŠETŘOVATELSTVÍ

2158.
Bakterie mezi námi
Kolář Milan *(Ústav mikrobiologie, LF UP a FN, Olomouc)*

Nedílnou součástí života lidí jsou bakterie, tvořící normální mikroflóru lidského těla. Vztah mezi bakterií a makroorganismem lze ve většině případů charakterizovat jako fyziologickou interakci, v jejímž rámci je vzájemné působení synergické. Bohužel, tento vztah může být i nefyziologický, kdy se bakterie za určitých podmínek uplatňují jako původci infekcí. Bakteriální infekce mohou být klasifikovány jako exogenní, kdy zdroj bakterie je mimo lidské tělo. Jako příklad lze uvést např. kampylobakteriózy a salmonelózy. Mnohem častější jsou však infekce endogenní, kdy původce pochází z mikroflóry lidského těla. Zásadní otázkou je však skutečnost, zdali se jedná o primární nebo sekundární osídlení, a to z důvodu vyšší míry odolnosti k antibiotické léčbě v případě sekundární mikroflóry. Významným a stále se zvyšujícím problémem je rezistence bakteriálních patogenů k antibiotikům. Tuto skutečnost lze dokladovat u grampozitivních bakterií, například methicilin-rezistentních kmenů *Staphylococcus aureus* a vankomycin-rezistentních enterokoků. U hemato-onkologických pacientů však v poslední době narůstá význam multirezistentních gramnegativních bakterií, které představují značné ohrožení pacientů v případě infekcí vyvolaných těmito kmeny. K nejzávažnějším patří enterobakterie s produkcí širokospektrých beta-laktamáz a rezistentní nefermentující bakterie, především kmeny *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* a *Stenotrophomonas maltophilia*. Stoupající četnost uvedených bakteriálních kmenů je asociována s vyšší morbiditou a mortalitou pacientů, přičemž možnosti adekvátní antibiotické léčby jsou stále více limitovány. S určitou nadsázkou lze deklarovat, že v případě terapeutických možností infekcí vyvolaných gramnegativními bakteriemi se medicína vrací o 30 let zpátky a možnost vzniku pandemie infekčních onemocnění vyvolaných multi- a panrezistetními kmeny je stále vyšší. Tento fakt spolu se skutečností, že na obzoru nejsou nová antibiotika řešící tento problém, představuje „smrtící kombinaci". Problém bakteriální rezistence je multifaktoriální a musí být řešen na základě interdisciplinárního přístupu. Je nutná úzká spolupráce všech zdravotnických pracovníků s cílem zachovat účinnost antibiotik. Pokud si položíme otázku: Je současná medicína schopna se obejít bez antibiotik? Odpověď zní: Ne, není to možné! Z tohoto pohledu je nutné přistupovat k problematice bakterií, bakteriálních infekcí a antibiotické léčby. Podpořeno VVZ MSM6198959205.

2209.
Zátěž reverzní izolace u pacientů postupujících transplantaci kmenových buněk na Hemato-onkologii ve Fakultní nemocnici Olomouc
Vítková Jitka *(Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc)*

Jednou z možností léčby u hematologických malignit je transplantace periferních kmenových buněk nebo kostní dřeně. Součástí každé transplantace je přípravný režim pomocí vysokodávkované chemoterapie, popřípadě celotělového ozáření. Tato agresivní protinádorová léčba poškodí v různém stupni imunitní systém pacienta a ten je náchylný k infekčním komplikacím. Reverzní izolace má za úkol těmto infekčním komplikacím zabránit nebo je alespoň snižovat. Tento ochranný režim skládající se z řady opatření v oblasti samostatného pokoje s laminárním prouděním vzduchu s HEPA filtry, zvýšené osobní hygieny, desinfekce a sterilizace ploch, předmětů, úpravy jídla, filtrace vody, nemocné na transplantační jednotce zatěžuje. Do jaké míry tato omezení transplantovaným pacientům vadí, bylo zkoumáno pomocí dotazníkového šetření probíhajícího v rámci bakalářské práce na HOK FN OL v roce 2011. S výsledkem tohoto zjištění budete seznámeni na OHD.

2117.

Aspekty adaptačního procesu v oboru hematoonkologie

Zítková Marie, Juřeníková Petra, Špačková Jana *(Interní hematoonkologická klinika FN, Brno, Katedra ošetřovatelství, LF MU, Brno)*

Adaptační proces představuje klíčové období v profesním životě každé sestry, zásadně ovlivňuje jejich další setrvání či nesetrvání v oboru a nastartovává jejich další odborný i lidský rozvoj. Nový pracovník je postaven před náročnou cestu vybudování si pracovních návyků, získání praktických a dalších teoretických zkušeností, sžití se s kolektivem spolupracovníků tak, aby byl schopen kladené nároky zvládnout. Metoda: Dotazníkové šetření bylo provedeno v období 2008 - 2010. Cílovou skupinou respondentů byly nově nastupující všeobecné sestry do pracovního poměru na dané pracoviště. Pro splnění stanovených cílů byly dotazníky rozdávány v odstupu 3 měsíců (skupina A) a 12 měsíců (skupina B) po nástupu nového pracovníka na pracoviště v celkovém počtu 60. Celkový počet respondentů byl limitován počtem nově nastupujících pracovníků. Vzhledem k celkovému počtu respondentů byl ke statistickému zpracování zvolen Freeman-Haltonův test pro hladinu významnosti $p \leq 0,05$. Výsledky Soubor A: Společné zařazení ve službách společně se sestrou školitelkou v délce 4 týdny zaznamenalo 58 % dotázaných, 16 % uvedlo délku společných služeb 5 týdnů a 3 týdny a pouze 10 % uvedlo týdny 2. Spokojenost s průběhem spojených služeb uvedlo všech 100 % respondentů. Jako největší pomoc v tomto období respondenti v 87 % pojmenovali podporu školitelky a kolegyní, 10 % vyhovovalo časté provádění výkonů a pro 3 % dotázaných byla pomocí osobní silná vůle. Počátek samostatné práce respondenti charakterizovali přítomností nervozity 35 %, strachu a obav 26 % a v 16 % nedostatečnou organizací práce. Nejvíce obávanou činnost v počátku samostatné práce představovala shodně organizace práce a plnění ordinací 17 %, manipulace s chemoterapií 12 %, shodně 10 % uvedlo manipulaci s žilními katetry a krevní odběry. Dále byly uvedeny obávané činnosti péče o mrtvé a resuscitace, shodně 7 %. Jako přetrvávající obávané činnosti v souboru B dotázaní uvedli v 31 % resuscitaci, péči o mrtvé v 17 %, žádné činnosti 14 % a nové činnosti jsou stále obávanou činností pro 11 % dotázaných. Spolupráci s mentorem 86 % dotázaných ohodnotilo stupněm 1, známka 2 byla zaznamenána 14 % dotázanými. Závěr Pro adekvátní řízení pracovní adaptace je potřebné disponovat s co největším počtem informací o potřebách, problémech, konkrétních problémových činnostech, s kterými se noví pracovníci v praxi potýkají. Vzdělávání nových pracovníků patří mezi priority manažerské práce v ošetřovatelství.

2234.

Léčba maligních exulcerujících ran u pacientů s lymfomem

Vodičková Marcela, Labudíková Monika, Kajaba Václav *(Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc)*

Při onemocnění lymfomem se často objevují maligní exulcerující defekty v místě infiltrace onemocněním. Setkáváme se s hlubokými otevřenými ranami s poškozením podkoží, svalů, fascií i kostí. Léčba maligních defektů je vždy velmi složitá a proto by měla být komplexní a interdisciplinární. Dle stadia a typu onemocnění se volí léčba celková i lokální. V péči o maligní rány je vždy prioritou ovlivnit negativní symptomy (zápach, sekreci, krvácení) a stanovit reálné cíle. S úspěchem využíváme materiály a preparáty vlhké terapie (algináty, krytí se stříbrem,aktivním uhlím, silikony, polyuretanové pěny aj). Vhodný obvaz je takový, který odvádí sekret, zabraňuje zápachu, snadno se odstraňuje a je pokud možno atraumatický pro pacienta. Důležitou součástí ošetřování maligních defektů je také monitorace nutričního stavu pacienta, který ovlivňuje reparační procesy tkání. Dobře zvládnutý manažment bolesti, edukace a psychického stavu nemocného umožní získat pacienta a jeho rodinu pro další spolupráci v domácím ošetřování. Budeme prezentovat 2 kazuistiky ošetřování maligní rány na HOK za rok 2011 a 2012. Kazuistika č.1 Žena 35 let odeslána z ortopedické kliniky nemocnice Sv. Anny v Brně,kam přeložena z ortopedické kliniky FN Olomouc pro nejasnou diagnózu maligní rezistence levého kolene. Na naší kliniku přijata 22.2.2012 s dg.Difuzní velkobuněčný lymfom s exulcerujícím maligním defektem levého kolene a bérce o velikosti 22x12cm. Zahájila léčbu chemoterapií, kterou provázela intenzivní péče o ránu s použitím materiálů vlhkého hojení. Po 50-ti dnech ošetřování rána velikosti 8x7cm. Nyní pacientka převážně v ambulantní péči. Kazuistika č. 2 Muž 34let s dg. M. Hodgkin sledován na naší klnice od roku 1998. Po několika letech léčby chemoterapií, radioterapií,autologní transplantaci a po opakovaných relapsech onemocnění s přetrvávající exulcerující píštělí v levé axile se pacient

4.2.2010 rozhodl odmítnout další nabízenou léčbu. Vyhledal léčitele a zvolil samoléčbu. 7.12.2011 přijat na HOK s rozsáhlou nekrózou levé lopatky a axily o velikosti 20x30cm s postižením svalů i kosti. Zahájena lokální léčba rozsáhlého exulcerujícího defektu. Pacient přeložen do spádové nemocnice, kde po několika týdnech na progresi základního onemocnění umírá.

2247.
Zákon o zdravotních službách: nové aspekty vztahu zdravotníka a pacienta
Procházka Vít *(Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc)*

2119.
Mladým lékařem v srdci rovníkové Afriky
Schwarz Rodion, Krčméry Vladimír, Charvátová Eva, Rothbauerová Anna, Farkašovská Daniela *(Podolská ordinace s.r.o., Praha Vysoká škola zdravotníctva a sociálnej práce sv. Alžbety, Bratislava - SVK)*

Když se změní povaha člověka, změní se i svět. Myšlenky jsou podkladem skutků a skutky jsou jejich výslednice. Snaha dat touhu po pravdě byla jedna z hlavních náplní naší mise. Pravda existuje. Je základem všeho. Kdyby se lidí k ní otočili, dostaly by i inspiraci z té pravdy. Pak nebudou špatní, nebudou sobečtí, liškovití, mazaní, jako se teď celý svět vytváří. Musíme si uvědomit, že budeme mít takové prostředí, jací budeme sami. Když budeme dobří, bude dobré. Když budeme sobečtí, bude sobecké. Když si uvědomíme, že na tomto světě nebudeme věčně, že se jedná jen o příležitost změnit jej k lepšímu, změní se i náš pohled na život svůj i svého okolí, kolegů a pacientů. Je podivné, že většina má přesně opačný pocit. Tato přednáška bude jen vyústěním myšlenek a popisem činností, jejíž náplni bude snaha o impulz k novému vnímání profese zdravotníka, bytí. Způsobů jak toho dosáhnout je mnoho, stejně jako cest na vrchol hory. Každý musí tu svou najít podle vlastních sil a obtížnosti. Tou mou byla Afrika.

2138.
Léčebné erytrocytaferézy na Transfuzním oddělení Fakultní nemocnice Olomouc
Chmelová Soňa, Provazová Jana, Entrová Alice, Galuszková Dana *(Transfuzní oddělení, FN, Olomouc)*

Úvod: Činnost TO FNOL je od roku 2005 rozšířena o léčebný aferetický program (léčebné depleční erytrocytaferézy). Z hematologických ambulancí jsou k nám k těmto výkonům odesíláni pacienti nejen z FNOL, ale z celého Olomouckého kraje. V naší kartotéce máme již evidováno celkem 93 pacientů (56 mužů a 37 žen), jejich věk je 20 až 87 let. Nejčastější indikací k provedení léčebné depleční erytrocytaferézy na našem pracovišti jsou pacienti s dg. polycytemia vera, kteří tvoří 80%. Další indikace jsou méně frekventní (sekundární polyglobulie, primární hemochromatóza, familiární erytrocytóza). Metodika: Léčebné depleční erytrocytaferézy provádíme na třech přístrojích (MCS+), procedura „Therapeutic a autologous erytropheresis“ (TAE) se setem REF 944. Léčebné výkony provádí zaškolené všeobecné sestry v odběrovém sálku pro pacienty. Léčebné režimy umožňují individuální nastavení parametrů separace dle aktuálních hodnot pacienta (možno nastavit cílový hematokrit, odebíraný objem erymasy, objem kompenzace fyziologickým roztokem). Pacienti jsou na výkony objednáváni, v případě akutního požadavku jsme schopni provést výkon kdykoliv. Výsledky: Data v této prezentaci jsou zpracována od r. 2005 do r. 2011. Ve sledovaném období jsme provedli 462 léčebných výkonů. Počet provedených léčebných aferéz má od roku 2005 vzestupnou tendenci. Za rok 2011 jsme na našem pracovišti provedli 105 těchto léčebných separací, frekvence odběrů je individuální v závislosti na diagnoze, hodnotách krevního obrazu a klinických symptomech pacienta (průměrná frekvence odběrů je 2 až 4 ročně). Hematokrit pacientů před separacemi se pohybuje od 0,45 do 0,66. Množství odebrané erymasy při jedné separaci bylo v rozmezí 420g až 626g. Průměrná délka výkonu byla 45 minut. Léčebné erytrocytaferézy jsou ze strany pacientů dobře snášeny, komplikace jsou minimální. Závěr: Depleční léčebné erytrocytaferézy rozšířily činnost klinické části našeho pracoviště. Počet pacientů i počet provedených výkonů každoročně narůstá. Depleční erytrocytaferéza je pro pacienta větším přínosem, než běžná venepunkce plné krve. Odebíráme jednorázově daný objem erymasy z jednožilního vstupu a intervaly mezi separacemi jsou tak delší. Výkony přispívají ke zlepšení kvality života pacientů.

2248.
Komunikace s rodinou pacienta v terminálním stádiu
Jelínková Eva *(Care of you, s.r.o., Vyškov)*

Moderní ošetřovatelství rodinu klienta z péče o nemocného nevyčleňuje, naopak rodina se stává aktivním článkem v ošetřovatelském plánu. Zdravě fungující rodina má v procesu péče nezastupitelné místo. Sestra stráví s pacientem i s jeho rodinou mnoho času, proto je nezbytné, aby si dokázala získat jejich důvěru. Pokud je sestra aktivní při komunikaci s rodinou nemocného, může předcházet možným komplikacím, ke kterým by mohlo docházet. Získání důvěry ze strany rodiny je dobrým základem pro kvalitní vztah mezi sestrou, nemocným klientem i jeho rodinou. Tato důvěra je totiž velice důležitá pro poskytování kvalitní ošetřovatelské péče a při uspokojování všech bio-psycho-sociálních potřeb klienta. Nemoc a závažný zdravotní stav představuje nejen pro klienta, ale i jeho rodinu stresovou situaci, se kterou se každý člen rodiny individuálně vyrovnává. Při komunikaci a interakci s rodinou je nezbytné si uvědomovat, že rodina jako celek i jednotliví její členové mají svoji psychologii a svou historii, se kterou by se sestra a další zdravotnický personál měl seznámit a akceptovat ji. Vhodnou komunikační formou s rodinou těžce nemocného klienta a klienta v terminálním stádiu je nedirektivní psychoterapeutický přístup. Být vstřícnou, empatickou a respektující sestrou v náročných situacích, kterými rodina prochází, je projevem vysoce profesionálního chování.

2122.
Používání měkkých silikonů na převazy – drahé nebo ekonomické? (kazuistika, kalkulace)
Chvojková Ivana, Bystřická Eva, Řezáčová Šárka, Hlinková Zdeňka *(Hemato-onkologické oddělení, FN, Plzeň)*

Úvod: Porušení kožní integrity u hemato-onkologických pacientů představuje jednu z možných komplikací. Hrozí zde několik závažných rizik, které mohou ohrozit nemocného i na životě. Riziko vniku infekce, obtížné hojení rány v důsledku základního onemocnění, probíhající léčby a v neposlední řadě i z možné malnutrice pacienta. Z těchto důvodů je velmi důležité u hemato-onkologických pacientů zvolit vhodný materiál k ošetřování a převazům ran. Moderní materiály používané v dnešní době k ošetřování ran a defektů postupně vytlačují klasická obinadla a suché gázy. Aplikace těchto materiálů minimalizují trauma a bolest při převazech a tím blahodárně působí i na emoční stav pacienta. Měkká silikonová krytí snižují poškození okolní kůže i samotného lůžka rány, mají hydrofobní schopnost, neadherují k vlhkému lůžku rány a velmi jemně přilnou k okolní kůži a k suché ráně. Při použití těchto materiálů je zachována kontinuita v hojení rány i přísná sterilita. Bohužel cena těchto materiálů je na první pohled příliš vysoká, ale při správném používání a jejich výrazných hojivých účincích je ošetřování ran nejen úspěšnější a rychlejší, ale i levnější než při použití starých klasických obvazových materiálů. Ráda bych toto prezentovala v kazuistice včetně cenového rozboru. Kazuistika: Pacient 33let s ALL od roku 2006 pro relaps provedena v roce 2008 alogenní nepříbuzenecká transplantace krvetvorných buněk, potransplantační těžká střevní forma GvHD, která nereagovala na konzervativní léčbu. Z vitální indikace provedena resekce tenkých kliček a následně i subtotální kolektomie, založena jejunostomie. V důsledku trvající imunosupresivní léčby následovalo několika týdenní sekundární hojení operační rány s chronickou rannou infekcí. K převazům byla zvolena metoda vlhkého hojení ran, která se nám velice osvědčila a v důsledku byla cenově výhodnější oproti standardním převazům.

2246.
Hereditárna hemoragická teleangiektázia – kazuistika
Chrenová D., Bíziková T., Hollý P. *(Klinika hematológie a transfuziológie, Jesseniova lekárska fakulta Univerzity Komenského Univerzitná nemocnica, Martin - SVK)*

Hereditárna hemoragická teleangiektázia (morbus Rendu-Osler-Weber; HHT) je vrodeným ochorením, charakterizovaným poruchou regulácie cievnej steny, ktorá vedie k tvorbe patologicky rozšírených drobných ciev (teleangiektázie) a arterio-venóznych malformácii a to v typickej lokalizácii na koži a slizniciach alebo vo vnútorných orgánoch. Zmena cievnej steny je spojená s chronickými krvnými stratami, stupňujúcimi sa vekom a vedúcimi k rôzne ťažkému anemickému syndrómu. Ide o vzácne, autozomálne dedičné ochorenie, ktorého presný výskyt nie je známy. Jeho kauzálna liečba nie je v súčasnosti známa, terapeutické intervencie sú zamerané predovšetkým na prevenciu a liečbu ane-

mického syndrómu a v menšej miere na obmedzenie krvácania z postihnutých ciev, vrátane využitia chirurgickej intervencie. Kazuistika popisuje prípad 65-ročného muža s HHT, dlhodobo sledovaného na našom pracovisku. Ochorenie sa manifestovalo opakovanými epistaxami, vedúcimi k protrahovanému anemickému syndrómu stredne ťažkého až ťažkého stupňa. V práci je opísaný klinický priebeh ochorenia za obdobie posledných 6 rokov s poukázaním na častý výskyt epizód krvácania a ich dôsledky ako aj potrebu dlhodobého sledovania a spolupráce s pacientom.

2128.

Pemphigus vulgaris, terapie plazmaferézou

Krpatová Jana, Urbanová Jitka, Salavec Miloslav *(Klinika nemocí kožních a pohlavních, FN a LF UK, Hradec Králové)*

Pemphigus vulgaris patří do skupiny onemocnění asociovaných s autoprotilátkami namířenými proti transmembránovým proteinům desmozomálních komponent. Diagnostika onemocnění je založena na histologickém vyšetření, s průkazem intraepidermálně lokalizované dutiny puchýře. Pro onemocnění je typická ztráta keratocytární adheze intraepidermálně,dochází ke vzniku puchýře v epidermidis,štěpení začíná suprabazálně (nad bazální vrstvou pokožky). Dále se v diagnostice uplatňuje imunofluorescenční vyšetření, zejména pak průkaz lineární fluorescence v intercelulární substanci epidermidis (mezibuněčný tmel v epidermidis).Terpie tohoto onemocnění spočívá především v dlouhodobém systémovém podávání kortikoidů, lze užít i adjuvantní terapii. Kortikoidy šetří terapii jinými imunosupresivy (azathioprim, cyklophosfamid, chlorambucil, cyklosporin A). Velmi důležitá je nutriční podpora v důsledku rozsáhlých poškození kůže. Nedílnou součástí terapie je lokální léčba, sušení erozí po stržení puchýřů a lokální protizánětlivá léčba. Pacient, 49-let, depresivně laděný v důsledku rodinných problémů. V červnu 2011 u pacienta došlo k výsevům puchýřů a erozí na trupu, končetinách, ve kštici a následně i v dutině ústní. Histologicky byl verifikován *Pemphigus vulgaris*, nepřímá imnofluorescence, prokazující cirkulující autoprotilátky IgG třídy v séru nemocných, byla silně pozitivní proti mezibuněčnému tmelu epidermidis až k ředění 1:40. V listopadu 2011 se u pacienta objevily v horní části zad a na přední straně hrudníku eroze v rozsahu 2-4cm a červenorůžová makulózní ložiska. Na dolních a horních končetinách bez kožních změn, ve kštici prokázány eroze s krustami, na boltci a na temeni nález normální. Na kůži v obličeji nečetné růžové makuly a dutina ústní byla v této době bez projevu slizničního poškození. Pro špatnou odpověď na terapii kortikoidy a v důsledku manifestace vedlejších účinků této systémové terapie bylo rozhodnuto o plánované hospitalizaci na Kožní klinice FN-HK k provedení plazmaferézy a k lokální terapii. V plánu byla série pěti plazmaferéz, dohodnuto na Oddělení klinické hematologie FN-HK (na separátoru). Výkon probíhal bez komplikací, standardním způsobem. Po provedené sérii plazmaferéz a při lokální a další systémové terapii došlo k výraznému zlepšení stavu pacienta.

5TH SYMPOSIUM ON ADVANCES IN MOLECULAR HEMATOLOGY 1

2239.

Significance of hepcidin levels assessment in the diagnosis of selected types of anemia in childhood

Pospíšilová Dagmar, Holub Dušan, Houda Jiri, Sulovska Lucie, Mojzikova Renata, Ludikova Barbora, Zidova Zuzana, Horvathova Monika *(Department of Pediatrics, Faculty Hospital; Laboratory of experimental medicine; Department of Biology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc)*

Introduction. The peptide hormone hepcidin is the main regulator of iron homeostasis, which inhibits intestinal iron absorption and mobilization of iron from the stores. We aimed to assess hepcidin levels and their diagnostic value in paediatric patients with selected types of anaemia: Diamond-Blackfan anemia (DBA), pyruvate kinase (PK) deficiency, iron deficiency anemia (IDA) and anemia in inflammatory bowel disease (IBD). Patients and Methods. Using the proteomic analysis, hepcidin level was measured in 33 children – 17 boys and 16 girls (6 patients with DBA, 5 patients with PK deficiency, 10 patients with IDA and 12 patients with IBD) at the age of 6 months to 18 years and compared to those in a cohort of 16 healthy children. Results. Hepcidin levels in patients with a severe form of DBA were significantly higher than those of controls ($p<0.0005$), even in spite of severe anemia and high erythropoietin levels. The inability to suppress hepcidin is likely caused by the absence of an "erythroid regulator" due to the severe reduction of erythropoiesis. On the contrary, hepcidin levels in patients with PK deficiency were significantly lower ($p<0.02$) which corresponds to ineffective erythropoiesis and increased levels of the putative negative regulator of hepcidin production: GDF15. Low hepcidin levels thus contribute to a greater iron overload in PK patients. In patients with IDA, significantly lower hepcidin levels ($p<0.01$) likely reflect an increased iron-demand. Surprisingly, no significant difference was found between hepcidin levels in IBD patients and the controls. However, we noted high variability of hepcidin levels in children with IBD, which may reflect the fact, that in some patients real iron deficiency prevails over the characteristic picture of anemia of chronic disease. Conclusion. Hepcidin level assessment can refine diagnosis in different types of anemia. It provides information not only about iron restricted erythropoiesis and the degree of iron overload, but also about the capacity of enterocytes to absorb iron from the intestine. It may be used as guidance when deciding on indications of oral and parenteral application of iron. The knowledge of hepcidin level in various pathological conditions may bring very important insights into the aspects of iron homeostasis that are yet unclear.

Grant support: Grant of Ministry of health NS 9951, NT 11059 and Internal grant of Palacky University Olomouc LF_2012_016.

2199.

Characterization of erythropoiesis in DMT1-mutant mice

Horváthová Monika, Židová Zuzana, Kapraľová Katarína, Doležal Dalibor, Divoký Vladimír *(Department of Biology and Department of Hemato-Oncology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc)*

Recessive mutations in divalent metal transporter 1 (DMT1) are responsible for the development of hypochromic microcytic anemia associated with ineffective erythropoiesis and iron overload. In contrast to human patients, the originally described mouse model with DMT1 mutation, mk/mk mice (strain MK/ReJ) presented with severe anemia and systemic iron deficiency. In this study we characterize iron metabolism and erythropoiesis in mk/mk mice propagated on novel 129S6/SvEvTac background. The 129S6/SvEvTac-mk/mk mice showed significantly increased plasma iron levels and elevated saturation of transferrin, but diminished iron stores in the spleen and liver when compared to wild-type (wt) littermates. Analysis of hepcidin, the key regulator of iron homeostasis, showed almost undetectable levels of hepcidin mRNA in mk/mk liver which negatively correlated with mRNA levels of the putative hepcidin suppressor growth differentiation factor 15 (GDF15) in the bone marrow. Colony forming assay revealed abnormal morphology and reduced number and cellularity of mk/mk erythroid colonies

in comparison with colonies of wt mice. All these characteristics improved by the addition of an iron donor, Fe-SIH to the culture. We previously showed that Fe-SIH also rescues the growth of patient's DMT1-mutant erythroid BFU-Es colonies. Flow cytometry analysis using Ter119/CD71 vital staining revealed abnormal pattern of erythroid differentiation in the bone marrow and spleen of mk/mk mice when compared to wt mice. Moreover, the mk/mk erythroblasts showed higher apoptotic rate than those of wt mice. Finally, we observed a markedly increased susceptibility of mk/mk erythrocytes to undergo apoptosis (eryptosis) after exposure to stress conditions in vitro in comparison with wt erythrocytes. We conclude that the phenotype of 129S6/SvEvTac-mk/mk mice differs from the originally described MK/ReJ-mk/mk mice but better resembles the clinical picture of DMT1-mutant patient. The difference between these two mouse strains is likely caused by genetic factors that modify iron homeostasis and which differ between the MK/ReJ and 129S6/SvEvTac strains. We also conclude that impaired DMT1 function negatively affects all stages in the erythroid lineage.
Grant support: Czech Grant Agency, grants No. P305/10/P210 and P305/11/1745; Internal Grant of Palacky University Olomouc (LF_2012_016).

2229.

Transcriptional regulation of EPO receptor gene (Epor) upon deficiency of divalent metal transporter-1 (DMT1)

Burda Pavel, Čuřík Nikola, Horváthová Monika, Divoký Vladimír, Stopka Tomáš *(Institute of Pathophysiology, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague; Department of Biology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc)*

Recessively inherited deficiency of divalent metal transporter 1 (DMT1) associates with severe microcytic anemia in human patients and in a mouse model (mk/mk mice). Impaired DMT1 function in erythroid progenitors blunts some aspects of erythropoietin (EPO) signaling. Activation of the Epor pathway with high EPO doses complements this defect (Horvathova et al, 2012). DMT1-deficiency may negatively affect transcriptional regulation of Epor gene and high EPO doses could stimulate Epor expression in DMT1-mutant erythroid cells. Indeed, treatment with EPO of the mk/mk mice increased the Epor expression. We asked whether Epor gene transcription is modulated in DMT1-deficient erythropoiesis. We firstly studied how erythroid transcription factor GATA-1 and its antagonistic factor PU.1 regulate Epor gene. We used mouse erythroleukemia (MEL) cells expressing ectopic 17b-estradiol-inducible form of Gata-1 (GER) or PU.1 (PUER). Indeed, Epor mRNA expression is stimulated by Gata-1 and inhibited by PU.1 within hours. By chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay we found that mRNA levels were reflected by changes in histone H3 lysine (K)9 acetylation specifically at -1.6 kb region upstream transcription start site. This region contains Gata-1 and PU.1 binding sites and also the binding sites of PU.1-regulated transcription factor Cebpa (CCAAT/enhancer-binding protein alpha). Transcription factors PU.1 and Cebpa promote differentiation towards monocytes and granulocytes and are involved in block of erythropoiesis by interfering with GATA-1. PU.1 and Cebpa are recruited at -1.6 kb region of Epor gene following stimulation of PUER cells by 17b-estradiol. The upstream Epor fragment was cloned to the reporter plasmid to test its transcriptional activity in respect to DMT1. At this point we uncovered new mode of transcriptional repression of Epor by PU.1 and Cebpa. We expect that our study will enhance understanding of relationship between DMT1 deficiency (and its effect on cellular mobilization of iron or other divalent metals including zinc) and erythroid transcriptional regulation of Epor induced by EPO.
Grant support P305/11/1745, P301/12/P380, P305/12/1033. Institutional funding: PRVOUK-P24/LF1/3, UNCE 204021, SVV-2012-264507, GAUK 251135 82210. SureChIP technology was supported by FR-TI2/509)

2232.

Deciphering the role of iron withdrawal by deferoxamine mesylate on regulation of cell cycle in pluripotent stem cells

Rašková Kafková Leona, Divoký Vladimír, Calábková Lenka *(Dept. of Biology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc)*

Iron chelation therapy is used in patients with myelodysplastic syndrome, and also with primary myelofibrosis to prevent complications of iron overload. Iron chelation allows controlling iron stores and

preventing iron-induced cardiac disease. The impact of chelation therapy on cancer cell iron metabolism is apparent but not well understood. Since a recent evidence of marked anti-tumor activity of iron depletion, the effect of iron chelation on cancer cell metabolism has become a task of many studies. As a model of cancer stem cells we use mouse embryonic stem cells (mESCs), naturally immortalized pluripotent cells with a high proliferation rate and rapid cell cycle progression. To remove iron ions from cultivation medium, we use deferoxamine mesylate (DFO), a large lipophilic molecule, which does not enter cells through the cell membrane. In somatic cells, iron depletion in vitro typically results in a G1/S arrest, rarely in a G2/M arrest, known to be regulated by checkpoint pathways. Our previous data showed that checkpoint response in mESCs varies from that in somatic cells. We previously suggested that low checkpoint activity in mESCs is connected with altered localization of checkpoint proteins. For iron depletion, we treated mESCs with 5 uM DFO for up to 72 hours. We did not observe any cell cycle arrest, and correspondingly, we did not detect activation of the main checkpoint proteins ATR, ATM, Chk1 and Chk2. The structure of mESCs cycle was preserved in iron depleted conditions, without accumulation of cells in particular phase. Further, we observed strong apoptotic response – 70% of dead cells after 72 h of iron chelation. This response is regulated through activation of caspase-3 after 24 h of iron chelation. Further, iron depletion is connected with decrease of ribonucleotide reductase (RR) activity. RR supplies cells with deoxyribonucleotides (dNTPs) for DNA synthesis. In mESCs the activity of RR decreased to 10% of its original activity after 48 h of iron chelation. The lack of dNTPs resulted in increase of DNA damage, which was measured as an increment of phosphorylation of gammaH2AX on Ser139. In conclusion, we propose that increase of DNA damage is an inevitable consequence of iron chelation; which (in contrast to somatic cells) in pluripotent mESCs leads to direct activation of apoptosis without activation of checkpoints.
Grant support: Projects No. NT12218 and P305-11-1745.

2230.

Functional consequences of the co-localization of the chromatin remodeling factor Smarca5 and the epigenetic insulator Ctcf in leukemia cells

Kapalová Martina, Burda Pavel, Vargová Karin, Zikmund Tomáš, Pospíšil Vít, Stopka Tomáš *(Institute of pathophysiology, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague)*

In this study we asked if major nucleosome assembly and spacing factor Smarca5 binds to DNA methylated regions and whether it influences DNA methylation. Two DNA regions were studied: H19/Igf2 Imprinting Control Region (ICR) and upstream regulatory element (URE) and enhancers of PU.1 gene. Three cell systems of AML were used: murine erythroleukemia cells with conditionally activated Smarca5 shRNA-expressing transgene (MEL-sh), OCI-M2 human erythroleukemia and c-kit+ AML blasts derived from mice with deleted URE (PU.1URE/URE). Firstly, we observed that Smarca5 occupies the ICR in MEL cells coincidently with high expression of H19 and very low expression of Igf2. This expression pattern is mediated by Ctcf, which was also detected on ICR. Next, we depleted Smarca5 in MEL-sh cells from ICR causing H19 expression to become downregulated. DNA methylation was found in three out of six amplicons at ICR. Upon induction of MEL-sh cells ICR become significantly demethylated. As Ctcf occupancy at ICR was also inhibited it led us to ask whether Smarca5 interacts with Ctcf and using co-immunoprecipitation this interaction was confirmed. To conclude this part, Smarca5 occupies ICR and is important for Ctcf binding and expression of its target gene H19. Smarca5 may be involved in DNA methylation of ICR. Next we asked whether DNA demethylation influences occupancy of Smarca5. We treated OCI-M2 and PU.1URE/URE blasts with 5-azacitidine (AZA) and determined DNA methylation status of the PU.1 gene that is known from other work in our laboratory to be severely DNA methylated and rapidly demethylated and transcriptionally upregulated by AZA. In AZA-untreated OCI-M2 cells Smarca5 is localized throughout the PU.1 gene by ChIP. Treatment with AZA results in DNA demethylation and loss of Smarca5 occupancy. DNA demethylation results in recruitment of Ctcf downstream the URE where Smarca5 occupancy is retained. In the PU.1URE/URE blasts, AZA treatment also depletes Smarca5 from the PU.1 gene, coincidently with PU.1 upregulation. In this model Ctcf occupancy is retained at the PU.1 promoter. To conclude, using several AML models, we found that Smarca5 occupancy on DNA depends reflects its methylation status at PU.1 gene and that Smarca5 may be needed to prevent DNA demethylation at ICR and for interactions with Ctcf on DNA.
Grants: P305/12/1033, P301/12/P380, GAUK 251070 45410, GAUK 534212. UNCE 204021, PRVOUK-P24/LF1/3, SVV-2012-264507, FR-TI2/509.

MNOHOČETNÝ MYELOM

2166.

Thalidomid v léčbě mnohočetného myelomu po 10 letech – může nás ještě překvapit?

Minařík Jiří, Jarkovský Jiří, Sandecká Viera, Maisnar Vladimír, Gregora Evžen, Špička Ivan, Starostka David, Plonková Hana, Walterová Lenka, Wróbel Marek, Vonke Ivan, Adamová Dagmar, Kessler Petr, Obernauerová Jarmila, Pika Tomáš, Zahradová Lenka, Radocha Jakub, Pavlíček Petr, Straub Jan, Mikula Peter, Gumulec Jaromír, Heinzová Vladimíra, Bačovský Jaroslav, Pour Luděk, Machálková Kateřina, Novosadová Libuše, Hájek Roman, Ščudla Vlastimil *(III. interní klinika - NRE, FN, Olomouc; IBA, LF Masarykovy univerzity, Brno; IHOK, FN, Brno; FN, II. Interní klinika - oddělení klinické hematologie, Hradec Králové; OKH, FNKV, Praha; I. interní klinika - klinika hematologie, VFN, Praha; Oddělení klinické hematologie Nemocnice s Poliklinikou, Havířov; Ústav klinické hematologie, FN, Ostrava; Oddělení klinické hematologie, Krajská nemocnice, Liberec; Hematologické oddělení, Nemocnice, Nový Jičín; Oddělení klinické hematologie, Nemocnice, České Budějovice; Hematologicko-transfúzní oddělení, Slezská nemocnice, Opava; Oddělení hematologie a transfuziologie, Nemocnice, Pelhřimov; Hematologicko-transfúzní oddělení, Okresní nemocnice, Mladá Boleslav)*

Thalidomid patří k nejkontroverznějším lékům 20. a 21. století. Jeho zavedení do léčby ranních nevolností těhotných žen v 50. letech 20. století vedlo k snad nejsmutnější kapitole medicínské historie s důsledky na životy desetitisíců dětí. Na druhou stranu, především díky thalidomidu byla v lékové politice zavedena mnohem přísnější opatření, vedoucí k přísné ochraně subjektů všech klinických zkoušení. Po zákazu léčiva byla na dlouhou dobu zastavena jakákoli hodnocení a pouze nesmělé pokusy s podáváním thalidomidu u nemocných s erythema nodosum leprosum v 70. letech 20. století naznačovaly možný další směr jeho použití. Za skutečné „znovuzrození" thalidomidu lze označit rok 1997, kdy byl thalidomid poprvé úspěšně použit u nemocných s mnohočetným myelomem. Záhy byla jeho neočekávaně vysoká účinnost potvrzena v řadě randomizovaných studií a thalidomid změnil zásadně prognózu jedinců s mnohočetným myelomem, jako první lék s takto převratným účinkem po takřka 40 letech. Velmi brzy se dostal prakticky do všech linií léčby – jak do indukční terapie včetně přípravy ke sběru periferních kmenových buněk, tak do léčby progresívního/relabujícího onemocnění, své místo našel též v léčbě konsolidační/udržovací léčbě a také v pozdní refrakterní fázi onemocnění. V České republice byl poprvé představen v roce 2000, kdy bylo několik málo nemocných léčeno tabletami darovanými firmou Grünenthal. Od roku 2004 byl podáván v rámci Specifického léčebného programu a od roku 2007 je plně hrazen i v primoléčbě myelomu. Současně je ale v posledních letech z léčby myelomu postupně vytlačován řadou nových účinnějších biologických působků. Náplní sdělení je přehled zkušeností s thalidomidem včetně méně známých skutečností spjatých s tímto léčivem, zhodnocení jeho dopadu na léčbu v různých fázích mnohočetného myelomu, a též posouzení jeho současné role v éře novějších a účinnějších léků.

2185.

Význam stanovení FLC u monoklonálních gamapatií. Výsledky grantu IGA NS 10387-3/2009

Maisnar Vladimír, Radocha Jakub, Tichý Miloš, Zahradová Lenka, Vávrová Jaroslava, Čermáková Zdeňka, Holečková Magdalena, Dastych Milan, Hájek Roman *(II. interní klinika - OKH, LF UK a FNa ÚKBD, FN, Hradec Králové; IHOKa ÚKBD, FN, Brno)*

Grantový projekt byl zaměřen na analýzu možného využití stanovení volných lehkých řetězců (FLC) v séru jako nového markeru k posouzení aktivity monoklonálních gamapatií. Již dlouhou dobu zaměřujeme své úsilí na standardizaci základních diagnostických metod mnohočetného myelomu. Stanovení FLC není levným testem, proto vznikla potřeba vyhodnocení jeho spolehlivosti a přínosu udávaných výrobcem. Cíle tohoto projektu byly formulovány na základě potenciálně nejvhodnějších indikací pro využití stanovení FLC v klinické praxi. V první řadě bylo nutné standardizovat metodu stanovení FLC, poté byl vyhodnocen její přínos pro stanovení prognózy pacientů s MGUS a dále pro sledování aktivity onemocnění u pacientů s mnohočetným myelomem. Pro analýzu séra jsme používali standardní metodu FreeLiteTM (The Binding Site, UK) společně s novou ELISA metodou (BioVendor, CR). Spolupracovali jsme s registrem monoklonálních gamapatií (dnes již přes 4000 pacientů s MG). Potvrdili jsme platnost stratifikačního modelu MGUS Mayo Clinic. Současně s tím jsme identifikovali další potenciálně vhodné znaky, které plánujeme ověřit v rámci dalších analýz a případně je využít při přípra-

vě podrobnějšího stratifikačního modelu. Pro většinu pacientů (s vyjímkou pacientů s oligosekrečním myelomem) nepřináší stanovení FLC v séru podle výsledků našeho sledování žádnou výhodu oproti standardnímu stanovení koncentrace M-Ig při monitorování aktivity onemocnění. Normalizace poměru FLC v kompletní remisi nebyla spjata se signifikantně delší dobou do progrese, ačkoli byl pozorován trend k jejímu zlepšení. K potvrzení významu stanovení FLC v této indikaci bude potřeba rozšířit sledovaný soubor nemocných a stanovení FLC doplnit o nově zaváděnou 8-barevnou imunofenotypizaci vzorků kostní dřeně za účelem stanovení minimální reziduální choroby.

2223.

Translokace t(14;16): frekvence a význam u nemocných s mnohočetným myelomem

Mičková Pavla, Balcárková Jana, Pika Tomáš, Holzerová Milena, Nedomová Radka, Hanzlíková Jana, Prekopová Ivana, Kropáčková Jitka, Ščudla Vlastimil, Indrák Karel, Jarošová Marie *(HOK; III. interní klinika - NRE, LF UP a FN, Olomouc)*

Translokace t(14;16) patří společně s translokacemi t(4;14), t(14;20) a delecí genu TP53 k vysoce rizikovým cytogenetickým změnám u nemocných s mnohočetným myelomem (MM). Translokace t(14;16) s následnou zvýšenou expresí protoonkogenu C-MAF a deregulací genu WWOX/FOR bývá provázena agresivním průběhem onemocnění, sníženou citlivostí nebo rezistencí na chemoterapii a časnou progresí/relapsem onemocnění. Z důvodu velmi nízké incidence t(14;16) u nemocných s MM (2-10%) není její význam dodnes zcela objasněn, o čemž svědčí i výsledky nedávných studií vyvracejících statut translokace t(14;16) jako nezávislého prognostického faktoru pro nemocné s MM. Cílem práce bylo určení frekvence výskytu translokace t(14;16), vyhodnocení cytogenetických, molekulárně-cytogenetických a klinických dat v souboru nemocných s MM nebo monoklonální gamapatií nejasného významu (MGUS) diagnostikovaných a léčených na III. interní klinice a cytogeneticky vyšetřených na Hemato-onkologické klinice FN v Olomouci v letech 2000-2012. Translokace t(14;16) byla prokázána u 9 (2,9%) z celkového počtu 302 nemocných vyšetřených pro přestavbu genu IgH. Soubor 9 nemocných tvořilo 5 mužů a 4 ženy s mediánem věku 64 let. Nejčastěji nalezenými přídatnými změnami byla delece genu RB1 (7 nemocných) a trisomie nebo tetrasomie chromosomu 15 (6 nemocných). Ze 7 nemocných, u nichž byl kombinací metod konvenční cytogenetiky a FICTION prokázán komplexní karyotyp, byla u 1 nemocné využita metoda CGH, v případě jiného nemocného pak metody mFISH a arrayCGH. Jediným isotypem monoklonálního imunoglobulinu detekovaného v krevním séru nemocných byl isotyp IgG, u dvou nemocných byla prokázána Bence-Jonesova bílkovina. Poměr sekrece lehkého řetězce kappa:lambda byl 4:5. Klinické stádium I dle stratifikačního systému Durie-Salmon bylo zjištěno u 2 nemocných, stádium II a III u 2 resp. 5 nemocných, přičemž u 3 nemocných byla zastižena významná renální nedostatečnost. Iniciální leukemizace byla zachycena u 3 nemocných. Cytogenetické a molekulárně cytogenetické výsledky souboru nemocných s MM ukazují, že prognosticky nepříznivá translokace t(14;16) se v našem hodnoceném souboru pohybuje na dolní hranici frekvence výskytu. U žádného nemocného se nejednalo o samostatnou aberaci, ale u 7 z 9 nemocných byla součástí komplexních změn, spojených s nepříznivou prognózou. Pro přesné určení prognózy je nutné vyhodnocení většího soubor nemocných. Práce je podporována studentským grantem Univerzity Palackého LF-2012-007

2176.

Identifikace prognostických faktorů transformace v nádorové onemocnění u osob s MGUS sledovaných v České republice

Sandecká Viera, Radocha Jakub, Klincová Mária, Pika Tomáš, Gregora Evžen, Špička Ivan, Kessler Petr, Walterová Lenka, Gumulec Jaromír, Starostka David, Adamová Dagmar, Wróbel Marek, Vonke Ivan, Říhová Lucie, Penka Miroslav, Zahradová Lenka, Maisnar Vladimir, Pavlíček Petr, Ščudla Vlastimil, Straub Jan, Hájek Roman *(IHOK, FN, Brno; II. Interní klinika - OKH, FN,Hradec Králové; OKH, LEHABI, FN, Brno; OKH, FNKV, Praha; I. Interní klinika 1. LF UK, Praha; III. Interní klinika, FN, Olomouc; Odd. hematologie a transfuziologie, Nemocnice, Pelhřimov,p.o.; OKH, Krajská nemocnice Liberec a.s.; Ústav klinické hematologie, FN, Ostrava; OKH, NsP Havířov; Hematologicko-transfuzní oddělení při Slezké nemocnici, Opava; Onkologické centrum J.G. Mendela, Nový Jičín; OKH, České Budějovice; OKH, FN Brno; I. Interní klinika VFN Praha; IHOK, FN Brnoopakují se pro CMG)*

Úvod:Monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS) je potencionálně maligní stav, spojený s jistou mírou pravděpodobnosti transformace v některou ze zhoubných forem monoklonálních gamapatií

(MG). Cíl: Cílem práce bylo ověření platnosti již známých rizikových faktorů rozdělující benigní a maligní MGUS. Soubor: Data byla použitá z Registru monoklonálních gamapatií (RMG). V době od 5/2007 do 11/2011 bylo v ČR do RMG zařazeno 1448 osob, analyzováno bylo 99,3% (1439/1448) osob. Medián doby sledování od stanovení diagnózy byl 5 let (rozpětí 1,0- 18,0). Výsledky:Z celkově 1439 sledovaných osob s MGUS došlo k transformaci do nádoru v 7,1% (96/1356) případech; 75% (72/96) mnohočetných myelomů; 10,4% (10/96) Waldenströmových makroglobulinémií; 5,2% (5/96) maligních lymfomů; 2,1% (2/96) primárních amyloidóz; 7,3% (7/96) jiných typů nádorů. Faktory spojené s významně vyšším rizikem transformace byly následující: koncentrace M-Ig v séru > 15 g/l (25,8% vs. 4,48%; p< 0.001), infiltrace kostní dřeně plazmocyty > 5% (22,3% vs. 5,4%; p< 0.001), patologické hodnoty indexu κ/λ v séru < 0,26 nebo > 1,65 (75,6% vs. 42,7%; p< 0.001), vstupní hodnota laktátdehydrogenázy > 3,75 ukat/l, (7,82% vs. 4,62%; p= 0.016) a vstupní hodnota hemoglobinu < 120 g/l (7,82% vs. 4,62%; p= 0.007). Izotop Ig (non IgG vs. IgG) nebyl v našem analyzovaném souboru sledovaných osob s MGUS významným rizikovým faktorem transformace nádorového onemocnění (32,6% vs. 29,5%; p= 0.523). Při použití Cox modelu patřila high-risk soubgroup (přítomnost všech třech abnormálních rizikových faktorů) ke skupině s relativním rizikem (Hazard Ratio; HR) téměř 18x zvýšeným oproti normě (17.54; CI (5.78; 53.22); p<0,001). Vysoké HR (4,18; CI(2.59; 6.74); p<0,001) měl i počet plazmatických buněk nad 5%, hodnota MIg nad 15g/l (HR 3,64; CI(2.39; 5.54); p<0,0010) a patologický index κ/λ měl HR 2,9 (2.90 (1.47; 5.75); p=0,002). Závěr: Výsledky studie potvrzují, kromě podtypu Ig, platnost již známých rizikových faktorů predikce transformace MGUS do nádorového onemocnění. V současnosti nyní můžeme dobře definovat skupinu s nejnižším rizikem a ročním rizikem transformace v nádorové onemocnění pod 1%. Naše data představují ve stávající podobě jeden z největších souborů MGUS analyzovaných ve světě, jeho limitací je stále krátký medián doby sledování. Další optimalizace modelu stratifikace je tedy nezbytná. Vytvořeno s podporou grantů: MSM0021622434 and GAP304/10/1395.

2179.

Využití průtokové cytometrie v predikci transformace MGUS do mnohočetného myelomu

Říhová Lucie, Varmužová Tamara, Suská Renata, Zarbochová Pavla, Sandecká Viera, Klincová Mária, Mikulášová Aneta, Penka Miroslav, Hájek Roman *(OKH, FN; Babákova myelomová skupina, Ústav patologické fyziologie, LF MU a Interní hematoonkologická klinika, FN, Brno)*

Východiska: Monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS) je potenciálně maligní stav s možnou transformací do mnohočetného myelomu (MM) či jiné lymfoproliferace. Na základě tradičních prognostických parametrů může být transformace, v období do 3 od stanovení diagnózy, předvídána jen omezeně. MGUS je charakterizován přítomností normálních i klonálních plazmocytů (PC). Ztráta normálních CD19+ PC odpovídá transformaci, nicméně k predikci by mohlo být využito také jiných povrchových znaků. Cíl: Analýza fenotypu pomocí průtokové cytometrie a jeho korelace se standardními prognostickými faktory za účelem stanovení možnosti predikce transformace MGUS do MM. Metody: Analýza proběhla u 155 osob s MGUS v období stanovení diagnózy. Pomocí průtokové cytometrie (FC500 Cytomics, Beckman Coulter) byly v kostní dřeni analyzovány B lymfocyty a PC. Na PC byla studována exprese CD19, CD56, CD20, CD27, CD28 a CD117. Imunofenotyp pak byl porovnán s hodnotami standardních prognostických faktorů. Výsledky: Transformace MGUS do MM byla potvrzena u 9 osob. U těch bylo také, při porovnání s netransformovanými MGUS, zjištěno snížené zastoupení B lymfocytů [7,0% (0,0-23,7) vs. 13,3% (1,2-68,4); p<0,02], zvýšený počet PC [1,0% (0,2-8,8) vs. 0,4% (0,0-4,2); p<0,01] a snížený počet normálních CD19+ PC [3,8% (0,9-33,4) vs. 25,9% (0,2-87,2); p<0,002]. U MGUS s transformací bylo také zjištěno snížení exprese CD27 a zvýšení exprese CD56 na PC, ovšem nejednalo se o statisticky významné rozdíly. U naprosté většiny případů s nálezem CD28+ PC [93.5% (29/32) MGUS] se vyskytoval monoklonální immunoglobulin (MIG) izotypu IgG. Vyšší koncentrace MIG (>15g/l) byly nalezeny nejčastěji u osob s CD19+ PC ≤5% (p=0,001), abnormální FLC poměr byl zjištěn již u osob s CD19+ PC <20% (p=0,017). Osoby s CD19+ PC ≤5% častěji spadaly do vysoce-středně rizikové skupiny, zatímco osoby s CD19+ PC >5% byly častěji zařazeny do nízce-středně rizikové skupiny (p=0,009) dle Rajkumara et al. (2005). Bylo zjištěno, že parametr "CD19+ PC ≤5%" se v predikci progrese MGUS do MM uplatňuje s citlivostí 55,6% a specificitou 91,2% (p=0,019). Závěr: Vyšetření pomocí průtokové cytometrie má u osob s MGUS výpovědní hodnotu stran predikce progrese do MM. Parametrem s nejvyšším uplatněním je zastoupení CD19+ PC. Snížení relativního počtu CD19+ PC pod 5% (v rámci všech PC) může účinně predikovat transformaci, což je v souladu s již dříve publikovanými výsledky. Podpořeno projekty MSM0021622434, IGA NT12425 a GAČR P304/10/1395.

LABORANTSKÁ SEKCE 1

2154.
Myelopfoliferativní onemocnění – morfologická diagnóza?
Novotová Elena, Mikulenková Dana *(Morfologicko-cytochemická laboratoř, ÚHKT, Praha)*

Myeloproliferativní onemocnění (MPO) tvoří dle WHO klasifikace „Tumorů hematopoetické a lymfoidní tkáně" z r. 2008 samostatnou skupinu onemocnění, jejichž společným podkladem je mutace na úrovni pluripotentní kmenové buňky, která vede ke klonální hematopoeze. Dochází k proliferaci jedné nebo více myeloidních řad v kostní dřeni, což vede ke změnám v krevním obraze (KO). Klinický průběh onemocnění bývá většinou chronický. Některé podtypy onemocnění z této skupiny ale mohou již vstupně mít agresivnější průběh (akcelerovaná fáze či blastický zvrat). MPO tvoří 8 nosologických jednotek, které se dle molekulární podkladu dělí do dvou skupin, a to na bcr/abl pozitivní chronickou myeloidní leukemii (CML) a na bcr/abl negativní: pravou polycytémii (PV), esenciální trombocytémii (ET), primární myelofibrózu (PMF), chronickou neutrofilní leukemii (CNL), chronickou eozinofilní leukemii, jinak nekategorizovanou (CEL) – míněno bez molekulárního podkladu, mastocytózu (kožní a systémová forma, SM) a myeloproliferativní onemocnění, které nelze zařadit do jiné výše uvedené skupiny, takže je neklasifikované (MPD, U). První projevy uvedených nemocí jsou laboratorně detekovatelné v hodnotách KO, kde je patrná leukocytóza s posunem doleva, či polyglobulie, či trombocytóze, nebo kombinace těchto – cytóz. Klinicky je u některých onemocnění patrná (hepato)splenomegalie. Aspirát kostní dřeně (KD) dle typu MPO může být různě celulární. U CML je typicky hypercelulární s převahou vyzrávající granulopoezy a megakaryocytů, u chronické formy PMF v pozdějších stádiích bývá nejčastěji „suchá punkce" (jaderných buněk v nátěru aspirátu kostní dřeně je minimum). Morfologie jednotlivých vývojových řad je u jednotlivých podtypů onemocnění typická (např. atypické megakaryocyty u ET). U SM nacházíme atypické mastocyty. Pro konečnou diagnózu je však zásadní histopatologické vyšetření, které zhodnotí buněčnost kostní dřeně, nepoměr mezi jednotlivými řadami, morfologii megakaryocytů a přítomnost retikulárních/kolagenních vláken. Ke správné diagnostice MPO patří molekulárně-genetické vyšetření prokazující klonální původ nemoci (bcr/abl pro dg. CML, JAK2 mutace u PV, CIMF a ET, mutace c-KIT u SM). V naší laboratorní praxi je diagnostika MPO založena na zhodnocení nátěru periferní krve v kontextu s hodnotami krevního obrazu, na morfologické analýze nátěru KD. Cytologická diagnóza MPO je u některých případů jasná, někdy je diagnostický výstup z naší laboratoře pouze orientační.

2135.
Trombocytopenie - morfologicky zajímavá kazuistika
Konečná Věra, Lapčíková Anna, Grycová Petra, Pospíšilová Dagmar, Kadlecová Jana *(HOK; Dětská klinika, FN, Olomouc)*

V našem sdělení vás seznámíme se zajímavým nálezem u pacienta, který byl odeslán do hematologické poradny pro výraznou trombocytopenii. Při využití optické metody stanovení počtu trombocytů jsme pozorovali abnormní distribuční křivku krevních destiček a naměřená hodnota byla výrazně vyšší než při stanovení počtu trombocytů metodou impedanční. Následnou kontrolu získaných údajů i hodnocení morfologie trombocytů jsme provedli v obarveném nátěru. Nejčastějším nálezem v těchto případech jsou drobné i větší shluky trombocytů, které mohou i výrazně ovlivnit naměřené hodnoty. U tohoto pacienta jsme pozorovali nápadnou anizocytózu trombocytů. Kromě četných makrotrombocytů jsme popsali i Döhleho inkluze v neutrofilních elementech. Na základě morfologického nálezu byl pacient dále vyšetřován a byla stanovena diagnóza anomálie May–Hegglin.

2136.
Kontroly kvality u cytochemických hematologických vyšetření
Antošová Libuše, Antošová Monika, Trnavská Irena, Tůzová Eva, Bourková Ludmila, Penka Miroslav *(OKH, FN, Brno)*

Cytochemickými metodami prokazujeme v buňkách některé substance nebo enzymy pomocí mikroskopicky hodnotitelných barevných reakcí. Tato vyšetření nám umožňují přesněji zařazovat buňky do vývojových řad, pokud máme při běžném panoptickém barvení určité pochybnosti. Tato vyšetření

nám pomáhají především při klasifikaci leukémií a myelodysplastických syndromů. Nejčastěji používaná cytochemická barvení na našem pracovišti jsou průkaz myeloperoxidázy, nespecifických i specifických esteráz, kyselé fosfatázy, polysacharidů (PAS reakce) a železa. U každého cytochemického vyšetření pacienta je nutné barvit i kontrolní pozitivní nátěr. Výběr kontrol a jejich uchovávání má svá specifická pravidla pro každý jednotlivý typ vyšetření.

2193.
Kontrolní činnost v laboratořích TO FNOL
Vodičková Marta, Hauerová Marcela, Žáková Alexandra, Galuszková Dana *(Transfuzní oddělení, FN, Olomouc)*

Úvod: Kontrolní činnost v laboratořích Transfuzního oddělení (TO) zahrnuje řadu postupů a procesů, které mají jednak zajistit kvalitní výrobu transfuzních přípravků a dále garantovat bezchybný laboratorní výsledek. Metodika: Cílem sdělení je představit kontrolní činnost v laboratořích TO FNOL. Hodnocení: V laboratořích TO jsou realizovány kontroly diagnostik při příjmu a jejich denní kontroly, které mají za cíl ověřit kvalitu diagnostik. K ověření postupů slouží verifikace jednotlivých metod vyšetření (úvodní a periodické). Každá laboratoř absolvuje v průběhu roku řadu interních auditů, navíc 1x ročně kontrolní certifikační audit ISO 9001 (Det Norske Veritas), 1x za 2 roky audity Státního Ústavu pro kontrolu léčiv (SÚKL) a zpracovatelských firem (Baxter, Grifols, Octapharma). Na základě doporučení z těchto auditů se realizovala řada změn, např. v oblasti skladování vzorků, metrologie a validace přístrojů. Od roku 1995 se naše laboratoře (Hematologická laboratoř, Laboratoř infekčních markerů a Imunohematologické laboratoře) pravidelně účastní cyklů Systému externí kontroly kvality (SEKK). Naše úspěšnost v SEKK v posledních 3 letech byla 100% , i přesto jsme na základě SEKK provedli určité změny zejména zavedení citlivější metodiky při typování antierytrocytárních antigenů, změny v titraci antierytrocytárních protilátek , přenastavení hodnot trombocytů v hematologické laboratoři. Závěr: Naše oddělení si uvědomuje důležitost laboratorních výsledků nejen pro bezpečnost transfuzních přípravků, ale i pro kvalitní léčbu pacientů. Kontrolní činnost nám pomáhá naši práci neustále zlepšovat. Cílem našeho oddělení je i úspěšná akreditace dle normy 15 189 v tomto roce.

2201.
Metrologie - příprava laboratorní techniky k analýze
Hrubá Petra, Špiříková Ivana *(OKH, FN u sv. Anny, Brno; FN, Bohunice, Brno)*

5TH SYMPOSIUM ON ADVANCES IN MOLECULAR HEMATOLOGY 2

2204.

Rearrangement of NOTCH1 or BCL3 can independently trigger progression of CLL

Wlodarska Iwona, De Keersmaecker Kim, Michaux Lucienne, Bosly André, Graux Carlos, Ferreiro Julio Finalet, Vandenberghe Peter, Cools Jan *(Center for Human Genetics, K U Leuven - BEL; Mont--Godinne University Hospital, Yvoir - BEL)*

Recent data indicate that NOTCH1 mutations significantly increase the risk of CLL progression towards Richter syndrome (RS) and chemoresistance, and that activation of NOTCH1 at time of CLL diagnosis is an independent prognostic factor of poor survival. We report here a case of CLL with a novel rearrangement of NOTCH1 identified at the time of RS. The patient was diagnosed with CLL (unmutated VH) in RS in June 2003. Cytogenetic analysis detected two related clones: one with an isolated +12 and a second with +12 and dic(9;14)(q34;q32). FISH and qRT-PCR analysis showed that dic(9;14) resulted in the novel IGH-NOTCH1 rearrangement associated with upregulation of NOTCH1 mRNA. Western blotting with Val1744 antibody detected an activated intracellular NOTCH1, and sequence analysis identified a two basepair deletion, ΔCT7544-7545/P2515fs, in the nucleotide sequence encoding the PEST domain of NOTCH1. The patient was treated and achieved complete remission. In 2007, however, CLL relapsed and an examination of BM identified a clone with a sole +12 negative for ΔCT7544-7545/P2515fs. Two years later, CLL progressed and BM revealed an evolved clone with complex aberrations including +12 and t(14;19)(q32;q13)/IGH-BCL3 but lacking dic(9;14)(q34;q32). Of note, BM was again positive for ΔCT7544-7545/P2515fs. Despite treatment, two clones harboring +12, one with t(14;19) and a second with new additional karyotypic changes were seen in the analyzed BM (06/2011) positive for ΔCT7544-7545/P2515fs. Four months later, the patient developed peripheral T cell lymphoma and died. Altogether, the present case allows to deduce the sequence of multiple genetic defects driving development and progression of CLL. We presume that an initial clone with +12 later acquired an activating mutation of NOTCH1. Subsequent acquisition of dic(9;14)/IGH-NOTCH1 triggered Richter transformation. After a few years, a persistent chemorefractory NOTCH1-mutated clone underwent another hit, t(14;19)/IGH-BCL3, which initiated the second progression that was followed by a fatal CLL-unrelated T-cell lymphoma. Our findings confirm the risk of activating mutations of NOTCH1 in Richter transformation of CLL and highlight that a residual chemotherapy-resistant NOTCH1-mutated clone is at risk of acquiring further progression-associated hits. Besides the known t(14;19)(q32;q13)/IGH-BCL3, we also identified dic(9;14)(q34;q32)/IGH-NOTCH1 as a novel genomic aberration capable of triggering RS.

2188.

Upregulation of homedomain genes DLX1/2 by FLT3 affects TGFβ; signaling

Starková Júlia, Gadgil Sharvari, Kornblau Steven M., Heřmanová Ivana, Slámová Martina, Rejlová Kateřina, Trka Jan, Drabkin Harry A. *(CLIP, Department of Paediatric Haematology and Oncology Charles University, 2nd School of Medicine, Prague, - CZE; Division of Medical Oncology, University of Colorado Health Sciences Center, Aurora, CO - USA; Department of Stem Cell Transplantation and Cellular Therapy, Section of Molecular Hematology and Therapy, The University of Texas M.D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas - USA; Division of Hematology-Oncology, Medical University of South Carolina, Charleston, SC - USA)*

Purpose Previous work of our group demonstrated that high expression of homeodomain genes correlated with higher levels of FLT3 kinase and FLT3 mutations in patients with acute myeloid leukemia. We investigated whether inhibition of FLT3 affects the expression of homeodomain genes and whether this would have functional consequences. Experimental Design qRT-PCR and Western blots were used to examine the effects of FLT3 inhibition or stimulation in MV4;11 cells with FLT3/ITD mutation, RS4;11 cells with wild-type FLT3, and patient AML blast cells. In addition, RNA interference and MTS growth assays were used to study the effects of PKC412, a FLT3 inhibitor, on DLX1 expression and TGFβ1 signaling. Results Treatment with PKC412 led to a specific inhibition of DLX1 and DLX2 expression in both MV4;11 cells and patient AML blasts. Conversely, activation

of FLT3 by its ligand in RS4;11 cells upregulated DLX1/2 levels. The relationship between FLT3 mutation and DLX1 protein levels was confirmed by reverse phase protein arrays containing samples from 469 AML patients. DLX1 has been reported to inhibit TGFβ signaling. We observed that either FLT3 inhibition or DLX1 silencing induced TGFβ target genes, and that combining threshold levels of TGFβ1 and PKC412 had a greater effect on growth inhibition than either agent alone. Mechanistically, upregulation of DLX1 was dependent on MAPK signaling. In addition, PKC412 treatment was associated with higher levels of nuclear phospho-Smad2. Conclusions To our knowledge, this represents the first report of a functional link between FLT3 signaling and DLX1/2 expression, which has the potential to affect TGFb responses.

2184.

Transdifferentiation of B cell precursor leukemic blasts into monocytoid cells during early phase of the therapy is more frequent than expected

Mejstříková Ester, Slámová Lucie, Starková Julia, Froňková Eva, Bourquin Jean-Pierre, Bornhauser Beat, Řezníčková Leona, Dworzak Michael, Fišer Karel, Zuna Jan, Starý Jan, Trka Jan, Hrušák Ondřej *(CLIP- Department of Paediatric Haematology and Oncology Charles University, 2nd School of Medicine, Prague - CZE; division of Pediatric Oncology, University Children's hospital, Zurich - CHE; St. Anna Children's Hospital Children's Cancer Research Institute (CCRI), Vienna - AUT)*

Hematopoiesis is a complex process, in which immature precursors differentiate into diverse forms of mature blood cells. B cell and monocytic development physiologically seems to take place separately from already committed progenitor. Recently we have identified novel subtype of BCP ALL characterized by early trans-differentiation into cells with monocytoid immunophenotype during the first weeks of the therapy. Incidence is 3–4% out of BCP ALL in childhood and phenomenon was confirmed in two nation wide reference labs in Austria and Switzerland. Blasts exhibit continuous loss of B cell markers (i.e. CD19) or progenitor markers (i.e. CD34) and increase of monocytic markers (i.e. CD14, CD4, CD33, CD64). No common genetic abnormality was so far recognized; higher incidence of alteration in IKZF-1 gene was found. Identical clonal rearrangements (Ig-TCR) are found in BCP and monocytoid blasts indicating common origin. So far 17 patients were identified with this phenomenon, all patients expressed on at least subpopulation of blasts CD2 antigen (LFA-2, LFA-3 receptor). Typically slower response to initial therapy measured by Ig-TCR clonal rearrangements is present. Significant discordancy between minimal residual disease estimated by flow cytometry and Ig-TCR rearrangements is observed, because blasts finally are, according our knowledge, undistinguishable immunophenotypically from normal mature monocytes. Trans-differentiation can be recapitulated in vitro under the co-cultivation with corticosteroids. Engraftment of the diagnostic blasts with identified switching phenomenon into NOD/SCID mice (IL-2 receptor gamma chain deficient strain) was noticeably poorer compared to other BCP ALL cases. Only two out of seven cases successfully engrafted with the similar published incidence to AML cases. Poorer engraftment indicates that support from microenvironment is not sufficient for maintaining and growth of this subtype leukemia in this xenograft model. Conclusion. Newly identified subtype of BCP ALL in which blasts trans-differentiate early during the therapy denotes closer relation of B cell and monocytic lineage than previously expected.

Supported by GAČR P301/10/1877, Sciex 09.043, GAUK 15710, COST Ped-AMLMDS, UNCE 204012.

2219.

Epstein-Barr virus and lymphomagenesis

Flodr Patrik, Tichý Martin, Murray Paul *(ÚKMP LF UP a FN, Olomouc - CZE; CRUK Institute for Cancer Studies, School of Medicine, University of Birmingham - UK)*

Introduction: The role of EBV in lymphomagenesis is crucial. During EBV infection linear virus genome become circular and persists as an episome. Viral genome can express proteins of lytic or latent cycle. In latent cycle limited set of genes are expressed EBNAs, LMPs. Viral (onco)genes and RNA is under epigenetic control due to DNA methylation, acetylation and histone modifications. The switch from latent to lytic phase depends on activation of EBV immediate-early genes BZLF1, BRLF1. Latent EBV infection bears immunogenic tendency shift from type 0 to type III and differ

in protein expression – EBER, EBNA-1, 2, 3, LMP1,2, BARTs. Type III plays direct role in EBV oncogenesis (PTLD, HIV ass. lymphomas), high-level expression of all immunodominant latency proteins is detected. Type I, II plays cofactor´s role in EBV oncogenesis and is usually dected in immunocompetent individuals (BL, cHL, primary effusion DLBCL, AILT, ENK/T-cell lymphoma nasal type, Enteropathy-type T-cell lymphoma). Material and Methods: Lymphoblastic cell lines (GC-B--cells, cHL, BL), cHL, GC-B cells, magnetic separation , laser captured microdissection, Q-RT--PCR analysis, immunohistochemistry, immunoblotting, pyrosequencing, methylation-specific PCR. Results: In HL the virus genome express type II of latency virus proteins - EBNA1, LMP1, LMP2. LMP1 is transforming protein, acts as protooncogene, as constitutively activated member of TNFR superfamily mimic CD40 and upregulates expression of CD23, CD40, BCL2 and NfkappaB. LMP2 blocks tyrosin kinase phosphorylation and prevents reactivation of EBV. EBNA-1 maintains EBV genome as episome. Global methylation arrays using DNA from lymphoblastic cell lines generated from B cells revealed a significant change in the methylation status of genes post EBV infection and large proportion of genes were hypomethylated. Conclusions: EBV uses methylation process for regulation of some of its own gene promoters. In cancer gene-specific hypomethylation can result in the expression of genes that are usually silenced. We show that deregulated expression of particular proteins in EBV transformed cells could be important for EBV-driven lymphomagenesis and also for challenge in new therapeutic approach -infusion autologous EBV-specific T-lymphocytes, induction of viral replication with nucleoside analogue, proteasome inhibitor bortezomib and Bcl-2 inhibitor (HA14-4). Acknowledgements: MSM 6198959205, IGA NT11103 and Leukemia and Lymphoma Research Fund.

2181.

Next generation sequencing in study of epigenome of new subtype of BCP-ALL

Fišer Karel, Starková Júlia, Slámová Lucie, Řezníčková Leona, Froňková Eva, Hrušák Ondřej, Figueroa Maria E., Trka Jan, Mejstříková Ester *(CLIP, Department of Paediatric Haematology and Oncology Charles University, 2nd School of Medicine, Prague - CZE; Dept of Pathology, University of Michigan - USA)*

A newly described subset of B cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL) termed switching ALL (swALL) is characterised by a pronounced increase of cells with monocytic phenotype during first month of treatment. To study possible molecular mechanisms allowing for monocytic switch in these leukemias, we compared whole genome DNA methylation status of swALL (n=4) and control BCP-ALL (n=3) samples. We used Enhanced Reduced Representation Bisulfite Sequencing (eRRBS) method combining bisulfite conversion and next generation sequencing (NGS). Bisulfite converted genome representation samples were sequenced on HiSeq 2000 (Illumina) instrument. While in principal classical Sanger-like sequencing, the massively parallel sequencing allowed for approximately 10e8 short reads per each sample. Analysis of such large data is considerable challenge. First we performed adapter trimming, alignment, methylation call and CpG annotation (FAR/cutadapt, bismark, bowtie, R). As a next step we detected 37769 CpG loci with methylation significantly different (bisulfite conversion >99.5%, base call accuracy >99%, CpG coverage >10x, difference >25, p-value 0.01) between swALL and control ALL samples. Genes in proximity to those CpGs include CEBPA unmethylated in swALL and BCR, CEBPE, SHH, CBFA2T3, GATA4 and CMTM2 unmethylated in control ALL. Next generation sequencing proved to be powerful tool for screening DNA methylation status across whole genome. While still at the beginning of thorough full analysis of NGS data we already found meaningful differences between control ALL and newly described swALL.

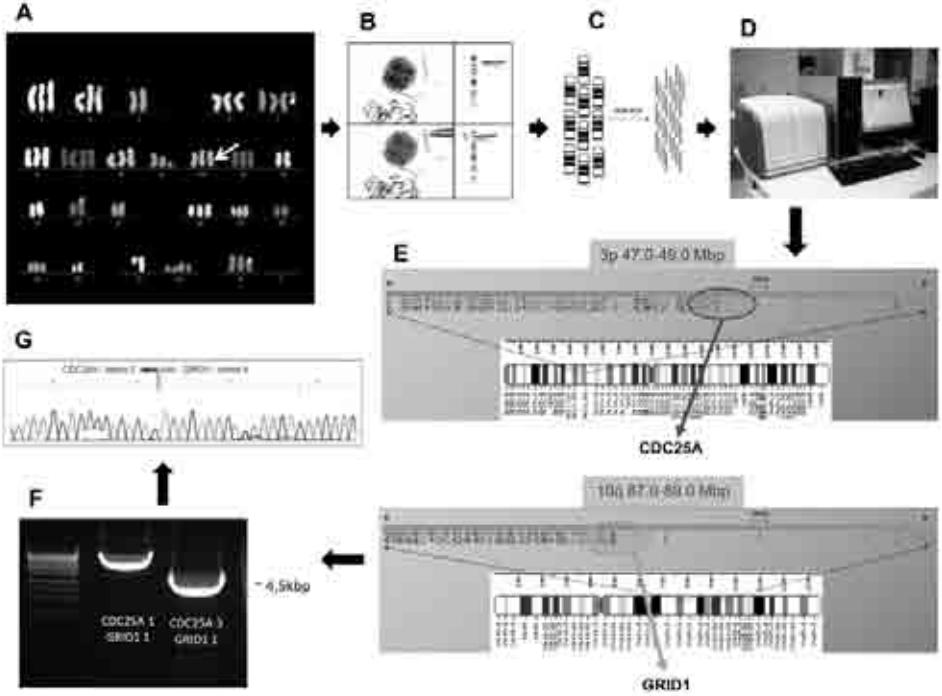
This work was supported by grant GACR P301/10/1877.

2120.

From cytogenetics to molecular biology: mapping of unique chromosomal abnormalities at the nucleotide level

Jancuskova Tereza, Plachy Radek, Hardekopf David W., Liehr Thomas, Weise Anja, Kosyakova Nadezda, Stika Jiri, Zejskova Lenka, Sedlackova Lucie, Krutilkova Lucie, Cmejla Radek, Pekova Sona *(Laboratory of Molecular Diagnostics, Chambon, Prague – CZE; Jena University Hospital, Institute of Human Genetics, Jena - DEU)*

Background: Acute myeloid leukemias (AML) in adulthood represent a heterogeneous entity, characterized by a recurrent chromosomal/genetic abnormality in only 50% of cases. As many AML patients are eligible for curative treatment, techniques allowing identification of unique molecular targets for specific and sensitive minimal residual disease (MRD) monitoring are highly needed. Aims: To develop a technique that would allow mapping of cytogenetically identified unique clone-specific abnormalities from the chromosome level to the nucleotide level, enabling us to develop clone-specific quantitative Real-Time PCR assays for sensitive and specific MRD monitoring. Methods: Molecular-cytogenetic techniques (mFISH, mBAND, BAC-FISH), chromosome microdissection, next generation sequencing, long-range PCR and direct Sanger sequencing were used to map the chromosomal translocation in the der(10)t(3;10)(p21.3;q23) characteristic for the cell line K562. After cytogenetic identification of the chromosomal translocation (Figure 1A), the derivative chromosome was microdissected (Figure 1B). The microdissected fragments were directly subjected to whole genome amplification (WGA; Figure 1C) and then sequenced on the GS Junior platform for next generation sequencing (Figure 1D). Obtained reads were aligned to reference sequences of chromosomes 3 and 10, using in-house developed software (Figure 1E). The last mapped reads from both chromosomes were used as docking sites for primers for long-range PCR to amplify the putative breakpoint (Figure 1F). The long-range PCR products were directly sequenced using Sanger sequencing to reveal the precise nucleotide sequence of the breakpoint (Figure 1G). Results: Using a combination of cytogenetic and molecular approaches, we mapped the K562-unique translocation in der(10)t(3;10)(p21.3;q23) from the chromosomal level to the nucleotide level (Figure 1). Direct sequencing of this breakpoint revealed a head-to-head fusion of genes CDC25A and GRID1. The time demand of the whole procedure was approximately 6 weeks. Summary/conclusions: Current technologies of molecular cytogenetics and molecular biology open new vistas in the identification of unique, clone-specific genetic abnormalities in patients with AML. Our work clearly shows that "walking" from the chromosomal level to the nucleotide level is feasible and readily applicable for eligible AML patients.



CHRONICKÁ LYMFATICKÁ LEUKEMIE

2169.

Léčba refrakterní chronické lymfocytární leukemie

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

Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je zcela mimořádná z hlediska různorodosti prognózy, s celkovým přežitím sahajícím od desítek let po méně než 2 roky. V současnosti je k dispozici vysoce účinná léčba 1. linie v podobě chemoimunoterapie FCR (fludarabin, cyklofosfamid, rituximab). Léčba refrakterní CLL (definované jako nedosažení léčebné odpovědi či progrese do 6 měsíců od skončení léčby) však představuje zásadní problém; s velmi nepříznivou prognózou je spojena CLL refrakterní na fludarabin a zejména tzv. dvojitě refrakterní CLL (refrakterní na fludarabin i alemtuzumab). Pro tyto skupiny nemocných je typický častý výskyt vysoce nepříznivých prognostických faktorů (zejména poruchy signální dráhy proteinu p53 v důsledku delece a/nebo mutace), špatná odpověď na záchrannou léčbu a krátké celkové přežití. Alemtuzumab, monoklonální protilátka anti-CD52, je registrována pro léčbu nemocných refrakterních na fludarabin; nemocní s masivní lymfadenopatií (≥ 5cm) však mají zpravidla horší léčebnou odpověď. Nově je pro nemocné s dvojitě refrakterní CLL registrován ofatumumab, plně lidská monoklonální protilátka anti-CD20. Ani u jednoho z těchto preparátu však většinou nelze očekávat delší trvání léčebné odpovědi. Použití vysokodávkovaných kortikoidů (methylprednisolonu či dexametazonu) v monoterapii či kombinaci s monoklonálními protilátkami prokázaly dobrou účinnost v léčbě refrakterní CLL, je však často provázeno významnými infekčními komplikacemi. Další možnost představuje kombinace bendamustinu s rituximabem, u které je výhodou poměrně nízká hematotoxicita. Naopak vysoce hematotoxické jsou režimy založené na platinových derivátech, např. R-DHAP (rituximab, cytosin arabinosid, cisplatina, dexametazon). V současné době probíhá řada klinických studií testujících nové preparáty v léčbě refrakterní CLL; jako slibné se jeví lenalidomid, inhibitor fosfatidylinositol-3 kinázy GS1101 (dříve CAL-101) či inhibitor Brutonovy kinázy PCI-32765. Vzhledem k výrazně nepříznivé prognóze refrakterní CLL je nejdůležitějším krokem u těchto nemocných včasné zvážení alogenní transplantace krvetvorných buněk jakožto jediné léčebné možnosti s reálnou šancí na trvalé vyléčení. Cílem tohoto přehledného sdělení je shrnout dosavadní poznatky o léčbě refrakterní CLL. Podpořeno grantem NT/13412 IGA MZ ČR.

2186.

Mutační stav IgVH: faktor predikující přežití pacientů s B-CLL, význam subgenů V3-21 a V1-69, analýza dat jednoho centra

Urbanová Renata, Papajík Tomáš, Procházka Vít, Turcsányi Peter, Szotkowski Tomáš, Humplíková Lenka, Pikalová Zuzana, Holzerová Milena, Jarošová Marie, Marešová Ivana, Zapletalová Jana, Indrák Karel *(Hemato-onkologická klinika FN a LF UP Olomouc; Ústav lékařské biofyziky LF UP, Olomouc)*

Úvod: Přítomnost somatických mutací ve variabilní části těžkého řetězce imunoglobulinu (IgVH) definuje prognosticky odlišné subtypy B chronické lymfocytární leukemie, nemutovaný stav znamená kratší celkové přežití (OS). Subgeny V3-21 a V1-69 jsou považovány za prognosticky nepříznivé. Cíl práce: 1, popsat podsoubory pacientů s mutovaným stavem IgVH (M) a nemutovaným stavem IgVH (UM), porovnat jejich OS. 2, analyzovat u podsouborů význam dalších prognostických faktorů OS (stádium Binet, přítomnost 11q- nebo17p-, subgeny V3-21 a V1-69). Soubor nemocných a metodika: Byla provedena retrospektivní analýza 421 pacientů sledovaných a léčených na HOK FN Olomouc, u nichž byl v letech 2000-2011 vyšetřen mutační stav IgVH, medián (Me) věku pacientů je 61 let, rozmezí 30-81, zastoupení mužů/žen 65%/35%, stádií Binet C 18%, B 28%, A 54%, zastoupení rizikových aberací detekovaných metodou FISH 11q- nebo 17p- je 26%. Mutovaný stav mělo 179 pacientů (42,5%) a 242 nemocných (57,5%) nemutovaný stav IgVH. Statistické metody: univariační analýza, Kaplan-Meierovy křivky celkového přežití, Log Rank test (Mantel-Cox) a Fischerův přesný test. Výsledky: 1/ byl prokázán rozdíl v OS u UM pacientů oproti M pacientům, Me OS 96 měsíců (95%CI 84-109) vs 206 měsíců (95%CI 117-295) ($p<0,0001$). Univariační analýzou celého souboru byly prokázány další rizikové faktory: věk>65 let ($p=0,0002$), stádium Binet C ($p<0,0001$), přítomnost 17p- nebo 11q- ($p=0,026$) a přítomnost subgenu V1-69 ($p=0,008$). U podsouboru UM oproti M byl

signifikantně vyšší výskyt cytogenetických změn 11q- nebo 17p- (38% vs 9%, p<0,0001) a četnější zastoupení Binet C (25,5% vs 8%, p<0,0001). 2/ v podsouborech M a UM nadále přetrvává variabilita průběhu onemocnění odvislá od dalších prognostických faktorů. Byl prokázán u pacientů UM i M význam stanovení stádia Binet C (p<0,05 vs p<0,0001). U podsouboru UM nebyl prokázán význam stavovení 11q- nebo 17p-(p<0,292), 17p- (p<0,55) a V1-69 (p<0,25). U podsouboru M je naznačena tendence ke kratšímu přežití pacientů s V3-21 subgenem, i když statisticky nevýznamně (p=0,095). Závěr: Nemutovaný stav IgVH je rizikový faktor ovlivňující přežití pacientů, další rizikové faktory (11q- nebo 17p-) již jejich prognózu nemění. Naopak stanovení stádia Binet C si prognostický význam zachovává u UM i M pacientů. Univariační analýza všech pacientů prokázala prognostický význam stanovení subgenu V1-69 a naznačuje význam V3-21 subgenu pacientů s mutovaným stavem.

Podporováno grantem LF-2012-007.

2125.

Mutační stav genu ATM u CLL pacientů nesoucích deleci 11q nebo defekty v genu TP53

Navrkalová Veronika, Zemanová Jana, Šebejová Ludmila, Lochmanová Jana, Kubešová Blanka, Doubek Michael, Brychtová Yvona, Mayer Jiří, Pospíšilová Šárka, Trbušek Martin *(Středoevropský technologický institut - CEITEC, Masarykova univerzita; IHOK, FN, Brno)*

U pacientů s chronickou lymfocytární leukemií (CLL) jsou často nalézány abnormality genu ATM, které představují významný prognostický faktor. Delece genu ATM (11q-) jsou rutinně analyzovány metodou I-FISH. Nicméně vyčlenění pacientů s jasně defektní ATM je komplikováno několika faktory: (i) samotná delece 11q neznamená inaktivaci ATM, pokud je druhá alela funkční (ii) mutace ATM se vyskytují jak u pacientů s 11q-, tak u pacientů bez této delece (iii) mutační analýza ATM je komplikovaná vzhledem k extrémní velikosti genu a nepřítomnosti preferenčních míst pro vznik mutací. Naším cílem bylo vytvořit efektivní systém pro detekci mutací ATM a zjistit jejich frekvenci u jednotlivých rizikových skupin CLL pacientů. Použili jsme následující komplementární metody: (a) resekvenační čip (Affymetrix) navržený pro detekci 1-nt substitucí (b) western blotting (WB) pro stanovení hladiny proteinu ATM (c) funkční test založený na indukci genů p21 a PUMA po ošetření CLL buněk buď fludarabinem nebo doxorubicinem; v případě inaktivace ATM dochází k indukci po fludarabinu, ale nikoli po doxorubicinu. Pomocí resekvenačního čipu bylo analyzováno 107 CLL pacientů. U 15 pacientů (14%) jsme detekovali 16 ATM mutací (13 substitučních, 2 nesmyslné a 1 sestřihovou). V paralelní analýze pomocí WB jsme zaznamenali nulovou hladinu proteinu ATM u 11 pacientů, mezi nimiž bylo šest s mutací detekovanou na čipu a dva s mutacemi identifikovanými pouze přímým sekvenováním (2 delece, 1 substituce); u zbývajících tří pacientů jsou mutace ještě analyzovány. Celkově jsme tedy identifikovali 20 pacientů (19%) s prokazatelným ATM defektem (přítomnost mutace a/nebo nulové hladiny proteinu). Pokud funkční test indikoval mutaci (n=12 pacientů), byla tato mutace vždy nalezena. Některé další identifikované mutace se ovšem neprojevily dysfunkcí v tomto testu. Frekvence inaktivace ATM v jednotlivých genetických skupinách byla následující: 6 % (3/49) u pacientů s defektem TP53, 32 % (13/41) u pacientů s 11q-, 24% (4/17) u pacientů bez těchto defektů. Tyto výsledky potvrzují, že ATM a TP53 mutace se vylučují (i když ne striktně) a dále ukazují, že frekvence mutací ATM se dramaticky neliší mezi pacienty s 11q- a bez této delece. Pro zodpovědné stanovení abnormalit v genu ATM je vhodné používat komplexní přístup založený na několika komplementárních metodách, který umožňuje přesnější stratifikaci CLL pacientů.

Práce byla podpořena granty MUNI/A/0784/2011, CZ.1.07/2.3.00/20.0045
a CZ.1.05/1.1.00/02.0068.

2155.

Význam zobrazovacích metod u chronické lymfocytární leukémie

Smolej Lukáš, Bachh Aadil, Vodárek Pavel, Šimkovič Martin, Motyčková Monika *(II. interní klinika, Oddělení klinické hematologie, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové)*

Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je historicky považována za „tekuté“ onemocnění, avšak u velké části nemocných dochází k rozvoji významné lymfadenopatie. Klasické stagingové systémy využívají pouze fyzikálního vyšetření a současná verze mezinárodních doporučení pro diagnostiku

a léčbu CLL (NCI-WG kritéria, Hallek et al., Blood 2008) nedoporučují rutinní použití zobrazovacích metod při stagingu CLL v rámci běžné péče. Několik studií však v poslední době naznačuje možný vztah vnitřní lymfadenopatie k nepříznivé prognóze. Cílem naší analýzy bylo posouzení vlivu vnitřní lymfadenopatie na klinický průběh CLL. Provedli jsme retrospektivní analýzu nemocných s CLL sledovaných či léčených na našem pracovišti mezi léty 2000-2010. Celkem bylo zařazeno 301 nemocných (198 mužů, medián věku 63 let). Nízké/střední/vysoké riziko dle Raie bylo přítomno u 38/50/12 %. Výsledky: Vnitřní lymfadenopatie byla zjištěna u 142 nemocných (48 %): nitrobřišní v 37 %, nitrobřišní i mediastinální v 11 %. Masivní lymfadenopatie (≥ 5cm) se vyvinula u 84 nemocných (28 %). Rozsah vnitřní lymfadenopatie byl častěji významně větší než zevní lymfadenopatie (stejný rozsah u 45 % nemocných, větší uzliny vnitřní u 41 %; větší uzliny zevní v 14 %; n=117). Celkové přežití (OS) bylo významně kratší u nemocných s vnitřní lymfadnopatií (medián 87 vs 124 měsíců, p=0,024); byl také trend ke kratšímu OS u nemocných s masivní lymfadenopatií (medián 88 vs. 112 měsíců, p=n.s.). Naše data tedy ukazují, že zobrazovací metody mohou mít zásadní význam při stagingu a stanovení prognózy nemocných s CLL - téměř polovina nemocných měla v průběhu onemocnění vnitřní lymfadenopatii, které byla spojena s kratším přežitím, u 28 % se vyvinula masivní lymfadenopatie. Tyto nálezy mohou být vysoce důležité pro klinická rozhodování s ohledem na načasování a typ léčby, posouzení léčebné odpovědi apod.

2146.

Fludarabin s cytarabinem a následná alogenní transplantace krvetvorných buněk po režimu s redukovanou intenzitou u pacientů s vysoce rizikovou chronickou lymfatickou leukémií

Krejčí Marta, Brychtová Yvona, Doubek Michael, Tomíška Miroslav, Horký Ondřej, Mayer Jiří *(IHOK, FN, Brno)*

Úvod: Alogenní transplantace krvetvorných buněk (SCT) je léčebnou alternativou pro pacienty s vysoce rizikovou chronickou lymfatickou leukémií (CLL). Podání kombinované chemoterapie a následná SCT po režimu s redukovanou intenzitou se jeví jako nadějné především u rizikových pacientů s akutní leukémií, cílem práce je ověřit efektivitu a toxicitu tohoto terapeutického přístupu u rizikových CLL pacientů. Metody: Jako vysoce riziková CLL byly definovány rezistentní onemocnění nebo časný relaps (do 12 měsíců) na kombinovaný fludarabinový režim (10 pac.) nebo progredující onemocnění s přítomností delece p53 (5 pac.). Medián doby od diagnózy CLL do provedení SCT byl 48 měsíců, medián počtu předchozích léčebných linií byl 3. Kombinace fludarabinu (30 mg/m^2) s cytarabinem (2 g/m2) po 4 dny (FC) byla použita k cytoredukci. Po třídenní pause byl aplikován RIC: 4 Gy TBI, dále ATG (Fresenius) 10-20 mg/kg/den po 3 dny a cyklofosfamid 40-60 mg/kg/den po 2 dny. Medián věku byl 50 let. Typy dárců: 6x HLA identický sourozenec, 9x nepříbuzenský dárce. Podané štěpy: 13x PBSC, 2x kostní dřeň. Po SCT byla monitorována minimální zbytková nemoc (MRD) pomocí flowcytometrické analýzy a RQ PCR. Výsledky: Medián přihojení neutrofilů (nad 0,5 x 10E9/l) byl 16 dní, přihojení štěpu bylo dosaženo u všech 15 pac. Nejčastější toxicity dle CTC kritérií byly infekce stupně III/IV (12 z 15 pac.) a dále gastrointestinální toxicita (stupeň III u 8 z 15 pac.). Kompletního chimerismu bylo dosaženo u 80 % pac. v mediánu 68 dní. Úmrtí bez souvislosti s relapsem (NRM) v 1 roce a ve 2 letech od SCT byla 7 % a 13 %. Příčiny NRM: 1x GvHD, 1x závažná infekce. Incidence akutní GVHD byla 50 % (7/14); 4x stupeň I+II, 3x stupeň III. Incidence chronické GVHD byla 46 % (6/13), 4x forma limitovaná, 2x extenzívní. Léčebná odpověď byla dosažena u 14 pac. (93 %), 12x kompletní remise (80 %), 2x parciální remise progrese (13 %). Dlouhodobá negatitivita MRD po SCT byla dosažena u 10 pac. Medián sledování od SCT je 30 měsíců (rozpětí 6-42). U 20 % pac. (3/15) došlo k relapsu CLL. Žije 11 pac. (73 %) v remisi onemocnění; dále 1 pac. s relapsem CLL. Zemřeli 3 pac. (20 %); z toho NRM 2x, progrese 1x. V souboru 15 pac. je 2-leté přežití bez relapsu nemoci (PFS) 70 % a 2-leté celkové přežití (OS) po SCT 85 %. Závěr: FC-RIC protokol představuje efektivní terapii u pacientů s vysoce rizikovou CLL s přiměřenou toxicitou. Léčebná odpověď je 93 %, NRM ve 2 letech je 13 %, 2-leté PFS a OS jsou 70 % a 85 %.

2238.

Alogenní transplantace krvetvorných buněk u nemocných s chronickou lymfocytární leukemií na Hemato-onkologické klinice LF UP a FN Olomouc

Turcsányi Peter, Raida Luděk *(Hemato-onkologická klinika FN, Olomouc)*

Úvod: Alogenní transplantace krvetvorných buněk (TKB) představuje stále jediný potenciálně kurabilní přístup u nemocných s chronickou lymfocytární leukémií (CLL), který je však zatížen nezanedbatelno morbiditou a mortalitou. Cíl: Analyzovat výsledky alogenních TKB provedených u nemocných s CLL na HOK LF UP a FN Olomouc. Soubor nemocných: Transplantováno bylo 16 nemocných (11 mužů a 4 ženy) s věkovým mediánem 57 (32-59) let. Stav onemocnění před TKB dle NCI kritérií: 8 nemocných mělo aktivní onemocnění/progresi, 7 stabilní nemoc, 1 pacient byl v parciální remisi. 5 příjemců (31%) podstoupilo TKB od HLA-identického příbuzného dárce (MRD), 7 (44%) od HLA-identického nepříbuzného (MUD) a 4 (25%) od HLA-inkompatibilního dárce (MMUD). Až na jednoho nemocného, byly u všech transplantovány periferní kmenové buňky po nemyeloablativním přípravném režimu nebo režimu s redukovanou intenzitou (RIC). Výsledky: Stabilního přihojení štěpu bylo dosaženo u 12 (80%) z 15 hodnotitelných příjemců. K rozvoji akutní a chronické nemoci štěpu prozi hostiteli (GVHD) došlo u 7 (44%), resp. 3 (25%). Úmrtí na komplikace TKB (NRM) bylo zaznamenáno u 6 nemocných (38%). Kompletní remise (KR) CLL dosáhlo po TKB 10 (67%), parciální remise (PR) 3 (20%) a bez odpovědi (NR) zůstali 2 (13%) z 15 hodnotitelných pacientů. Relaps CLL byl pozorován u 2 nemocných (20%). Celková mortalita v souboru je při dvouletém mediánu potransplantačního sledování 56%. Závěr: Prezentované zkušenosti potvrzují kurabilní potenciál alogenních TKB u přibližně třetiny nemocných s CLL, a to i přes vysoké riziko jak potransplantačních komplikací, tak relapsu/progrese základního onemocnění.

Podpořeno Výzkumným záměrem MŠMT MSM-6198959205, grantem LF-2012-007 UP v Olomouci.

LABORANTSKÁ SEKCE 2

2165.

Kolapsové stavy u 18-leté dívky, aneb „Jak prosté, drahý Watsone“

Minařík Jiří, Faltýnek Ladislav, Horák Pavel, Smržová Andrea, Skácelová Martina, Ščudla Vlastimil *(III. interní klinika - NRE, FN, Olomouc)*

Mladá, 18-letá dívka byla asi rok vyšetřována pro kolapsové stavy s námahovou dušností. V rámci širší diagnostiky bylo provedeno i vyšetření na nakloněné rovině (HUTT) s konstatováním hraničního nálezu ortostatické hypotenze. Při ambulantním sledování na interní ambulanci opakovaně prováděny i odběry na in vitro testy štítné žlázy se zachycením latentní hypothyreózy, dosud bez nutnosti terapie. Pro nakupení kolapsových stavů spolu s febriliemi až 38,6 °C s celkovou slabostí a pocitem zhoršení hybnosti rukou s paresteziemi konečků prstů odeslána k došetření na naši kliniku. Předmětem sdělení je souhrn anamnestických údajů a laboratorních parametrů vedoucích k úspěšné diagnóze a nekomplikované léčbě zprvu komplikovaného diagnostického stavu.

2139.

Moderní ultrarychlá separace pomocí centrifug StatSpin

Sečkařová Martina, Chalupníková Petra, Ježáková Jarmila, Neplechová Daniela, Sýkorová Miroslava, Úlehlová Jana, Slavík Luděk *(HOK, FN, Olomouc)*

Separace séra a plasmy patří mezi základní operace zpracování biologického materiálu v takřka všech typech laboratoří. V poslední době lze sledovat některé nové možnosti z hlediska efektivity zpracování biologického materiálu. Pro oddělení krevních elementů od séra (plazmy) je vhodná centrifugace při 1000 – 1500 g (g = násobek gravitačního zrychlení) po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Delší doba centrifugace nebo zvýšení počtu g vede často k částečné či úplné hemolýze. Plazma nebo sérum mají být odděleny co možná nejdříve, nejpozději však do 2 hodin od odběru (pro stanovení draselných iontů do 1 hodiny od odběru). Krev pro stanovení tepelně nestálých analytů (parathormon, osteokalcin, natriumretické peptidy a další) musí být centrifugována v chlazené centrifuze. Předčasné oddělení séra od krevních elementů (dříve než za cca 20 – 30 minut) však může vést k dodatečné tvorbě fibrinu a dochází tak k pocentrifugační koagulaci. Z tohoto pohledu je plazma jako biologický materiál pro další analýzy vhodnější – krev je možné ihned centrifugovat, hrozí menší nebezpečí hemolýzy. Až do současné doby bylo technicky možné provádět centrifugaci od 1000 do 2500 g po dobu 15 - 30 min. Tyto klasické techniky do značné míry omezovaly průchodnost vzorků laboratoří (často nyní vyjadřováno jako tourn around time). V poslední době dochází k rozšíření «ultracentrifugace» tj. separace s použitím podstatně vyšších g - mezi 7000 - 8500 s podstatně zkrácenou dobou provedení 2 - 3 min. Cílem naší práce bylo zavedení ultracentrifugace v koagulaci. Cílem zpracování vzorků v koagulaci je nejčastěji získání plasmy chudé na destičky, která je využívána pro široké spektrum vyšetření. Pokud projdeme dostupnou literaturu včetně mezinárodních doporučení, můžeme vybrat zejména doporučení Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). CLSI nabízí pokyny pro odstředění vzorků pro koagulační vyšetření definované jako: separace 1500x g po dobu 15 minut nebo «takovou rychlostí, a časem potřebným k odstranění krevních destiček a získání plazmy chudé na destičky definované počtem destiček $<10x10^9/l$“. CLSI dále říká, že nejfrekventnější koagulační vyšetření - aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT), protrombinový čas/INR (PT/INR) a trombinový čas testování prováděná z čerstvé plazmy nejsou ovlivněna počtem krevních destiček až do hladiny $200x10^9/l$. Na základě těchto znalostí jsme provedli implementaci centrifug StatSpin2 a StatSpin3 do provozu koagulační laboratoře.

2203.

Analýza tělních tekutin – zkušenosti pracoviště

Juráňová Jarmila, Kadlecová Jana, Sklenářová Jaroslava, Bartová Radmila, Lošťáková Vladimíra, Gallo Jiří, Zapletalová Jana, Přikrylová Vranová Hana, Indrák Karel, Faber Edgar *(Hemato-onkologická klinika; Neurologická klinika; Ortopedická klinika; Klinika plícních nemocí a tuberkulózy; Oddělení klinické biochemie a imunogenetiky, FN Olomouc)*

Problematika analýzy tělních tekutin je stále více aktuální, neboť toto vyšetření slouží pro rychlou diferenciální diagnostiku. Na podkladě dodaných výsledků může lékař odlišit, zda se jedná o infekci, zánět, krvácení či nádorové onemocnění. Mezi vyšetření tělních tekutin patří (kromě dalších jiných) i cytologické vyšetření standardně prováděné mikroskopicky. Cytologické vyšetření v sobě zahrnuje:
• stanovení celkového počtu krevních elementů (leukocytů a erytrocytů), které je prováděno ve Fuchs-Rosenthalově komůrce. Je však nedostačující pro potvrzení či vyloučení diagnózy, ale je důležité pro rozhodování o potřebě zhotovení cytologických preparátů.
• stanovení buněčných typů (cytomorfologické hodnocení buněk), jež umožní vyslovit diagnostické podezření. Vyšetření je však časově náročné a vyžaduje přítomnost specialisty - cytologa. V naší hematologické laboratoři pracujeme s analyzátorem krevních elementů nové generace, který umožňuje provádět analýzu počtu krevních elementů v tělních tekutinách snadněji. Metoda je validovaná, rychlá a nevyžaduje speciální preanalytickou přípravu ani školení obsluhy. K stanovení buněčných typů využíváme automat, který digitálně zpracovává cytologické preparáty pomocí tzv. digitální morfologie. Nejčastěji vyšetřujeme likvory, synoviální a pleurální výpotky. Naše práce porovnávala:
1. mezi sebou dvě metody stanovení počtu leukocytů v likvoru - mikroskopicky ve Fuchs-Rosenthalově komůrce a následně na hematologickém analyzátoru Sysmex XE 5000. Celkem bylo vyšetřeno 360 vzorků dospělých i dětských pacientů. Závěr: statistickým vyhodnocením byla konstatována shoda obou metod v hodnocení (tj. pozitivní/negativní výsledek) ve 307 případech (tj. 85,3% shoda). Korelační koeficient r = 0,662.
2. mezi sebou stanovení počtu leukocytů v synoviálním punktátu na dvou hematologických analyzátorech Sysmex XE 5000 a Coulter LH 750. Celkem bylo vyšetřeno 135 vzorků dospělých pacientů. Závěr: statistickým vyhodnocením byla konstatována silná korelace r = 0,945.
3. mezi sebou stanovení počtu leukocytů v pleurálním punktátu na dvou hematologických analyzátorech Sysmex XE 5000 a Coulter LH 750. Celkem bylo vyšetřeno 38 vzorků dospělých pacientů. Závěr: statistickým vyhodnocením byla konstatována silná korelace r = 0,959. K statistické analýze dat byl použit software SPSS verze 15 (SPSS Inc., Chicago, USA).

2131.
Současná analýza bronchoalveolární laváže v cytologické laboratoři
Bartová Radmila, Gruntová Dagmar, Lošťáková Vladimíra, Kolek Vítězslav, Juráňová Jarmila, Vrbová Olga, Grycová Petra *(Klinika plicních nemocí a tuberkulózy FN a LF; Hemato-onkologická klinika FN, Olomouc)*

BAL (bronchoalveolární laváž) je neinvazivní metoda, která se provádí při bronchoskopii, kdy se pacientovi aplikuje 150–200 ml fyziologického roztoku o teplotě 37°C do segmentálního bronchu s jeho následným odsátím. Získaná tekutina představuje vzorek buněčných i nebuněčných komponent epiteliálního povrchu bronchiolů a alveolů, včetně identifikace infekčních patogenů. Její složení se při zánětlivých a imunitních dějích v plicích významně mění. Aspirovaný materiál je podrobován cytologickému, imunologickému a mikrobiologickému vyšetření. Hlavní indikací k provedení BAL, je podezření na plicní infekce, neinfekční zánětlivé procesy, diseminované plicní nádorové postižení plic a u imunokompromitovaných nemocných v rámci diferenciální diagnostiky plicního postižení nejasného původu. Pokud je v materiálu hlen, přefiltruje se přes gázu. Hodnotí se celkový počet buněk v Bűrkerově komůrce. Materiál zpracováváme pomocí cytocentrifugy nebo sedimentací v cytosedimentační komůrce. Následně obarvíme May-Grűnwald-Giemsa. Při hodnocení buněčného rozpočtu je doporučováno prohlédnout minimálně 300, lépe 600 buněk. Normální nálezy jsou makrofágy nad 80%, lymfocyty do 15%, neutrofily do 3%, eosinofily do 0,5%. Cytologické vyšetření provádí zkušený klinický cytolog. Při cytologickém vyšetření můžeme zachytit přítomnost nádorových buněk, plísňových vláken a spor, pneumocyst , acidorezistentních tyček a virových inkluzí. V současné době máme možnost ve spolupráci s Hemato-onkologickou klinikou využívat k diagnostice přístroj CellaVision DM 96 (přístroj na digitální morfologii), který analyzuje kromě krevních elementů i tělní tekutiny. Od začátku tohoto roku jsme vyšetřili 60 vzorků BAL. Vyhodnocení se provádělo nejprve mikroskopicky z cytospinů, a potom na analyzátoru pro digitální morfologii. Cytolog může díky CRRS softwaru externě vstoupit do databáze přístroje, nahlížet na preparáty a schválit výsledek. Nález lze konzultovat i s odborníky z jiných vzdálených pracovišť nebo s experty ze zahraničí. Nová vyhodnocovací technika umožňuje a usnadňuje včasnou diferenciální diagnostiku řadu onemocnění. BAL je šetrné, opakovatelné a v rukou zkušeného bronchologa bezpečné vyšetření s minimem komplikací, kterým získáme materiál lépe odrážející patologické procesy v plicním parenchymu, než sputum nebo bronchiální výplach.

2142.
Zřídka vídané morfologické nálezy ve fyziologické kostní dřeni
Slánská Markéta, Jordanová Barbora, Zapletal Ondřej, Blatný Jan *(Oddělení dětské hematologie, FN, Brno)*

Úvod: Kostní dřeň je hlavním orgánem hematopoézy a zároveň jedním z největších orgánů lidského těla. Podstatnou část kostní dřeně tvoří krvetvorná tkáň, která se skládá z kmenových buněk, jež běžně v kostní dřeni neidentifikujeme, prekurzorů jednotlivých řad (červené, bílé a destičkové řady) a ze zralých krvinek, které plynule přecházejí do obvodové krve. Metodika: V nátěrech fyziologické kostní dřeně mohou vyskytnout buňky, jejichž morfologie je snadno zaměnitelná s jinými buňkami kostní dřeně (osteoblasty, osteoklasty), které nacházíme zejména u dětí. Kromě těchto nálezů mohou být ve dřeni přítomny zajímavé jevy, např. tzv. erytroblastické ostrůvky s rofeocytózou, které běžně v nátěrech nevídáme. Výsledky: Erytroblastické ostrůvky jsou základem pro rofeocytózu (pinocytózu). Ostrůvky jsou tvořeny makrofágem, obklopeným koncentrickým prstencem vyzrávajících normoblastů. Makrofág zde slouží jako zásobárna železa pro tvorbu hemoglobinu ve vznikajících erytrocytech. Současně také fagocytuje jádra, která jsou mezi stádiem oxyfilního normoblastu a retikulocytu vyloučena z buněk. Rofeocytóza je pohlcování zrnek feritinu a hemosiderinu erytroblasty z makrofágů v kostní dřeni. Osteoblasty jsou malé jednojaderné buňky podílející se na stavbě kostí. V nátěrech z kostní dřeně se vyskytují jen ojediněle a to ve skupinách, přitisknuté k sobě. Častější nález je u dětí. Je nutné znát jejich morfologii, neboť mohou být zaměněny s plasmatickými buňkami. Osteoklasty jsou mnohojaderné buňky, které se účastní přestavby kostní tkáně. V nátěrech kostní dřeně u zdravých dospělých jsou neobvyklým nálezem, častější jsou u dětí. Díky podobné morfologii je možná jejich záměna s megakaryocyty. Závěr: Ve svém sdělení by chtěli autoři tohoto příspěvku přiblížit některé fyziologické nálezy, které ve většině nátěrů kostní dřeně nepozorujeme, ale přesto jsou běžnou součástí krvetvorné tkáně, zejména u dětských pacientů.

WIEDERMANNOVA PŘEDNÁŠKA

European LeukemiaNet recommendations for the treatment of Philadelphia chromosome negative myeloprolipherative disorders
Barbui Tiziano *(Bergamo – ITA)*

NE-HODGKINSKÉ LYMFOMY 1

2233.

Dvacet let s cladribinem v léčbě vlasatobuněčných leukémií na Hemato-onkologické klinice LF UP a FN Olomouc

Raida Luděk, Papajík Tomáš, Faber Edgar, Hubáček Jaromír, Procházka Vít, Szotkowski Tomáš, Urbanová Renata, Hluší Antonín, Procházková Jana, Rusiňáková Zuzana, Rohoň Peter, Pikalová Zuzana, Sičová Kateřina, Indrák Karel, Langová Kateřina *(HOK LF UP a FN; Katedra biofyziky LF UP, Olomouc)*

Úvod: Od počátku 90. let je purinový analog cladribin referován jako zásadní a průlomový preparát v léčbě vlasatobuněčné leukémie (VBL). Po téměř dvaceti letech od zahájení jeho aplikace v této indikaci byla provedena analýza dat nemocných léčených na Hemato-onkologické klinice LF UP a FN Olomouc. Cíl: U nemocných s VBL léčených cladribinem zhodnotit počet dosažených hematologických remisí a následných relapsů/progresí choroby. Rovněž posoudit mortalitu ve sledovaném období, a to jak celkovou, tak v souvislosti s VBL. Soubor nemocných: Byla analyzována data 78 nemocných, 20 žen (26%) a 58 mužů (74%), s věkovým mediánem 52 (35 - 82) let a mediánem sledování od stanovení diagnózy VBL 10 (2 - 31) let. 17 z nich (22%) podstoupilo před cladribinem splenektomii, 22 (28%) bylo léčeno interferonem alfa. Všem nemocným byl aplikován cladribin v celkové dávce 0.7 mg/kg, a to buď intravenózně nebo podkožně. Léčebná odpověď byla vyhodnocena do 6 měsíců. Výsledky: Hematologické remise onemocnění jediným cyklem cladribinu dosáhlo 74 nemocných (95%). U 20 z nich (27%) došlo k relapsu/progresi VBL, a to v mediánu 4 (1 - 13) let. V průběhu sledování bylo zaznamenáno 22 úmrtí (28%), ale pouze u třech nemocných (4%) v přímé souvislosti s VBL. Aktuálně z uvedeného souboru přežívá 56 nemocných (72%) v mediánu 9 (1 - 18) let po první aplikaci cladribinu. Závěr: Výsledky prezentované analýzy potvrzují účinnost cladribinu z hlediska dlouhodobé hematologické stabilizace nemocných s VBL. Relativně nízká mortalita v souvislosti s progresí onemocnění svědčí jak o jeho specifickém indolentním charakteru, tak dalších možných léčebných intervencích. Podpořeno Výzkumným záměrem MŠMT MSM-6198959205, grantem LF-2012-007 UP v Olomouci.

2214.

Udržovací léčba rituximabem u lymfomů – možnosti v roce 2012

Belada David *(II. interní klinika, OKH, FN, Hradec Králové)*

Koncept udržovací léčby je zejména u nemocných s lymfomy úspěšně aplikován již několik let. Velmi dobrá efektivita, minimální toxicita a dlouhý biologický poločas monoklonální protilátky anti CD20 – rituximabu - z něj činí ideální molekulu pro udržovací léčbu. V roce 2012 je standardní indikací podávání u nemocných s folikulárními lymfomy (FL), kde v rámci 1.linie je podáván po 2 měsících po dobu 2 let. V relapsu FL je rituximab podáván 1x po 3 měsících po 2 roky. Nově od roku 2011 je prokázán význam udržovací léčby rituximabem u nemocných s lymfomem z buněk plášťové zóny (MCL), kde po chemoterapii R-CHOP v první linii léčby bylo dosaženo minimálně PR. Zde je podáván po 2M až do progrese lymfomu. Zajímavé jsou i první výsledky udržovací léčby u nemocných s FL s malou nádorovou masou dle GELF kritérií. Zde byla po indukční léčbě 4 dávkami rituximabu po týdnu podávána udržovací léčba rituximabem po 2M po dobu 2 let. To vedlo k výraznému prodloužení doby do nutnosti zahájení cytotoxické léčby oproti ramenu observace. Nutno ale vyčkat ale dalších výsledků studie při delším sledování. U difúzního B-velkobuněčného lymfomu jsou výsledky udržovací léčby zatím nejednoznačné. Výsledky randomizované studie pro 1.linii - NHL-13 - ve které jsou nemocní po terapii R-CHOP randomizováni mezi udržovací léčbu rituximabem (1x po 2 měsících po 2 roky) a observaci, zatím nejsou k dispozici. U pacientů s relapsem difúzního B-velkobuněčného lymfomu jsou již známy výsledky studie CORAL, kde byli mladší nemocní do 60 let randomizováni mezi záchrannou léčbu R-ICE a R-DHAP a poté po autologní transplantaci, následně s 2. randomizací mezi udržovací léčbu rituximabem (1x po 2 měsících po 2 roky) a observaci. Ani zde význam udržovací léčby rituximabem zatím nebyl prokázán. Celkově lze shrnout, že udržovací léčba rituximabem je standardní léčebnou možností u nemocných s FL v první linii i v relapsu i u nemocných s MCL. Léčba se z hlediska toxicity jeví jako velmi dobře tolerovaná. Přesto je v tomto konceptu stále několik otazníků, a to dlouhodobá bezpečnost podávání, optimální schéma a způsob

aplikace nebo způsoby léčby při relapsu lymfomu během udržovací léčby. Udržovací léčba rituximabem představuje velkou naději do budoucna, otázkou je i její delší podávání než dosud ověřené 2 roky podávání, navíc se objevují i další monoklonální protilátky anti CD20, jejichž účinnost i v rámci udržovací léčby je zkoumána (například GA 101).
Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR: NT 12193-5/11.

2114.
Udržiavacia liečba rituximabom v terapii lymfómu plášťových buniek (MCL) - skúsenosti jedného centra
Chudej Juraj, Sokol Juraj, Váleková Ľubica, Hrnčár Matej, Marcinek Juraj, Balhárek Tomáš, Hudeček Ján *(KHaT JLF UK a UNM, Martin - SVK; Klinika onkológie FNsP F.D. Roosevelta, Banská Bystrica - SVK; Ústav patologickej anatómie JLF UK a UNM, Martin - SVK)*

Lymfóm plášťových buniek (MCL) predstavuje približne 6-8% non-Hodgkinských lymfómov (NHL). Patrí medzi malígne lymfómy s najhoršou prognózou. Pozorované sú síce vysoké miery odpovedí pri použití R-CHOP, napriek tomu doba prežívania bez progresie ochorenia je krátka. Stredný vek pacientov s novodiagnostikovaným MCL je 64 rokov, takže režimy, ktoré by nezahŕňali ASCT a vysoko agresívnu chemoterapiu, sú velmi žiaduce a potrebné. Okrem toho, údaje naznačujú, že intenzívna stratégia liečby nemusí vždy predĺžit celkovú dobu prežívania. S ohladom na tieto skutočnosti prebiehala štúdia s názvom „Long-term follow-up of a pilot study from the Wisconsin Oncology Network" s modifikovaným režimom R-hyperCVAD, po ktorom nasledoval udržiavací režim s rituximabom. Modifikovaný režim R-hyperCVAD s udržiavacou liecbou rituximabom ukázal dobrú mieru odpovedí u doteraz neliečeným MCL. Modifikovaný R-hyperCVAD bol vlastne viac podobný režimu CHOP ako R-hyperCVAD, môže sa preto len špekulovat, že predĺženie miery odpovedí bolo vlastne spôsobené udržiavacou liečbou. V súbore našich pacientov s diagnózou MCL sme podávali udržiavaciu terapiu rituximabom (375 mg/m^2, á 3 mesiace, 2 roky) v desiatich prípadoch. U troch pacientov začala byť liečba podávaná až po II. línii terapie (po I. relapse ochorenia). V jednom prípade bola udržiavacia terapia prerušená pre nespoluprácu pacienta (vynechávanie hematologických kontrol). V skupine zvyšných deviatich pacientov sme v dvoch prípadoch zaznamenali relaps základného ochorenia po 11. a 22. mesiacoch od ukončenia maintenance. Udržiavacia liečba pokračuje u dvoch pacientov. Piati pacienti sú v súčasnosti v kompletnej remisii (CR) v období 3–12 mesiacov po ukončení udržiavacej liečby rituximabom. Úloha udržiavacej liečby je pri MCL ešte stále nezodpovedanou otázkou (chýbajú randomizované štúdie a pod.), nie je preto všeobecne odporúčaná, i keď v prípade jej dostupnosti nie je zároveň ani všeobecne neindikovaná.

2195.
Význam autologní transplantace periferních krvetvorných buněk v 1. linii léčby u pacientů s Mantle cell lymfomem - zkušenost centra
Vokurka Samuel, Koza Vladimír, Jindra Pavel, Vozobulová Věra, Schützová Miroslava, Karas Michal, Svoboda Tomáš, Steinerová Kateřina, Hrabětová Marcela, Lysák Daniel *(Hematologicko-onkologické odd., FN Plzeň)*

Souhrn: Mantle cell lymfom (MCL) patří mezi prognosticky závažné lymfomy s mediánem přežití 3–4 let při běžné chemoterapii, postihuje převážně muže s mediánem věku 60 let. Léčba s využitím autologní transplantace periferních krvetvorných buněk v 1. linii by měla zlepšit léčebné výsledky. Cíl: ověřit efekt ASCT v 1. linii u pacientů s nově diagnostikovaným MCL. Metodika: prospektivní monitorace, srovnání období od diagnózy do relapsu / progrese (PFS) a celkového přežití od diagnózy (OS) u pacientů s autologní transplantací v 1. linii a u pacientů bez této léčby (vyloučeni pacienti s ASCT v 2. linii, po alogenní transplantaci, udržovací léčba s Mabterou nebyla zavedena). Soubor: pacienti s MCL a se zahájením 1. linie léčby v 1996-2006 a stav k 12/2011. Skupina bez ASCT po indukci pro neúnosnost s ohledem na věk nebo stav; n = 28 (muži 75%; věk medián 70 (44-77) let; index MIPI 7 (3-10); stav po indukci: CR 54%, PR 25%, SD 14%, progres 7%; protokol indukce: CHOP-like 79%, intenzivní antracyklin-based 3%, VAD-L 18%, rituximab v indukci 57%). Skupina s ASCT po indukci; n = 21 (muži 81%; věk medián 54 (37-71) let; index MIPI 5 (1-10); stav po indukci: CR 57%, PR 43%; protokol indukce: CHOP 47%, intenzivní antracyklin-based 29%, VAD-L 24%, rituximab v indukci 71%). Výsledky: medián věku a MIPI index byly signifikantně vyšší

u netransplantovaných pacientů: 70 (44-77) vs. 54 (37-71), p <0.0001 (t-test), respektive 7 (3-10) vs. 5 (1-10), p = 0,01 (t-test). Autologní transplantace zvýšila zastoupení CR z původních 57% na 90%. Pravděpodobnost PFS, OS a medián PFS a OS byly vyšší u transplantovaných (p = 0,0001 a 0,05): PFS 3 roky a 5 let: 65% vs. 16% a 38% vs. 0%; OS 3 roky a 5 let: 88% vs. 35% a 56% vs. 18%; medián PFS a OS: 40 vs. 16 a 68 vs. 25 měsíců. Závěr a diskuze: data ukazují na efekt zlepšení léčebné odpovědi, PFS a OS u pacientů s ASCT v 1. linii léčby. Pacienti však dále relabují a není zde kurativní potenciál. Posoudit detailní vliv věku, MIPI indexu nebo imunoterapie s rituximabem by vyžadovalo rozsáhlá další sledování a analýzy. Další zlepšení léčebných výsledků krom alogenní transplantace by mohla přinést relativní intenzifikace indukční chemo-imunoterapie a dále doplnění udržovací imunoterapie rituximabem, jak např. ukazují data Finish Lymphoma Group (RCHOP, AraC, fludarabin, udržovací rituximab).

2126.

Zkušenosti s lenalidomidem v netradičních indikacích

Adam Zdeněk, Krejčí Marta, Szturz Petr, Pour Luděk, Hájek Roman, Zahradová Lenka, Mayer Jiří *(Interní hematologická a onkologická klinika LF MU a FN, Brno)*

Registrační studie předurčily lenalidomid pro léčbu mnohočetného myelomu. V literatuře lze však nalézt publikace o dalších chorobách, pro něž byl lenalidomid přínosem. V roce 2011 se naše pracoviště zúčastnilo projektu Compassionate Use Program, určeného pro pacienty se vzácnými maligními krevními chorobami. Tento program umožňoval podat lenalidomid pacientům nereagujícím na klasickou léčbu. Naše pracoviště dostalo lenalidomid pro léčbu celkem 4 nemocných. U pacienta s velmi agresivní formou histiocytózy z Langerhansových buněk, jehož nemoc relabovala po léčbě 2-chlorodeoxyadenosinem, po léčbě chemoterapií CHOEP (cyklofosfamid, adriamycin vinkristin,etoposid a prednison) a po vysokodávkované chemoterapii BEAM s autologní transplantací, navodila léčba lenalidomidem kompletní remisi (dle PET-CT hodnocení). Ta byla konsolidována alogenní transplantací. Pacient je 8 měsíců po transplantaci bez recidivy nemoci v kompletní remisi. Dále byl lenalidomid podán nemocnému s multicentrickou Castlemanovou chorobou, která nereagovala na chemoterapii R-CHOP a pouze částečně reagovala na léčbu thalidomidem. Léčba lenalidomidem byla po 12 cyklech ukončena v prosinci 2012. Pacient je od ukončení léčby 4 měsíce v remisi. Podobně jako v předchozím případě, hodnocení léčebné odpovědi je založeno na PET-CT vyšetření. Léčba lenalidomidem byla dále testována u pacienta s Erdheimovou-Chesterovou chorobou s postižením celého těla včetně CNS. Dle celotělového PET-CT hodnocení a MR mozku došlo sice k vymizení ložisek v CNS, nedošlo ale ke zmenšení akumulace FDG (fluorodeoxyglukózy) v periferních ložiscích. U tohoto pacienta došlo ke zlepšení stavu až při aplikaci anakinry (preparátu Kineret, denně apulka s.c.). Čtvrtým případem byl pacient s mnohočetnou angimatózou, kterého již léčíme 6 let dominantně thalidomidem 100 až 200 mg denně. Tato dávka thalidomidu způsobila závažnou neuropatii a proto bylo nutné najít jinou léčbu. Zjistili jsme, že podání 10 mg lenalidomidu v kombinaci s 50 mg thalidomidu /den může po dobu aplikace stabilizovat toto onemocnění. Efekt léčby jsme v tomto případě hodnotili dle krevního obrazu a markerů diseminované intravaskulární koagulace. Uvedené zkušenosti prokazují, že lenalidomid je účinný i u dalších nemocí, nejen u těch, pro něž byl registrovaný.

Práce byla vypracována v rámci aktivity následujících grantů: specifického výzkumu MUNI/A/0784/2011 a grantů IGA MZd NT11154, NT12130 aNT12215.

2145.

Naše skúsenosti s aplikáciou lipozomálneho cytarabínu v liečbe a profylaxii agresívnych a vysokoagresívnych NHL (skúsenosti 2 pracovísk)

Guman Tomáš, Kafková Adriana, Tóthová Elena, Štecová Natália, Hlebašková Monika, Surová Milena, Takáč Vladimír, Duľová Ingrid, Jurkovičová Jana, Chudej Juraj, Plameňová Ivana, Váleková Ľubica *(Klinika hematológie a onkohematológie, UN L. Pasteura a LF UPJŠ, Košice – SVK; Klinika hematológie a transfuziológie, JLF UK a MUN, Martin - SVK)*

Postihnutie CNS u chorých s lymfoproliferatívnymi ochoreniami (LPO) znamená vždy zlú prognózu, s mediánom prežívania menej ako 6 mesiacov. V období pred profylaxiou sa infiltrácia CNS vyskytovala u 30% - 50% vysokoagresívnych a 10%-20% agresívnych LPO, po zavedení profylaxie došlo

k jej významnému poklesu (5–10% u leukémii a lymfómoch). Lipozomálny cytarabín (LC; DepoCyte) je cytostatikum s postupným uvoľňovaním, určený na priame podanie do mozgomiechovej tekutiny (CSF). Výsledky klinických štúdií poukázali na jeho efektivitu tak v liečbe lymfomatóznej a leukemickej meningitídy ako aj v profylaxii lymfomatózneho postihnutia CNS. Menej frekventné aplikácie cytostatiká zlepšujú nielen compliance pacienta, ale aj významne redukujú počet komplikácií intratekálnej (IT) aplikácie včítane postpunkčného syndrómu. LC sme aplikovali IT do CSF+ profylaxiu kortikoidmi. Prezentujeme súbor 27 pacientov : 17 žien (vek: 39-74r., priemer: 57.12 r.) a 10 mužov (vek: 20–70r., priemer: 50.95 r.) 18 pacientov novodiagnostikovaných (*de novo*) z toho 5 pac. mali primárny lymfóm CNS, 9 pacienti s relapsom, z toho 6 pacienti s postihnutím CNS. Diagnózy: vysokoagresívny NHL : 7 pacientov: (pre B – ALL: 5 pacientov, T- ALL: 1 pacient, BL: 1 pacient), agresívne lymfómy: 14 pacientov: DLBCL: 10 pacientov, MCL: 3 pacienti, PTCL: 1 pacient, indolentné lymfómy: 1 pacient: CLL: 1 pacient,ostatné diagnózy: 5 pacientov: MM: 3 pacienti, Plazmocelulárna leukémia:1 pacient, Lymfomatoidná granulomatóza: 1 pacient. Medián sledovania: máj 2007 – august 2011 liečba: kauzálna: 22 pacientov, profylaxia: 5 pacientov, výskyt lymfomatóznej meningitídy: 15 pacientov , výskyt leukemickej meningitídy: 4 pacienti, RAT na oblasť CNS: 27 pacientov: z toho 20 pacientov → total neuraxis a 7 pacientov → WBI. Hodnotíme a porovnávame diagnostiku (pred a po liečbe LC): CSF, cytológiu, imunofenotypizáciu, výsledky NMR mozgu, klinické prejavy, priebeh liečby a sprievodné komplikácie po aplikácii LC. Hodnotíme celkovú efektivitu liečby - dosiahnutie remisie (CR,PR,SD), neurologické prejavy (pred – po liečbe), celkový počet aplikovaných dávok LC (úvodná, konsolidácia, udržiavacia), celkové prežívanie v mesiacoch.

TRANSPLANTACE 1

2224.

Výsledky alogenních transplantácii krvotvorných buniek pre diagnózu AML na HOK FN Olomouc

Rusiňáková Zuzana, Raida Luděk, Faber Edgar, Indrák Karel *(Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc)*

Ùvod: Vzhľadom k neuspokojivým výsledkom konvenčnej liečby AML predstavuje alogénna transplantácia krvotvorných buniek (aloTKB) pre veľkú skupinu pacientov jediný potencialne kurabilný postup. Naším cieľom je retrospektívne zhodnotenie výsledkov aloTKB u pacientov s AML liečených v našom centre. Metóda: V rokoch 2000-2010 69 pacientov (34 mužov a 35 žien) s mediánom veku 48 rokov podstúpilo aloTKB, v 25 prípadoch od nepríbuzenského darcu (5x s jednou HLA nezhodnou a 3x s dvoma nezhodami) a v 44 prípadoch od zhodného príbuzného darcu. Ako zdroj krvotvorných buniek bola 4x použitá kostná dreň a 65x periférne kmeňové bunky. V dobe diagnózy bola u 59 pacientov (85%) choroba hodnotená ako vysoko riziková. Pred transplantáciu bolo 45 pacientov (65%) v kompletnej remisii (CR). ATG bol v rámci prípravneho režimu aplikovaný 22 pacientom. 27 pacientov podstúpilo transplantáciu po štandardnej myeloablatívnej príprave, 42 pacientov po režimoch s redukovanou toxicitov. Výsledky: U 1 pacienta nedošlo k prihojeniu. Vzostup neutrofilov nad 1,0x109/l bol dosiahnutý v mediáne 15 dní, vzostup trombocytov nad 20x109/l v mediáne 11 dní. Akútna GvHD II-IVst. bola diagnostikovaná u 19 (28%) pacientov. TRM do dňa +100 bola 11%. Extenzívna chronická GvHD sa vyskytla u 9 z 54 hodnotených pacientov (17%). Celková TRM bola 22%. 61 pacientov (88%) dosiahlo CR po TKB. U 17 došlo k relapsu choroby, z nich 10 podstúpilo 2. TKB. S mediánom sledovania 40 mesiacov žije 36 pacientov (53%), 35 (51%) v remisii choroby. Došlo k 7 úmrtiam v súvislosti s akútnou GvHD, 1 úmrtie bolo spôsobené chronickou GvHD, 7 úmrtí bolo zapríčinených infekčnými komplikáciami a v 18 prípadoch bola príčinou progresia/relaps základnej choroby. Pravdepodobnosť 3-ročného prežitia (OS) pacientov je 52%. Záver: Alogénna TKB pacientov s AML je spojená s dobrou efektivitou liečby (3-ročné OS 52%) pri uspokojivej toxicite, problematickou zostáva vyšší výskyt relapsov choroby, hlavne u rizikových pacientov transplantovaných mimo CR.

Podporené grantom LF-2012-007 Univerzity Palackého v Olomouci.

2152.

Treatment results of relapsed acute myeloid leukemia after allogeneic stem cell transplantation - single centre experience

Karas Michal, Steinerová Kateřina, Jindra Pavel, Svoboda Tomáš, Vokurka Samuel, Lysák Daniel, Koza Vladimír *(Department of Hemato-Oncology, Faculty Hospital, Plzeň)*

Background: relapse after allogeneic stem cell transplantation (aloSCT) for acute myeloid leukemia (AML) carries poor prognosis with limited effect of currently available treatment approaches. We retrospectively analysed outcome of patients with relapsed AML after aloSCT at our centre with the aim to evaluate the potential role of donor lymphocyte infusion (DLI), combination of chemotherapy (CHT) and DLI or 2nd aloSCT in treatment of relapsed AML after aloSCT. Patients and methods: from 10/2001 to 10/2011 149 pts underwent aloSCT for AML, 36 pts (24%) relapsed and 22 of them were subsequently treated for relapse. Median of age of treated pts was 45 years (range,28-63 years) and at the time of aloSCT, 12 pts (55%) were in the 1st complete remission (CR) of AML and 10 pts (45%) beyond 1st CR. 13 pts (59%) underwent aloSCT after myeloablative and 9 pts (41%) after reduced-intensity conditioning (36% with related and 64% with unrelated donor). Source of stem cell was peripheral blood in 72% and bone marrow in 28% of cases. The median of time to relapse after aloSCT was 7 months (range, 2-30 months). Treatment of relapse was assessed individually and 9 pts (41%) received DLI, 10 pts (45%) were treated with CHT and DLI and 3 pts (14%) received CHT and 2nd aloSCT. DLI were administered at escalating doses. Results: 9 pts received after relapse DLI. The median of applied doses was 2 (range, 1-4 doses) and 1 patient (11%) achieved CR, which lasts for 9 months. The median of overall survival (OS) after relapse among DLI treated pts was 3 months (range,1-11 monhts). Among 10 pts treated by CHT and DLI 7 pts (70%) achieved CR but subsequently 5 of them relapsed and died, 1 patient died in CR due to GVHD and

only 1 patient is alive in CR for 54 months. The median of disease free survival among CR pts was 5 months (range,3-54 monhts). The median of OS after relapse among CHT and DLI treated pts was 6 months (range, 1-50 months) for all pts and 8 months (range,5-50 months) for CR pts. 3 pts achieved after CHT CR and underwent 2nd aloSCT. 2 pts died 5 and 15 months (TRM, relapse) after 2nd aloSCT and 1 patient is alive in CR for 24 months after 2nd aloSCT. Conslusion:in spite of relatively small number of pts our data suggest that pts with relapsed AML after aloSCT have dismal prognosis using currently available treatment approaches. In future, incorporation of earlier treatment intervention, novel drug and immunomodulation approaches could improve this poor prognosis.

2175.

Alogenní transplantace krvetvorných buněk po redukované přípravě u pacientů starších 65 let – zkušenosti jednoho centra

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

Úvod: výskyt hematologických malignit narůstá s věkem a často se jedná o onemocnění prognosticky nepříznivé, dlouhodobě špatně ovlivnitelné standardní léčbou. Alogenní transplantace krvetvorných buněk po redukované přípravě (RIT) by mohla u části starších nemocných zlepšit tuto nepříznivou prognózu, nicméně s vyšším věkem pacienta nemusí být tento k provedení RIT indikován obvykle z obav před vyšší léčebnou mortalitou (NRM). V tomto sdělení shrnujeme naše zkušenosti s provedením RIT u nemocných starších 65 let na našem pracovišti Pacienti a metody: od 2/2002 do 2/2012 24 pacientů s mediánem věku 66 let (rozmezí 65-70 let), z nichž 29% mělo HCT-CI ≥3, podstoupilo RIT (19xFLU/MEL, 4xFLU/CY, 1xBUFLU/ATG). 12 pacientů podstoupilo RIT pro AML (33% mimo 1. CR), 7 pacientů pro CLL (rezist. onemocnění nebo ≥ 2. relaps), 4 pacienti pro MPO (50% s blastickým zvratem) a 1 pacient pro rezistentní relaps NHL typu FCL. Zdrojem krvetvorných buněk byla periferní krev s mediánem podaných CD34+ buněk 4,55x10E6/kg (rozmezí 0,72-13,80x10E6/kg). V 12 (50%) případech se jednalo o příbuzného a v 12 (50%) případech o nepříbuzného dárce (4x 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 23 (96%) pacientů došlo k přihojení štěpu. Z 23 hodnocených pacientů se akutní GVHD rozvinula u 11 (48%) pacientů a chronická GVHD u 12 (60%) z 20 hodnocených pacientů. Ve všech případech GVHD odpověděla na kortikoterapii. S mediánem sledování žijících pacientů 40 měsíců (rozmezí 5-97 měsíců) žije 10 (42%) nemocných v CR základního onemocnění. 5 (21%) pacientů zrelabovalo a 4 z nich zemřeli. 1 pacient s AML po DLI a podání azacytidinu dosáhl další CR. 10 (42%) pacientů zemřelo z důvodu NRM. NRM do dne +100 byla 13%, do roka po RIT 21%. Předpokládaný EFS a OS ve 4 letech je 41% a 44%. Závěr: s určitou limitaci velikostí souboru získané výsledky ukazují, že RIT (včetně nepříbuzenské) může u části pacientů starších 65 let příznivě ovlivnit jejich prognózu a RIT můžeme považovat za potenciálně kurabilní léčbu pro selektované starší nemocné. Možný nepřívý vliv na NRM, incidenci relapsu a tím nižší celkovou efektivitu RIT u našeho souboru pacientů mohl mít fakt, že většina nemocných podstoupila RIT předléčena a s pokročilým stavem onemocnění. Časnější indikace k RIT by pak mohla vést ke zlepšení výsledků transplantační léčby starších pacientů.

2208.

Stanovenie mikrochimérizmu po alogénnej transplantácii krvotvorných buniek metódou relatívnej kvantifikácie

Hanušovská Eva *(Medirex, a.s., Bratislava – SVK)*

Po alogénnej transplantácii krvotvorných buniek (alo TKB) je dôležité poznať mikrochimérizmus krvotvorby pacienta na molekulovej úrovni. Metódou alel špecifickej Real-time PCR sa dajú detekovať pred alo TKB u darcu a pacienta desiatky NPs (bialelických nukleotidových polymorfizmov), ktoré sú pre donora a recipienta špecifické. Skríningom 12 NPs (11 bialelických nukleotidových polymorfných markerov a 1 monoalelický DNA marker na Y chromozóme) sme schopní relatívnou kvantifikáciou Real time PCR (7300 Real Time PCR System) s použitím SYBR Green merať mikrochimérizmus špecifických DNA markerov vo vzorke periférnej krvi (PK) pacienta po alo TKB. Merania sa zvyčajne uskutočňujú z leukocytov PK pacienta 30,100 a 180 dní po alo TKB a potom

v ročných intervaloch. Na našom pracovisku bolo za uplynulých päť rokov monitorovaných 104 pacientov. Skríningom dvojíc donor/recipient sme vo väčšine prípadov našli 2-3 informatívne autológne markery, iba v 3 prípadoch sme nenašli ani jeden informatívny autológny marker, ktorý je pre meranie mikrochimérizmu najvhodnejší. Relatívnu kvantifikáciu sme vyhodnocovali programom Study (Applied Biosystems), ktorý je určený na relatívnu kvantifikáciu expresie génov. Ako kalibrátor slúžila vždy vzorka pacienta pred alo TKB. Expresia génu GAPDH bola použitá ako endogénna kontrola. V našom laboratóriu sa nám podarilo zaviesť metódu DNA diagnostiky stanovenia mikrochimérizmu po alogénnej transplantácii krvotvorných buniek, ktorá je nezávislá od pohlavia darcu a príjemcu a dosahuje citlivosť <1%. Metóda si našla svoje stabilné miesto v klinickej praxi a slúži lekárovi ako ďalší faktor monitoringu pacienta po alo TKB (prihojenie štepu, prípadne blížiaci sa relaps). Metodika je zapojená do Národného programu skúšania spôsobilosti pre oblasť kvantitatívneho vyšetrenia chimérizmu po alogénnej transplantácii krvotvorných buniek koordinovaného Ústavom hematológie a krvnej transfúzie Národným referenčným laboratóriom pre DNA diagnostiku v Prahe.

2196.

Stanovení hladin citrulinu v séru u pacientů po alogenní transplantaci krvetvorných buněk

Vokurka Samuel, Svoboda Tomáš, Koza Vladimír, Rajdl Daniel, SedláčkováTerezie, Racek Jaroslav
(Hematologicko-onkologické odd., FN, Plzeň; Ústav klinické biochemie a hematologie, FN, Plzeň)

Význam: Citrulin je aminokyselina specificky produkovaná enterocyty. Hladiny citrulinu jsou kvantitavním parametrem nezávislým na etiologii ztráty epitelu tenkého střeva a jejich vyšetření může přinášet informaci a rozsahu postižení tenkého střeva v rámci např. Crohnovy choroby, případně o toxickém poškození epitelu po vysokodávkované chemoterapii. Vyšetření citrulinu není běžnou metodikou a v hemato-onkologii a u pacientů po transplantacích krvetvorných buněk se běžně nevyužívá. Cíl: ověřit možnost vyšetření hladin citrulinu u pacientů s průjmy po alogenní transplantaci krvetvorných buněk. Metodika: prospektivní sledování, srovnání pacientů po alogenní transplantaci a zdravých kontrol, laboratorní kit Citrulin REF K6600 ImmunDiagnostik spektrofotometrie, fa.Lacomed. Soubor: 20 pacientů po alogenní transplantací krvetvorných buněk, muži 17/20 (85%), věk medián 44 (38-64) let, pravděpodobná etiologie průjmu: 8x toxické postižení střeva po chemoterapii ve dnech 1-22 po transplantaci, 8x poškození střeva při probíhající reakci štěpu proti hostiteli (GVHD) ve dnech 43-142, 5x jiné (např. dysmikrobie) ve dnech 120-570 po transplantaci. Kontrolní srovnatelný soubor 20 zdravých dárců krve Transfúzní oddělení FN v Plzni. Výsledky: Hladiny v séru pacientů byly signifikantně nižší 10,5 (0,6 - 63) než u zdravých kontrol 33,3 (19,1 - 45,9) umo/l. U pacientů s větším odstupem po transplantaci a s etiologií průjmu jinou, než předpokládaná toxicita po chemoterapii nebo GVHD, byla patrna tendence k vyšším hladinám citrulinu. U opakovaně sledovaného pacienta K.K. bylo patrné zvyšování hladin v průběhu času od transplantace: den 1 – 3,4; den 20 – 1,6; den 89 – 5,0; den 127 – 15,6; den 189 – 19,5 umol/l. Závěr: metodika vyšetření hladin citrulinu je realizovatelná, zjištěné ukazatele odrážely poškození epitelu tenkého střeva (enterocytů) u pacientů v časném období po alogenní transplantaci krvetvorných buněk a naopak tendenci ke zvýšení produkce citrulinu (regeneraci střeva) v průběhu času – s ústupem toxického a GVHD poškození. Rozsáhlá pozorování by však byla nutná k ověření přesné kinetiky a odchylek v hladinách citrulinu u různých protokolů transplantací, střevních postižení a dalších klinických potransplantačních situací a dále pak hladiny citrulinu může ovlivnit např. renální insuficience.
Vyšetření bylo podpořeno z: Specifický výzkum SVV 262 806, LF UK Plzeň.

NE-HODGKINSKÉ LYMFOMY 2

2202.

Mediastinálne lymfómy zo zrelých B-buniek a ich diferenciálna diagnostika

Balhárek Tomáš, Szépe Peter, Plank Lukáš *(Ústav patologickej anatómie JLF UK a UNM; Martinské bioptické centrum, Martin - SVK)*

Mediastínum je vzhľadom k prítomnosti týmického tkaniva špecifickou lokalizáciou vzniku malígnych lymfómov (ML). Zo zrelých týmických B-lymfocytov tu najčastejšie vznikajú klasický Hodgkinov lymfóm (CHL), zvyčajne typ s nodulárnou sklerózou a samostatný typ veľkobunkového B-lymfómu označovaný ako primárny mediastinálny (týmický) B-lymfóm (PMBCL). Oba ML častejšie postihujú mladšie ženy a prezentujú sa mediastinálnou masou s alebo bez postihnutia supraklavikulárnych LU. Aj napriek tomu, že ide o striktne multiparametricky definované klinicko-patologické entity, tieto sú biologicky príbuzné a niektorí ich považujú za protikladné konce toho istého spektra. Ich rozdielna lymfomagenéza pravdepodobne súvisí s variabilnou odpoveďou lokálneho hostiteľského mikroprostredia. PMBCL vykazuje zachovaný program B--bunkovej diferenciácie (CD20+, PAX5+, CD30+/-, CD15-, OCT-2+, BOB.1+), v CHL je naopak B-program potlačený (CD20-/+, PAX5+/-, CD30+, CD15+, OCT-2-, BOB.1-), aj keď slabá a heterogénna expresia CD20 v SR-bunkách nebýva až tak zriedkavá. Nakoľko hranica medzi obomi ML nie je vždy jednoznačná, existujú špecifické prípady s prechodnými črtami, ktoré sa označujú ako tzv. mediastinálne lymfómy šedej zóny (MGZL). V zásade možno definovať 3 podskupiny MGZL s rôznou mierou fenoménu intermediarity. V prvom prípade ide o kompozitné ML, ktoré sú tvorené synchrónne prítomnými komponentami typu CHL a PMBCL. V druhom prípade ide o sekvenčný výskyt uvedených ML (CHL relabujúci ako PMBCL alebo opačne). V treťom prípade ide o ML s prekrývajúcimi sa morfologickými a fenotypovými črtami PMBCL a CHL, resp. ide o ML vykazujúce asynchróniu medzi morfológiou a fenotypom (CHL s črtami PMBCL alebo PMBCL s črtami CHL). Pre tieto entity bola v SZO klasifikácii z roku 2008 zavedená samostatná kategória tzv. neklasifikovateľných B-lymfómov s črtami medzi DLBCL a HL. Nejde pritom o žiadny odpadkový kôš pre nejednoznačné diagnózy, ale ide o skupinu ML s osobitými morfologicko-fenotypovými a klinickými vlastnosťami. MGZL sú zriedkavé ML, ktoré sa na rozdiel od PMBCL a mediastinálnych CHL vyskytujú častejšie u mladších mužov vo veku 20-40 rokov a vykazujú horšiu prognózu než samostatné CHL a PMBCL. Problematickou nie je len ich diagnostika, ale aj liečba. Podľa viacerých klinických štúdií by pacienti s týmito lymfómami mohli profitovať z liečby pre agresívne B-NHL.

Podporené grantovými projektami VEGA 1/0378/12 a Centrum excelencie CEPV II (IMTS 26220120036) a MBRKM (IMTS 26220220113).

2237.

Klinický pohled na diagnostiku a léčbu primárně mediastinálního B-buněčného lymfomu

Papajík Tomáš, Procházka Vít, Kapitáňová Zuzana, Jarošová Marie, Indrák Karel *(Hemato-onkologická klinika, LF UP a FN, Olomouc)*

Primárně mediastinální B-buněčný lymfom (PMBL) tvoří samostatnou, dobře definovanou jednotku ve spektru difuzních B-buněčných lymfomů (DLBCL). PMBL představuje 2–4% ze všech ne-hodgkinských lymfomů a vyskytuje se zejména u mladých nemocných (medián věku 35 let). Ženy bývají postiženy častěji (poměr žen k mužům je asi 2 ku 1). V klinickém obraze PMBL dominuje velká nádorová masa v předním mediastinu, která poměrně rychle narůstá a u 2/3 pacientů přesahuje 10 cm v horizontálním průměru. U 30–50% pacientů může rychlý růst nádorové masy způsobit útlak horní duté žíly s klinicky závažnou symptomatologií. Většinu nemocných diagnostikujeme ve stádiu I a II, častá bývá infiltrace okolních orgánů, generalizace choroby bývá výjimečná. Rozhodující pro diagnózu PMBL je rychle a kvalitně provedená biopsie nádorové tkáně, a to nejčastěji pomocí mediastinoskopie či torakoskopie. Nádorová tkáň by poté měla být vyšetřena jak imunohistochemicky, tak i moderními metodami molekulární genetiky. PMBL se totiž vyznačuje výskytem charakteristických genetických změn, které jej odlišují od ostatních případů DLBCL. Jde zejména o změny na chromozomech 1, 2, 6, 9 a 18, které vedou k aktivaci dráhy NF-κB a JAK-STAT. Buňky PMBL mají navíc na svém povrchu redukovanou expresi MHC genů II. třídy, což koreluje se sníženým počtem

cytotoxických T-lymfocytů infiltrujících nádorovou tkáň. Tyto rysy spolu s přestavbou 16p13.13, resp. změnami genu CIITA vedou u části pacientů k snížené citlivosti na léčbu. Změny genomu a exprese jednotlivých klíčových genů se stávají zásadním prognostickým ukazatelem, který může definovat rizikové nemocné indikované k intenzivnější protinádorové léčbě. Klasické prognostické parametry totiž u PMBL selhávají, většina pacientů má aa-IPI 0 - 1 a uniformě zvýšenou hladinu LDH. V léčbě nemocných je využívána kombinace rituximabu a chemoterapie založené na antracyklinu. Intenzivními léčebnými režimy můžeme navodit až 60% kompletních remisí, jejich zvýšení na 80% a dlouhodobé přežití nemocných můžeme dosáhnout konsolidační radioterapií či vysoce-dávkovanou léčbou s autologní transplantací kmenových buněk. Relapsy PMBL obvykle nastávají v prvním roce po ukončení terapie. Jejich léčba není úspěšná a většina nemocných zmírá v důsledku progrese onemocnění. Nově testované biologické léky ovlivňující hlavní patogenetické dráhy PMBL by mohly v budoucnu zlepšit osud rezistentních a relabovaných nemocných.
Práce byla podporována granty IGA NT 11103 a IGA UP LF-2012-007

2207.

Geny JAK 2 a CIITA u primárního mediastinálního B buněčného lymfomu (PMBCL) – molekulárně cytogenetická analýza souboru 23 nemocných

Nedomová Radka, Papajík Tomáš, Urbánková Helena, Procházka Vít, Holzerová Milena, Mičková Pavla, Reptová Silva, Pikalová Zuzana, Flodr Patrik, Indrák Karel, Jarošová Marie *(Hemato-onkologická klinika, FN Olomouc; Ústav patologie FN a LF UP, Olomouc)*

Primární mediastinální B lymfom (PMBL) je samostatná podjednotka nehodgkinských lymfomů s jedinečnými patologickými, klinickými a genetickými charakteristikami, které jsou odlišné od ostatních difúzních velkobuněčných B lymfomů (DLBCL). Studium molekulární patogeneze ukázalo, že PMBL je germinálního nebo postgerminálního původu a je spojen s genetickými změnami vedoucími ke konstitutivní aktivaci klíčových genů v patozenezi PMBCL. Nejčastějšími cytogenetickými změnami u PMBL je zmnožení na chromosomech 9p, 12q a Xq a ztráta oblastí 1p, 3p, 13q, 15q a 17p. Až 50% případů má zmnožení oblasti 9p zahrnující gen JAK2 (9p24), jehož produktem je protein fosforylující transkripční faktor STAT. Nedávno byla objevena kryptická chromosomová translokace zahrnující gen CIITA (16p13.13), kódující protein HLAII. Změna byla pozorována až u 38% PMBL s nepříznivou prognosou. Cílem naší studie bylo provést molekulárně cytogenetickou analýzu (FISH s lokusově specifickými sondami pro geny JAK2 a CIITA a arrayCGH) u souboru 23 nemocných s diagnosou PMBL. Molekulárně cytogenetické vyšetření bylo doplněno imunohistochemickou analýzou s protilátkami CD10, CD23, CD15, CD30, CD20, MUM1, Bcl2, bcl6, Ki67. Vyšetřený soubor tvořilo 9 mužů a 14 žen, medián věku při diagnose byl 33 let (19-74 let). U všech nemocných byl z doby diagnosy vyšetřen metodou FISH gen JAK2, u 20 byl vyšetřen gen CIITA. Metodou arrayCGH bylo vyšetřeno 20 nemocných. Zmnožení genu JAK2 bylo prokázáno u 11/23 nemocných metodou FISH a u 8/20 metodou arrayCGH. U 6 nemocných z 11 bylo zmnožení genu JAK2 součástí komplexního karyotypu. Přestavba genu CIITA byla prokázána pouze u 2 (9%) žen. Konvenční cytogenetickou metodou byly prokázány změny u 9 nemocných (39%), metodou FISH u 15 pacientů (65%). Metodou arrayCGH byly prokázány nebalancované aberace u 11 z 20 nemocných (55%). Komplexní aberace byly nalezeny u 11 pacientů. Celkové přežití v 5-letech je 74,2% (95% CI 0,54-0,95). Celkem zemřelo 6 nemocných. Naše předběžné výsledky ukázaly zatím nižší frekvenci přestaveb genu CIITA, ale literárně shodnou frekvenci zmnožení genu JAK2 a potvrdily význam metody FISH a arrayCGH pro určení chromosomových změn u PMBL. Soubor je základem pro další genetické a klinické studie nemocných s diagnosou PMBL.
Práce je podporována grantem MZČR IGA NT 11103, LF UP 2012-007.

2211.

Primárně mediastinální difuzní B-velkobuněčný lymfom – léčebná strategie a její dlouhodobé výsledky na Hemato-onkologické klinice v Olomouci

Kapitáňová Zuzana, Procházka Vít, Kubová Zuzana, Buriánková Eva, Starostka David, Pták Jan, Adamová Dagmar, Flodr Patrik, Papajík Tomáš, Indrák Karel *(HOK; Klinika nukleární medicíny; Ústav patologie, FN a LF UP, Olomouc; Oddělení klinické hematologie, NsP, Havířov; HTO, Frýdek Místek; HTO, Slezská nemocnice, Opava)*

Primárně mediastinální difuzní velkobuněčný B lymfom (PMBCL) je relativně vzácný subtyp agresivní lymfoidní neoplázie charakterizované invazivním růstem mediastinální nádorové masy. V letech 1998 – 2010 jsme na naší klinice indikovali k léčbě celkem 41 pacientů s histologicky potvrzenou diagnózou PMBCL. Věkový medián skupiny byl 35 let (19-74 let). Většina pacientů (78%) byla iniciálně v klinickém stádiu II, nízké prognostické riziko aaIPI 0-1 mělo celkem 28 pacientů, 8 pacientů pak aaIPI 2 a jeden aaIPI 3. 65% pacientů měla LDH nad normu, u 73% byl mediastinální bulk nad 10cm. Intenzivní chemoterapeutický režim založený na antracyklinu se sekvenčním podáním vysoké dávky metotrexátu a cytosin-arabinosidu (PACEBO, IVAM, HAM) byl zvolen u 28 pacientů, 6 bylo léčeno chemoterapii ProMACE – CytaBOM a zbylých 7 pacientů dostávalo CHOP-like chemoterapii. U 24 pacientům byla chemoterapie kombinována s rituximabem. Léčebná odpověď po chemoterapii byla hodnocena v celém souboru, CR dosáhlo 22 pacientů (54%), PR bylo dosaženo u 15 (36,5%), SD/PD byla u 4 pacientů (9,5%). V skupině pacientů léčených s rituximabem bylo dosaženo CR po chemoterapii u 15 z 24 pacientů (62,5%),zatím-co ve skupině bez rituximabu bylo dosaženo CR u 7 ze 17 pacientů (41%). V hodnocení terapeutické odpovědi bylo u 20 pacientů použito 18F-FDG PET/CT. 3-leté přežití bez známek onemocnění (DFS) u těch, kteří po chemoterapii dosáhli CR bylo 86% (22 pacientů), přičemž 15 z nich bylo léčeno imunochemoterapií a zbylých 7 jen chemoterapií. Léčba byla intenzifikována autologní transplantací u 28 rizikových pacientů a 19 z nich dosáhlo CR. Celkem 15 pacientů absolvovalo lokální radioterapii pro nedosažení CR, nebo přítomnost reziduálního ložiska dle CT. 3-leté přežití bez události (PFS) u všech pacientů bylo 71%, 3-leté celkové přežití (OS) bylo 82%. Pacienti, kteří byly léčení imunochemoterapií měli vyšší 3-leté OS (p=0,0584)) ve srovnání s pacienty, kteří byly léčení bez rituximabu (95% vs 62%). Vrámci PFS nebyl mezi těmito dvěma skupinami statisticky významný rozdíl (60% vs 85%). V průběhu léčby zrelabovalo či progredovalo celkem 11 pacientů (4 v éře rituximabu). Výsledky naší terapeutické strategie potvrzují, že intenzivní chemoterapie konsolidovaná následnou autologní transplantací kmenových buněk zvyšuje u pacientů s PMBCL možnost dosažení CR a dlouhodobého přežití i v éře imunochemoterapie.
Práce byla podporována grantem IGA UP LF-2012-007 a grantem MZČR IGA NT 11103, LF UP 2012-007

2231.

Bioptická diagnostika periférneho T-bunkového lymfómu typu angioimunoblastovej lymfadenopatie

Plank Lukáš, Balhárek Tomáš, Marcinek Juraj, Mičák Jozef, Kviatkovská Zuzana, Szépe *Peter (Ústav patológie JLF UK a UNM a 2 MBC s.r.o., Martin - SVK)*

Úvod: Obraz periférneho T-bunkového lymfómu (PTCL) typu angioimunoblastovej lymfadenopatie (AILT) môže zahŕňať spektrum od včasnej interfolikulovej infiltrácie v teréne lymfatickej folikulovej hyperplázie (FH) cez progresiu infiltrácie s depléciou a atrofiou štruktúr FH po difúznu expanziu nádoru do celého orgánu. Materiál a metodika: Biopsie 30 pacientov s AILT z Lymfómového registra, v nich bol k dispozícii štandardný panel metód biopsie lymfatických uzlín (LU) a/alebo kostnej drene (KD). Imunohistochemické analýzy (IHC) zahŕňali dôkaz B- a T-znakov a CD30, CD15, CD10, bcl6, CD21 a/alebo CD23. Výsledky: A) Spolu sme hodnotili 59 biopsií, a to 39 biopsií LU alebo iného tkaniva 30 pacientov a 20 biopsií KD 11/30 pacientov. B) U 11 pacientov nebola diagnóza stanovená v 1. vyšetrenej biopsii: v biopsii LU (6 pacientov) a tonzily (1 pacienta) bola difúzna lymfoproliferáciou tvorená zmesou B- a T-buniek, resp. v biopsii KD (4 pacientov) bola ložisková lymfoproliferácia s prevahou T-buniek, s prímesou B-buniek a histiocytov. Diagnózu v 4/11 prípadov komplikovala koincidencia s Hodgkinovým lymfómom (n=1), predošlá diagnóza a liečba NHL B-pôvodu (n=2) a stav po liečbe karcinómu endometria. C) Diagnóza bola stanovená v biopsii LU (n=25), tonzily (n=4) a podkožného infiltrátu (n=1). V každej diagnostickej biopsii bola prítomná typická morfológia a fenotyp nádoru. Rozsiahle proliferácie folikulových dendritických buniek boli zreteľné v 24 prípadoch. D) V diagnostickej biopsii 29 prípadov AILT difúzne infiltrovala bioptizovaný orgán, u 10 s reziduami atrofických folikulov. Len u 1 pacienta bola infiltrácia neúplná v sprievode FH. Biopsie KD boli negatívne u 4 pacientov, u 7 pacientov sme verifikovali infiltráciu KD (spolu v 16 biopsiách – bez známok vymiznutia počas liečby), a to v rozsahu 10-70%. Závery: V súbore dominovali pokročilé štádia s difúznou AILT infiltráciou orgánov a tendenciou k disseminácii do KD, s výnimkou 1 prípadu sme nezaznamenali literárne opisované spektrum zmien AILT. Až v 1/3 prípadov sa najprv vyskytli „atypické" lymfohistiocytové proliferácie, bez čŕt FH a bez jednoznačnej diagnózy lymfómu B- alebo

T-radu. Tieto prípady sú rizikové pre možné podhodnotenie, alebo pre stanovenie mylnej diagnózy. Vtedy sme odporúčali sledovanie a rebiopsiu, ktorá v najdlhšom intervale 7 týždňov od 1. biopsie bola diagnostická.

Podporené grantovými projektami VEGA 1/0378/12 a Centrum excelencie CEPV II (IMTS 26220120036) a MBRKM (IMTS 26220220113).

TRANSPLANTACE 2

2221.

Imunogenetika alogenní transplantace krvetvorných kmenových buněk – současné přístupy a perspektivy

Mrázek František, Ambrůzová Zuzana, Petřek Martin *(HLA laboratoř, Ústav imunologie, FN, Olomouc)*

Úspěšnost alogenní transplantace krvetvorných kmenových buněk (aHSCT) je ovlivňována řadou biologických a klinických faktorů. Zásadní význam má úroveň shody mezi dárcem a příjemcem štěpu ve znacích hlavního histokompatibilního komplexu (HLA), jejíž pozitivní efekt na snížení výskytu nemoci štěpu proti hostiteli (GVHD) a celkové přežívání transplantovaných pacientů byl jednoznačně prokázán. V současné době je proto hlavním cílem imunogenetického vyšetření u aHSCT nalezení dárce s maximální shodou v HLA znacích. Primární vyhledávání dárce se zpravidla zaměřuje do nejbližší rodiny pacienta; vzhledem k vysokým nárokům na HLA shodu zde bývá nejčastějším dárcem HLA-identický sourozenec. Většina pacientů však v rodině dárce nenachází a jsou odkázáni na vyhledávání nepříbuzenského dárce v národních i zahraničních registrech (počet dostupných dobrovolných dárců se celosvětově blíží dvaceti milionům). V posledním desetiletí se enormně zvýšil zájem o poznání dalších genetických faktorů, které mohou úspěšnost aHSCT ovlivňovat; hovoříme o „nonHLA" imunogenetice aHSCT. V souvislosti s úspěšností transplantace byly již studovány četné genetické varianty imunitních genů, které jsou významné pro jednotlivé procesy aloreaktivity u aHSCT. Patří mezi ně zejména vedlejší histokompatibilní antigeny, cytokiny, adhezivní molekuly, integriny a receptory NK buněk (KIR). Přestože řada popsaných asociací nebyla v následujících studiích potvrzena, je vliv některých variant (např. polymorfismů genu pro interleukin-6) na výskyt a úspěšnost aHSCT vysoce pravděpodobný. Tato prezentace stručně přibližuje aktuální přístupy k imunogenetickému vyšetření pro účely aHSCT včetně přehledu používaných laboratorních metod k typizaci HLA systému a to na pozadí rychlého růstu známého HLA polymorfismu v celosvětové populaci. Druhým cílem je poukázat na existenci dalších (imuno)genetických faktorů, které mohou úspěšnost aHSCT rovněž ovlivňovat a naznačit možnosti jejich perspektivního využití v individualizaci přístupů u aHSCT.

Grantová podpora: IGA MZ ČR NT12454-5.

2148.

Vazebná analýza HLA -DRB 1/DQB1 ve vztahu k HSCT

Vraná Milena, Dobrovolná Marie, Sedláček Petr, Válková Veronika *(ÚHKT; II. LF UK, FN Motol, Praha)*

Transplantace hematopoetických kmenových buněk (HSCT) představuje nejen kurativní způsob léčby některých onemocnění krvetvorby, ale také adopci imunitního systému dárce příjemcem. Základním předpokladem úspěšnosti HSCT je proto míra shody v HLA systému (Human Leukocyte Antigen) mezi pacientem a jeho dárcem. HLA systém je nejpolymorfnější oblastí lidského genomu. V současné době je známo více než 7 tisíc alel HLA (I.třída HLA: 5518, II. třída HLA: 1612). Mezi lokusy HLA existuje silná vzájemná vazba (vazebná nerovnováha), zvláště pak mezi lokusy HLA II. třídy DRB1 a DQB1. U některých jedinců může být tato vazba porušena Při detekci určité alely DRB1 je v takovém případě nalezena jiná alela DQB1 než je obvyklé. U souboru 3287 jedinců (1472 pacientů, 216 sourozenců, 133 ostatních příbuzných a 1466 nepříbuzných dárců) byla provedena vazebná analýza HLA genotypu HLA-DRB1 a DQB1 lokusů. Vazba mezi DRB1 a DQB1 byla porušena u 37 (cca 1%) z nich. Mezi pacienty byla nalezena porušená vazebná nerovnováha DRB1/DQB1 u skupiny 21 osob (20 dospělí, jedno dítě), což odpovídá 1,5% . Tři pacienti s porušenou vazebnou nerovnováhou byli prokazatelně neevropského původu. U jednoho pacienta byla nalezena raritní alela DRB1 lokusu. Vhodný příbuzný dárce nebyl nalezen pro žádného z těchto 21 pacientů. Pro 13 z nich bylo konfirmováno celkem 21 potenciálně vhodných nepříbuzných dárců (MUD) v českých a světových registrech. Tito dárci byli dotestováni na úroveň určení alel (high resolution) v lokusech HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1. Pouze u dvou z nich byla nalezena shoda v DRB1 i DQB1 lokuse, žádný však nebyl kompletně shodný. Nejlepší nalezená shoda HLA u testovaných dárců byla následující: 9/10 - MUD pro tři pacienty, 8/10 pro pět pacientů, 7/10 pro dva pacienty, 6/10 pro

jednoho pacienta. HSCT byla provedena u sedmi pacientů. HLA shoda u transplantovaných byla následující: 2x 9/10, 3x 8/10, 1x 7/10, 1x 6/10. Z transplantovaných pacientů čtyři zemřeli (2 x TRM, 2 x relaps). Závěr: Frekvence výskytu porušené vazebné nerovnováhy DRB1/DQB1 v našem souboru odpovídá populačním datům uváděným pro kavkazskou populaci. U pacientů indikovaných k HSCT komplikuje nalezení vhodného dárce.

2197.

Výskyt malignit a dispenzarizace dárců krvetvorných buněk ze sledování deseti let Hematologicko-onkologického oddělení FN Plzeň a Českého Národního Registru Dárců Dřeně

Vokurka Samuel, Koza Vladimír, Jungová Alexandra, Navrátilová Jana, Svoboda Tomáš, Steinerová Kateřina, Hrabětová Marcela, Výrutová Radmila, Novák Luboš, *(Dárcovská centra - Český Národní Registr Dárců Dřeně ČNRDD, Hematologicko-onkologické odd., FN, Plzeň)*

Úvod: Dárcovství a odběry krvetvorných buněk jsou nedílnou součástí hemato-onkoogického a transplantačního programu. Dárce příbuzný i nepříbuzenský dobrovolně a po opakovaném informovaném souhlasu podstupuje rizika odběru. Péče o dárce musí vycházet z platné legislativy a doporučení a zahrnuje také povinnost řádné dispenzarizace po odběru. Růstový faktor granulopoézy filgrastim je využíván k mobilizaci před odběry periferních krvetvorných buněk a jsou polemiky o riziku rozvoje hematologických malignit. Cíl: analyzovat výskyt malignit a systém dispenzarizace dárců krvetvorných buněk. Soubor pacientů a metody: prospektivní sledování příbuzenských dárců Hematologicko-onkologického oddělení FN Plzeň a nepříbuzenských dárců Českého Národního Registru Dárců Dřeně (ČNRDD) v období 2001-2010. Výsledky: U 344 dárců ČNRDD, při sledování 753 osobo-let, byl zastižen rozvoj chronické lymfatické leukémie u jednoho dárce kostní dřeně 6 let po odběru s tím, že retrospektivně byl klon leukémie prokázán analýzou DNA ve vzorku krve dárce již v době před odběrem dřeně. U 84 příbuzenských dárců periferních krvetvorných buněk, při sledování 337 osobo-let, byly zastiženy akutní myeloidní leukémie, non-Hodgkinský lymfom, karcinom ledviny a kolorekta. Korespondující incidence hematologických malignit zde byla 593 případů, přičemž očekávaná incidence byla 143 / 100 000. Věk příbuzenských dárců byl signifikantně vyšší: 48 (16-75) vs. 31 (20-42) let, ($p<0,0001$). Významně více nedispenzarizovaných dárců bylo příbuzenských i při aktivním systému poodběrového sledování: 32% vs. 3% ($p<0,0001$). Závěr: Výskyt malignit u dárců krvetvorných buněk lze přirozeně předpokládat s tím, že u příbuzenských dárců bude riziko vyšší s ohledem na jejich obecně vyšší věk a také vyšší riziko hematologických malignit při rodinném výskytu. Vliv filgrastimu na vývoj hematologických malignit vyžaduje další analýzy a není t.č. evidentní. Spolupráce s příbuzenskými dárci v rámci dispenzarizace je problematická a omezená.

2170.

Proces řízení rizika vzniku nežádoucích událostí v JACIE akreditovaném centru a praktické výstupy u transplantačního programu

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

Řízení rizik (tzv. risk management) představuje nástroj k identifikaci, analýze, vyhodnocení sledování a hlášení pravděpodobných rizik spojených s určitou činností. V transplantačním programu to znamená dobře fungující Systém řízení kvality (SŘK) zaručující bezpečnost pro pacienta i dárce. HOO FN Plzeň je akreditováno JACIE od roku 2008 pro všechny složky programu – klinickou část (CU), separační centrum (AU) a laboratoř buněčné terapie (CPL). Tyto složky představují komplexní transplantační program se společným SŘK. Metody: podle hlášených nežádoucích událostí jsme retrospektivně za roky 2008-2011 identifikovali některé kritické body v transplantačním programu a určili rizikové faktory. Na základě techniky analýzy rizika dle ISO byl použit obecný vzorec pro kvantifikaci rizik: R = p x N, kde R je riziko, p je pravděpodobnost vzniku nežádoucí události a N vyjadřuje potenciální následky. Hodnoty N a p byly hodnoceny na škále 1-5 (1 a 5 představují minimální a maximální možný dopad výskytu rizika. Hodnota R se tak pohybuje od 1 do 25, toto rozmezí bylo rozděleno na 3 podskupiny: nízké (1-8), střední (9-16) a vysoké (17-25) riziko. Výsledky: v průběhu let 2008-2011 jsme identifikovali celkem 154 nežádoucích událostí (73 v CPL, 65 v CU a 17 v AU). V rámci CPL byly jako střední riziko vyhodnoceny: nízký počet CD34+ (16/73), labeling (7/73) a jako nízké riziko: chyby v dokumentaci (3/73), technické problémy(6/73),

pozitivní testy na sterilitu (6/73). V CU byly jako střední riziko vyhodnoceny: chyby v dokumentaci (26/65) a jako nízké riziko: technické problémy (7/65), komplikace v průběhu transplantace (6/65), komplikace po podání trombokoncentrátů(4/65) a pneumothorax po kanylaci centrální žíly (3/65). Na AU byly vyhodnoceny jako střední riziko: komplikace v průběhu aferézy(14/17) a jako nízké riziko trombocytopenie (3/17). V průběhu analýzy jsme nezaznamenali potencionální vysoké riziko nežádoucí události. Závěr: na základě ISO definované analýzy rizik jsme se pokusili monitorovat kritické body v transplantačním programu. Podle výsledků risk analýzy jsme posléze vyhodnotili adekvátnost a efektivitu identifikace rizik v rámci transplantačního programu a JACIE standard.

CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKEMIE / MYELOPROLIFERATIVNÍ ONEMOCNĚNÍ

2187.

Léčba Ph- (BCR/ABL)-negativních myeloproliferativních onemocnění s trombocytémií – doporučení CZEMP

Schwarz Jiří, Penka Miroslav *(ÚHKT, Praha; OKH, FN, Brno)*

V r. 2009 byla aktualizována a rozšířena doporučení České pracovní skupiny pro Ph- myeloproliferativní onemocnění (CZEMP) pro diagnostiku a léčbu BCR/ABL-negativních myeloproliferativních onemocnění (MPO), tj. esenciální trombocytemie (ET), polycythaemia vera (PV) a primární myelofibrózy (PMF). Východiska doporučení byla publikována in extenso v r. 2011, téhož roku byla schválena i ČHS JEP a následně byla publikována zkrácená verze. Principy léčby ET i ostatních MPO s trombocytémií (MPO-T; tj. raných stádií PMF a PV) jsou identické. Pacienti jsou stratifikováni podle přítomnosti trombotického rizika (předchozí trombózy, dalšího trombofilního stavu, mutace JAK2), přítomnosti symptomů onemocnění (obvykle mikrocirkulačních), počtu trombocytů a věku. Pouze pacienti do 65 let bez uvedených rizik s počtem trombocytů pod 1000 ´ 10^9/l jsou považováni za nízkorizikové a nevyžadují cytoreduktivní léčbu. Ostatní jsou vysokorizikoví a jsou indikováni k tromboredukci. Od věku nad 65 je možno užít potenciálně leukemogenní hydroxyureu (HU), u mladších volíme mezi anagrelidem (ANG) a interferonem-alfa (IFN). U vysokorizikových nemocných je cílem udržet trombocyty trvale pod 400, u nízkorizikových pod 600 ´ 10^9/l. Kyselina acetylsalicylová se podává u MPO-T s trombocyty < 1000 ´ 10^9/l (při vyšších hodnotách hrozí krvácení) i u všech pacientů s PV, nemají-li kontraindikaci. V případě normalizace počtu trombocytů ji lze v případě nízkorizikové ET nebo PMF vysadit, u JAK2+ pacientů je lépe ji ponechat. Diskuse: Ve světě se obdobná doporučení liší především v tom, zda je možné dlouhodobě použít HU v léčbě mladších pacientů, neboť neexistují randomizované studie s potřebným mediánem sledování minimálně 10 let, řešící sporný moment, zda je monoterapie HU leukemogenní a kancerogenní. Při absenci těchto studií nověji publikovaná doporučení britská či doporučení LeukemiaNet HU stále uvádějí jako léčbu 1. volby včetně mladých jedinců. Naopak česká (a podobně i slovenská, rakouská, skandinávská, slovinská a chorvatská) doporučení se HU obávají vzhledem k rostoucímu počtu studií, ukazující na genotoxicitu této látky in vitro i in vivo, ctíce princip non nocere. Řada studií v posledních letech poukazuje na možnost transformace MPO do akutní leukemie, spojené s delecí a mutací, event. jinou dysregulací genu TP53, klíčového pro kontrolu buněčného cyklu i pro opravu DNA.

2191.

Transformace do sekundární akutní myeloidní leukemie (sAML) u 2 pacientů s Ph-negativním myeloproliferativním onemocněním (MPO) léčených hydroxyureou, spojená se ztrátou jedné alely genu TP53 a s mutací druhé alely

Schwarz Jiří, Marková Jana, Berková Adéla, Březinová Jana, Šárová Iveta, Michalová Kyra *(ÚHKT, Praha; Centrum nádorové cytogenetiky ÚKBLD VFN a 1. LF UK, Praha)*

Úvod: Přechod do sAML u MPO je častý při primární myelofibróze (PMF), avšak vzácný u esenciální trombocytemie (ET). Narůstá počet studií, ukazujících na leukemogenicitu hydroxyurey (HU), spojenou s delecemi a mutacemi genu TP53 na chromosomu 17p. Pacienti: 1) Muž ve věku 49 let v době dg. PMF v r. 1991, od r. 1994 léčen HU, v r. 2002 s transformací do sAML. 2) Žena ve věku 70 let při dg. ET v r. 2000, s mutací V617F genu JAK2, od počátku léčená HU, v r. 2007 transformující do sAML. Metody: Analýza karyotypu kostní dřeně a interfázická FISH se sondou LSI TP53/CEP 17, real-time PCR alelická diskriminace na RNA z periferní krve s užitím LNA specifických sond pro mutaci V617F, resp. wild-type konfiguraci genu JAK2, sekvenace exonů 4-10 genu TP53. Výsledky: Po 8, resp. 7 letech monoterapie HU 1-1,5 g denně došlo u obou pacientů k transformaci do sAML, spojené se ztrátou jedné alely 17p dle FISH (delece 17p u prvního pac. v 80 % jader, u druhé pac. ztráta 17p v 70 % jader, přičemž ve 40 % jader šlo o monosomii), s průkazem mutace genu TP53 druhé alely 17p (Gly199Val, resp. Arg273His; dle sekvenace byla přítomna pouze mutovaná alela TP53 u obou pac.). U pac. 1 s PMF s původně normálním karyotypem trval vývoj od záchytu prvního blastu v periferní krvi 7 let (ale s rapidní akcelerací procesu během posledních 3 měsíců) a byl spojen terminálně

s rozsáhlými změnami karyotypu, zatímco u druhé pacientky pouhé 3 týdny a byl spojen navíc s nálezy -7 a delece 7q dle FISH. U pac. 2 narůstala nálož mutace JAK2. Oba pacienti zemřeli 6 měsíců, resp. 5 dní po dg. sAML. Diskuse: Transformace Ph- MPO do sAML je často spojená s aberacemi genu TP53. U obou našich pac. šlo o hemizygocii TP53, spojenou s mutací zbylé alely. Zatímco u pac. 1 šlo zpočátku o typickou, pozvolnou progresi PMF, která terminálně akcelerovala do sAML, případ pac. 2 s ET ukazuje jiný scénář naprosto abruptního vývoje sAML, který v žádném případě nepatří k přirozenému průběhu ET či jiných Ph-MPO. Podíl léčby HU na transformaci je suspektní u obou pacientů, vysoce pak u pac. 2. Dle výsledků kvantitativní analýzy JAK2 se u druhé pac. jednalo o transformaci původního klonu ET. Již práce Bernasconiho et al. (Leukemia 2002) poukazovala, že HU (na rozdíl od pipobromanu) indukuje sAML s delecí 17p, nepatřící k přirozenému vývoji ET. Alterace dráhy TP53 (amplifikace MDM4 s inhibicí proteinu p53, anebo mutace genu TP53) jsou patrně nejčastějším nálezem při transformaci Ph- MPO do sAML (Harutyunyan et al, NEJM 2011).

2174.

Úskalia liečby esenciálnej trombocytémie

Hatalová Antónia, Jankovičová Denisa, Mistrík Martin *(Klinika hematológie a transfuziológie, LFUK, SZU, UN, Bratislava - SVK)*

Úvod. Esenciálna trombocytémia (ET) je chronické Ph- negatívne myeloproliferatívne ochorenie, charakteristické zvýšením megakaryopoézy s trvalou trombocytózou, obvykle viac ako 1000x109/l a zvýšeným výskytom trombotických a hemoragických komplikácií. Liečba ET má byť zameraná predovšetkým na prevenciu hemoragicko-trombotických komplikácií bez zvýšenia rizika progresie alebo transformácie ochorenia. Metodika. V práci popisujeme prípad 36-ročnej ženy s ET diagnostikovanou a liečenou od roku 2006. Vzhľadom na prítomnosť kardiovaskulárnych rizikových faktorov (extrémna obezita, vrodená sdrcová chyba) a laboratórne nálezy tzv. ET špecifických faktorov – funkčných abnormalít trombocytov bola pacientka stratifikovaná do kategógie s vysokým rizikom. Prvá línia liečby interferon alpha-2a (IFN) s potrebou vysokých dávok (24 000 IU týždenne) a antiagregačná primárna prevencia (Aspirin) bola prerušená pre zlú tolerabilitu. Druhá línia, liečba anagrelidom nepriniesla spoľahlivú kontrolu trobocytémie. Pre intoleranciu (palpitácie) pri maximálnych denných dávkach (5mg) a pre existujúce kardiálne ochorenie bola liečba anagrelidom ukončená. Hydroxyurea (HU) liečba tretej línie v dávkach 2-3 g/deň, celkovo 18 mesiacov. V priebehu liečby HU sme pozorovali nehematologickú toxicitu (ulcerózne zmeny na predkoleniach), s limitáciou ďalšieho použitia HU. V období rokov 2006 – 2011 sa u pacientky žiadnou dostupnou liečebnou modalitou nepodarilo dosiahnuť optimálnu kontrolu počtu trombocytov, s oscilovaním medzi 600x109/l až 1300x109/l. Aktuálne sme sa opäť vrátili k liečbe IFN, a to v tzv. nízkych dávkach 9 IU /týždenne. Aj napriek dobrej tolerabilite liečby pri nízkych dávkach, IFN nie je efektívny v kontrole počtu trombocytov. V popise podrobnejšie rozoberáme aj hemostatický manažment stomatochirurgického výkonu (extrakcia 5 zubov), pri potvrdenej získanej koagulopatii, sekundárnom von Willebrandtovom syndróme u pacientky. Záver. Liečba ET má byť cieľavedomá a individualizovaná v súlade s rizikovou stratifikáciou. Predpokladáme, že návrat k liečbe IFN z hľadiska dlhodobej liečebnej stratégie je správnym rozhodnutím. Liečebná odpoveď je postupná, navyše, IFN je jedinou liečebnou modalitou s potenciou spomalenia progresie ochorenia.

2160.

Sekvenování druhé generace odhaluje mozaiku mutací kinázové domény BCR-ABL nacházejících se v ultranízkých hladinách u pacientů s CML v diagnóze a v průběhu léčby imatinibem

Broučková Adéla, De Benedittis Caterin, Klamová Hana, Soverini Simona, Machová Poláková Kateřina *(Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha – CZE; Department of Hematology/Oncology L.e A. Seragnoli, University, Bologna – ITA)*

Časná detekce a znalost typu mutace může mít zásadní dopad na management léčby CML pacientů. Zlatým standardem pro vyšetřování mutací kinázové domény (KD) BCR-ABL je Sangerovo sekvenování s citlivostí 10% – 20% mutace přítomné ve vzorku cDNA s minimálním počtem kopií celkového BCR-ABL transkriptu 100. Druhá generace sekvenování (NGS) umožňuje detekovat a charakterizovat mutace s citlivostí nižší než 1%. Cílem této práce bylo zjistit, zda ultrahluboké sekvenování může významně brzy detekovat klinicky relevantní mutace. Retrospektivně jsme provedli NGS u 43 vzorků periferní krve 4 pacientů,

kteří vyvinuli mutace v průběhu prvoliniové léčby imatinibem (IM) s použitím 454 technologie (Roche). Pacienti iniciálně dosáhli CCgR a 3 z nich i MMR. Všichni následně ztratili molekulární a cytogenetickou odpověď v souvislosti s BCR-ABL mutacemi. Kromě vyšetřování vzorků v době diagnózy, jsme zařadili vzorky po zahájení léčby IM v době redukce BCR-ABL transkriptu a fluktuace hladiny v oblasti hodnot 0.01% - 0.1% (pac. 1, 2 a 3), která trvala 10, 25 a 22 měsíců. Po nárůstu hladiny BCR-ABL nad hodnoty 0.1% byly mutace detekovány Sangerovým sekvenováním (pac. 1 - M351T, F359V a L273M; pac. 2- M351T; pac. 3 - M244V a F359V; pac. 4 - L387M). Pro porovnání detekce mutací v ultranízkých hladinách jsme analyzovali cDNA kódující KD c-ABL u 5 zdravých jedinců. NGS data byla vyhodnocována pomocí softwarů AVA (Roche) a NextGene (Softgenetics). V průměru bylo detekováno 200 variant v hladinách 0.01% - 1% v každém analyzovaném vzorku, včetně vzorků zdravých jedinců. V době diagnózy a v průběhu molekulární odezvy na léčbu IM byly detekovány klinicky relevantní mutace M351T (pac.1) a M244V (pac. 3) v hladinách nižších než 1%. Mutace byly v těchto nízkých hladinách detekovány i u zdravých jedinců. Ani v jednom čtení nebyly detekovány mutace F359V (pac. 1 a 3), L273M (pac.1) a L387M (pac. 4) v době diagnózy a v době molekulární odpovědi, a ani u zdravých jedinců. Mutace v hladinách vyšších než 1% byly u pacientů 1, 2 a 3 detekovány pomocí NGS 2, 3 a 16 měsíců dříve než odhalilo Sangerovo sekvenování. Naše preliminární data ukazují, že v KD BCR-ABL se již od diagnózy nachází mozaika nízkohladinových mutací, která byla zjištěna i v KD c-ABL u zdravých dárců. V závislosti na jejich relativní způsobilosti přežít účinek terapie imatinibem, pouze některé typy mutovaných klonů budou mít schopnost expandovat a způsobit klinickou rezistenci. Podporováno MZČR IGA NT11155

2220.

U pacientů s chronickou myeloidní leukemií (CML) s dlouhodobou toxicitou imatinibu (IM) postačuje k udržení kompletní molekulární odpovědi (CMR) nižší dávkování

Faber Edgar, Gazdová Jana, Rožmanová Šárka, Divoká Martina, Mičová Kateřina, Friedecký David, Adam Tomáš, Jarošová Marie, Indrák Karel *(Hemato-onkologická klinika FN a LF UP, Olomouc; Laboratoř dědičných metabolických poruch FN a LF UP, Olomouc)*

Úvod: Pokračování léčby IM je doporučeno u všech nemocných s CML s optimální odpovědí na léčbu. Ze studií pacientů s CMR je známo, že asi 40% z nich udrží tuto odpověď i po vysazení IM při mediánu sledování tří let. O výsledcích nemocných s CML a dosaženou CMR po IM, u nichž bylo nezbytné redukovat léčbu pro toxicitu, nejsou dostatečné informace. Cíl: Zhodnotit možnost snížení dávky IM u pacientů s dlouhodobou toxicitou léčby a dosaženou CMR. Metody: Retrospektivní studie. Charakteristika souboru: 46 pacientů (25,3%) ze 182 nemocných léčených IM v 1. nebo 2. linii s délkou sledování v mediánu 42 resp. 93 měsíců dosáhlo CMR. U 16 (34,8%; 12 žen a 4 muži ve věku 26-67 let (průměr m=51 let) z nich byla redukována dávka IM pro dlouhodobé nežádoucí účinky. Šlo zejména o otoky víček, subkonjunktiválním hemorhagie, svalové křeče a dyspepsie s relativně nízkou intenzitou, která však byla nemocnými při chronickém průběhu špatně tolerovatelná. Dvakrát byla dávka IM redukována pro hematologickou toxicitu ještě před dosažením CMR. Sokalovo skóre bylo nízké u 8, střední u 2, vysoké u 4 a neznámé u 2 pacientů. U 3 nemocných byl IM vysazen, 5 užívalo 400mg obden, 5 pacientů 400mg 2-5x týdně, režimy 200 a 300mg denně a 300mg 5x týdně byly použity u 3 pacientů. Hladiny IM se během standardní a redukované léčby výrazně nelišily. Délka trvání CMR byla u 16 nemocných 19-123 (m=62,9) měsíců, délka redukované léčby 6-72 (m=30,7) měsíců. Výsledky: U 9 pacientů trvá CMR, u 4 pacientů úroveň MR kolísá bez ztráty velké MR (MMR). U dvou pacientů po vysazení IM došlo ke ztrátě MMR, ale CMR byla obnovena sníženou dávkou IM. Pouze v jednom případě bylo nezbytné pro ztrátu MMR obnovit standardní dávkování IM. Pokaždé došlo ke zmírnění toxicity léčby. Závěr: CMR lze bezpečně a účinně udržet nižšími dávkami IM u naprosté většiny nemocných. I když lze předpokládat, že u necelé poloviny nemocných by bylo možné léčbu přerušit úplně, existuje pravděpodobně subpopulace pacientů, u níž bude možné udržet CMR nižší dávkou IM se současným zmírněním dlouhodobých nežádoucích účinků léčby a léčebných nákladů. Podpořeno granty IGA MZ ČR NT12218-4/2011 a UP LF-2012-007.

2141.

Inhibítory tyrozínkináz v liečbe molekulového relapsu chronickej myelocytovej leukémie po transplantácii krvotvorných buniek

Slezáková Katarína, Sniská Zuzana, Bojtárová Eva, Demečková Eva, Mistrík Martin
(Klinika hematológie a transfuziológie LFUK a UNB, Bratislava – SVK)

Úvod: Alogénna transplantácia krvotvorných buniek ostáva naďalej jediná kuratívna liečba v chronickej a akcelerovanej fáze chronickej myelocytovej leukémie (CML). Od autológnej TKB sa pred dostupnosťou imatinibu očakávalo predĺženie prežívania. Pri relapse po alogénnej TKB sa môže použiť infúzia darcových lymfocytov (DLI), s rizikom navodenia reakcie štepu proti hostiteľovi a dreňovej aplázie. Referujeme skúsenosti s TKI pri relapse CML, ktoré môžu navodiť remisiu bez rizika vzniku GvHD. Metóda: Retrospektívna analýza súboru pacientov s molekulovým relapsom CML po alogénnej a autológnej transplantácii krvotvorných buniek liečených TKI. Súbor tvorí 11 pacientov, 6 mužov a 5 žien. Priemerný vek v čase diagnózy v sledovanom súbore je 37,9 rokov (24 – 57 rokov). Relaps po alogénnej TKB malo 6 pacientov, po autológnej 5 pacienti. DLI sme použili u 2 pacientov, 9-ti dostávali v prvej línii imatinib. Dasatinib v 2.línii dostali 4 pacienti a nilotinib 2 pacienti. Výsledky: V čase analýzy žije 9 pacientov: 7 s kompletnou molekulovou remisiou a 2 pacienti dosiahli veľkú molekulovú remisiu. Exitovali 2 pacienti: 1 pacientka v kompletnej molekulovej remisii počas liečby imatinibom na karcinóm pľúc a 1 pacient na blastovú fázu CML. Pre toxicitu museli prerušiť liečbu TKI 2 pacienti. U 1 pacienta liečeného dasatinibom sa vyskytol pleurálny výpotok, ktorý sa neobnovil pri redukovanej dávke, a je vo veľkej molekulovej remisii. U 1 pacientky bola prítomná hepatotoxicita CTC 3.stupňa po imatinibe a pankreatitída po nilotinibe, užíva dasatinib a je v kompletnej molekulovej remisii. Záver: TKI a DLI dosiahli u väčšiny pacientov s relapsom CML po TKB dlhodobé prežívanie bez choroby. Pri suboptimálnej odpovedi na imatinib je k dispozícii TKI 2.generácie - dasatinib a nilotinib.

VARIA

2168.

Postavení kardiálních biomarkerů při hodnocení kardiotoxicity v hematoonkologii – přehled a vlastní zkušenosti na 100 pacientech

Horáček Jan M., Jebavý Ladislav, Vašatová Martina, Tichý Milo, Pudil Radek, Žák Pavel, Jakl Martin, Malý Jaroslav *(KVVL, FVZ UO; II. interní klinika - OKH; ÚKBD, FN a LF UK; KIO, LF UK, Hradec Králové)*

Cíl: Sledování kardiotoxicity konvenční chemoterapie (CHT) obsahující antracykliny a vysokodávkované chemoterapie (HD-CHT) s následnou transplantací krvetvorných buněk (TKB) pomocí sady kardiálních biomarkerů – glykogenfosforyláza BB (GPBB), kardiální typ proteinu vázajícího mastné kyseliny (H-FABP), kardiální troponin I (cTnI), CK-MB mass, myoglobin. Metodika: Do studie bylo zařazeno celkem 100 pacientů – v podstudii 1 bylo 47 pacientů s nově dg. akutní leukemií – 24 pacientů léčených konvenční CHT obsahující antracykliny (celková kumulativní dávka 463,2±114,3mg/m^2) a 23 pacientů léčených HD-CHT s následnou TKB. Kardiální biomarkery byly měřeny před léčbou (před CHT/HD-CHT), 1 den po první a poslední CHT s antracykliny v 1. skupině; 1 den po HD-CHT a 1 den po TKB ve 2. skupině. V podstudii 2 bylo 53 pacientů transplantovaných pro různé hematologické malignity. Kardiální biomarkery byly měřeny 1 den po HD-CHT a 1 den po TKB. Výsledky: V podstudii 1 byly před CHT/HD-CHT všechny biomarkery v referenčním rozmezí. Byly zjištěny významné elevace GPBB (nad 7,30μg/l) u 4 (16,7%) pacientů po první CHT a u 5 (20,8%) pacientů po poslední CHT s antracykliny. Po HD-CHT a po TKB došlo k významnému zvýšení GPBB u 5 (21,7%) pacientů. U 2 (8,3%) pacientů došlo ke zvýšení cTnI (nad 0,40μg/l) po první a poslední CHT s antracykliny. Oba pacienti s pozitivitou cTnI měli zvýšenou GPBB. Ostatní kardiální biomarkery zůstaly v referenčním rozmezí během studie. V podstudii 2 byly zjištěny významné elevace GPBB u 8 (15,1%) pacientů po HD-CHT a u 9 (17,0%) pacientů po TKB. U 1 pacienta (1,9%) došlo k mírnému vzestupu H-FABP (nad 4,50 μg/l) po TKB. Ostatní biomarkery zůstaly v referenčním rozmezí. Byla zjištěna korelace mezi elevací GPBB a poruchou diastolické funkce LK ($r = 0,603$; $p < 0,0001$). Závěry: Naše výsledky na 100 pacientech léčených pro hematologické malignity naznačují, že stanovení GPBB by mohlo být užitečné pro časnou diagnostiku kardiotoxicity konvenční CHT obsahující antracykliny i HD-CHT s následnou TKB. U asymptomatických pacientů jsou abnormální kardiální nálezy, včetně elevace kardiálních biomarkerů, považovány za projev akutní subklinické kardiotoxicity. Není jasné, zda tyto akutní změny budou předpovídat rozvoj kardiomyopatie v budoucnosti. Další studie na větších počtech pacientů a delší sledování budou nezbytné k vymezení role nových biomarkerů při hodnocení kardiotoxicity v hematoonkologii.

Podpořeno z výzkumného záměru MO 0FVZ0000503, RO 1011 a MZO 00179906.

2194.

Jsme oprávněni zahrnout pacienty s nepříbuznými buněčnými klony s del(5q) a trisomií 8 do 5q- syndromu?

Neuwirtová Radana, Zemanová Zuzana, Vozobulobá Věra, Jonášová Anna, Šponerová Dana, Nováková Ludmilla, Čermák Jaroslav, Mašková Zuzana, Červínek Libor, Kessler Petr, Vondráková Jana *(1. interní klinika; Centrum onkogenetiky, VFN, Praha; Hematologická klinika, FN, Plzeň; ÚHKT;Thomayerova FN, Praha; Hematologická klinika, FN, Brno; Hematologické oddělení, Nemocnice, Pelhřimov; Hematologická klinika, FN, Olomouc)*

Úvod: Pomocí dotazníků s klinickými a laboratorními daty včetně určení procenta nelobulizovaných megakaryocytů a včetně podrobného cytogenetického vyšetření, jsme analyzovali 69 pacientů s izolovanou delecí dlouhých ramen chromosomu 5 z několika českých hematologických center. Čtyřicet tři pacientů splňovalo kriteria 5q- syndromu: izolovaná del(5q), makrocytární anémie, normální nebo vyšší počet destiček, nelobulizované megakaryocyty, hypoplastická erytropoeza a méně než 5% blastů ve dřeni. U čtrnácti ze 43 pacientů byly při konvenčním cytogenetickém vyšetření nalezeny vedle buněčného klonu s del(5q) současně nepříbuzné buňky s trisomií chromosomu 8. Položili jsme si otázku, zda se prognoza a průběh onemocnění pacientů s nepříbuznými klony s del(5q) a trisomií 8 liší od typického 5q- syndromu. Metoda: U všech nemocných byla vyšetřena klinická a základní laboratorní data. Nálezy konvenčního G-pruhování byly ověřeny metodou interfázní FISH

s lokus specifickou sondou pro oblast 5q31 a alfa satelitní sondou pro centromeru chromosomu 8 (Abbott Vysis). Výsledky: Nález nepříbuzného klonu s trisomií 8 byl metodou I-FISH potvrzen u šesti nemocných ze 14. U ostatních osmi pacientů se jednalo o neklonální aberace a/nebo nálezy pod hranicí cut-off (2,5%). U pěti z celkového počtu 6 pozitivních případů jsme nenašli rozdíl v klinických, laboratorních datech a v benigním průběhu onemocnění od nemocných s typickým 5q- syndromem. Pouze jedna pacientka neměla typické lobulizované megakaryocyty a klon s +8 byl silnější (40,1% buněk) než klon s del(5q) (22% buněk). Tato pacientka se postupně zhoršovala, počty destiček klesaly a do roka zemřela. Závěr: U šesti ze 43 pacientů s 5q- syndromem (13%) byla potvrzena přítomnost dalšího nepříbuzného klonu s trisomií 8. U pěti z nich, kde byl klon +8 slabší než klon del(5q) (7,0-18,0% versus 41,5- 67,5%), nebyl rozdíl v klinických a laboratorních datech, ani v průběhu onemocnění ve srovnání s pacienty s typickým 5q- syndromem se samostatnou del(5q). U nemocné s prevalencí +8 klonu nad del(5q) klonem není diagnoza 5q- syndromu oprávněná.

2132.

K dalším méně známým a nově popsaným maturačním asynchroniím leukemických buněk

Smetana Karel *(Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha)*

Jak je již dlouho známo, jednou z vlastností krevních maligních buněk jsou jejich maturační asynchronie, které jsou často označovány jako dysplastické změny. Patří sem urychlené vyzrávání jader proti cytoplasmě, předčasné vyzrávání nukleolů ve srovnání s jádrem a naopak. Tyto abnormality jsou často exprimovány při poruchách biosyntetických procesů jednotlivých jaderných kompártmentů a mohou mít za následek zvýšenou, či sníženou proliferační aktivitu nebo i navození apoptotického procesu. Méně známá je funkční asynchronie několika nukleolů v jednom a témže jádře většinou nezralých leukemických buněk. Současné zdokonalování mikroskopických metod na úrovni jednotlivých buněk včetně počítačového zpracování pak ukázalo další poruchy ve vyzrávání a diferenciaci krevních maligních buněk a to mnohdy v souvislosti s cytostatickou terapií. Počítačovou obrazovou denzitometrií byla zjištěna perzistence nízké koncentrace DNA při jaderné membráně ve zrajících leukemických lymfocytech i granulocytových prekurzorech. V malých leukemických lymfocytech nedochází vždy ke kondenzaci DNA v perinukleolárním heterochromatinu. Oba tyto fenomeny ukazují na možnost «restimulace» těchto buněk k proliferaci. Přečasná translokace některých nukleolárních proteinů odhalila stárnutí leukemických myeloblastů bez možnosti další diferenciace a maturace. Neobvykle vysoká koncentrace RNA a «zmrazení RNA v nukleolech» pre-apoptotických buněk je expresí inhibice transportu této nukleové kyseliny do cytoplasmy a tím i redukce proteosyntetického aparátu buňky. Podobně jako «klasické» i nově odkryté maturační asynchronie přispívají k abnormalitě některých leukemických buněk. Nejsou jistě specifické, ale jsou více exprimovány a tím více nápadné. Vyžadují však určitý metodický přístup pro jejich vizualizaci. Není také vyloučen jejich podíl na efektu ať již pozitivním, či negativním antileukemické léčby. Je také jisté, že další objasňování maturačních a diferenciačních asynchronií leukemických buněk příspěje k poznávání jejich složité biologie.

Studie byly prováděny s částečnou podporou VZ 000237360 MZd a podporou pracovníků Klinického úseku ÚHKT, kterým náleží poděkování autora sdělení.

2215.

Lipozomálny cytarabín v liečbe CNS leukémie

Al Sabty Firas, Demečková Eva, Mistrík Martin *(Klinika hematológie a transfuziológie, LFUK, SZU a UNB; Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava - SVK)*

Úvod: Hematologické neoplázie často komplikuje postihnutie centrálneho nervového systému (CNS) – meningov, mozgu a predĺženej miechy. Prevencia, pružná diagnostika a správna liečba týchto komplikácií výrazne ovplyvňujú vyhliadky chorého na dlhodobé prežitie a dobrú kvalitu života. Cieľ: zhodnotiť efektívnosť a bezpečnosť intratekálne lipozomálneho cytarabínu (LC; DepoCyte) v liečbe CNS leukémie, namiesto pôvodných cytostatík (AraC + MTX + dexametazón). Metódy: súbor pacientov tvorí 19 pacientov s CNS leukémiou, ktorí boli liečení LC na Klinike hematológie a transfuziológie v Bratislave, v období od októbra 2008 do Júna 2010. Medián veku v čase diagnózy bol 29 rokov (rozmedzie 19-63 rokov), 12 (63%) mužov a 7 (37%) žien. 14 (74%) pacientov malo akútnu lymfoblastovú leukémiu (ALL), 4 (21%) pacientov malo akútnu myeloblastovú leukémiu (AML)

a 1 (5%) pacient mal mnohopočetný myelóm (MM). Výskyt infiltrácie CNS bolo 3 (16%) de novo, 8 (42%) v priebehu CHT, 4(21%) po ukončení CHT a 4 (21%) po alogénnej transplantácii krvotvorných buniek (TKB). V prípade relapsu, 12 (57%) pacientov malo izolovaný CNS relaps a 9 (43%) pacientov malo systémový + CNS relaps. LC bol aplikovaný intratekálne v dávke 50 mg á 14 dní + Dexamethazon 4mg 3x denne p.os. (3-5 dni) ako prevencia arachnoiditídy. Výsledky: 14/19 (74%) pacientov dosiahlo kompletnú remisiu (KR) v CNS, 9 (47%) po 1. cykle, 2 (10%) po 2. cykle, 1 (5%) po 3. cykle a 2 (10%) po 4. cykle. Iba 2 (11%) pacienti mali CNS relaps po liečbe LC. Nežiaduce účinky boli nasledovné: 16% cefalea, 11% chemická arachnoitída, 5% anizokória, 5% epilepsia, 5% diplopia, 5% kôrová slepota s atrofiou nervus optici, 5% intrakraniálna hypertenzia. 3-ročné celkové prežívanie (OS) bolo u všetkých pacientov 31%. Medián prežívania bol 17 mesiacov (95% CI = 11-22 mesiacov). Pacienti s izolovaným CNS relapsom mali lepšie prežitie (3-ročné OS =38%) ako tí s kombinovaným relapsom (CNS + kostnej drene) (3-ročné OS=25%) (P=0.43). Záver: liečba LC je účinná (> 70 % KR) s dobrou tolerabilitou, ale s individuálnym výskytom nežiaducich účinkov u ťažko predliečenej populácie pacientov. V porovnávaní s konvenčnou intratekálnou liečbou LC má dlhšiu cytotoxickú aktivitu, menší počet aplikácií lieku (každé 2 týždne), čo má za následok znížené riziko traumatických lumbálnych punkcií a zlepšenie kvality života.

POSTEROVÁ ČÁST

OŠETŘOVATELSTVÍ

P1/ 2164.
Edukácia pacienta s diagnózou mnohopočetný myelóm
Machová Božena, Babinská Ľubomíra, Bizíková Tatiana, Bateľová Adriana, Šípková Katarína *(Národné centrum hemostázy a trombózy, Klinika hematológie a transfuziológie, UN Martin – SVK)*

Nádorové ochorenia patria medzi najobávanejšie civilizačné choroby a stávajú sa vážnym celospoločenským problémom. Ich výskyt je podmienený kvalitou životného a pracovného prostredia a životným štýlom obyvateľstva. Nemalú pozornosť si zasluhujú hematoonkologické ochorenia, medzi ktorými sa mnohopočetný myelóm radí na druhé miesto. Samotné ochorenie a aj liečba vyvoláva neistotu, strach, obavy z budúcnosti, a preto je dôležité, aby pacienti mali dostatok adekvátnych informácii, ktoré im pomôžu lepšie zvládnuť problémy súvisiace s ochorením a jeho liečbou. Z toho dôvodu sa edukácia pacienta stáva neoddeliteľnou súčasťou liečby a je zameraná na rozšírenie vedomostí a získanie praktických zručností pacienta v súvislosti s ochorením a jeho liečbou. Špecifiká edukácie pacienta s diagnózou mnohopočetný myelóm sú rozpracované z pohľadu sestry.

CHRONICKÁ LYMFOCYTÁRNÍ LEUKEMIE

P2/ 2171.
Zvýšená exprese mRNA pro fibroblastový růstový faktor 2 u pacientů s chronickou lymfocytární leukemií a vysokou expresí CD38
Vrbacký Filip, Nekvindová Jana, Jiruchová Zuzana, Vroblová Vladimíra, Šimkovič Martin, Painuly Utkarsh, Malý Jaroslav, Smolej Lukáš *(II. interní klinika – OKH, Ústav klinické biochemie a diagnostiky, a Ústav klinické imunologie a alergologie, FN a LF UK, Hradec Králové)*

Výsledky studií provedených v posledních letech ukazují, že na patogenezi chronické lymfocytární leukemie (CLL) se může významně podílet angiogeneze. Jedním z důležitých cytokinů účastnících se tohoto procesu je fibroblastový růstový faktor 2 (FGF-2), jehož zvýšené množství v séru/plazmě pacientů s CLL bylo již dříve prokázáno. Údaje týkající se exprese FGF-2 samotnými maligními buňkami však chybí, stejně jako analýzy vztahu k prognostickým parametrům či klinickému průběhu. Proto jsme stanovili množství transkriptu pro FGF-2 v separovaných CD19+ buňkách 49 neléčených pacientů s CLL (medián věku 64 let, nízké/střední/vysoké riziko dle Raie 13/19/17). Zároveň byla provedena analýza exprese transkriptu genu NUDT6, který je kódován na komplementárním řetězci DNA a s genem pro FGF-2 se částečně překrývá. Může tedy působit jako antisense molekula RNA postranskripčně ovlivňující míru syntézy proteinu FGF-2. Pro normalizaci rozdílů v koncentraci templátu mezi jednotlivými vzorky byl použit transkript kontrolního genu HPRT1 (hypoxanthin-guanin-fosforibosyltransferáza 1). Exprese FGF-2 se u analyzovaných vzorků lišila v rozsahu 5 řádů. Exprese NUDT6 byla naopak velmi stabilní a lišila se pouze v rozsahu 1 řádu. Exprese FGF-2 tak patrně není u CLL ovlivněna postranskripční regulací antisense molekulou transkriptu NUDT6. Byl zjištěn signifikantní vztah mezi zvýšenou expresí transkriptu pro FGF-2 a expresí CD38 ($n = 46$, $p = 0{,}009$). Závislost mezi množstvím mRNA pro FGF-2 a nemutovaným IgVH ($n = 38$, $p = 0{,}463$), ZAP-70 ($n = 45$, $p = 0{,}705$), stádiem dle Raie (0 vs. I-IV; $n = 49$, $p = 0{,}314$) či průběhem onemocnění (stabilní vs. progresivní; $n = 49$, $p = 0{,}703$) nebyla prokázána. Naše pilotní studie ukazuje, že exprese FGF-2 v B lymfocytech pacientů s CLL je variabilní, avšak zřejmě není ovlivněna postranskripční regulací antisense molekulou NUDT6. Zvýšená exprese FGF-2 byla spojena s vyšší expresí CD38, což by mohlo naznačovat souvislost s biologickou agresivitou onemocnění. Na základě těchto dat je tedy vhodný podrobnější výzkum v této oblasti.
Tento výzkum byl realizován s podporou grantu IGA MZ ČR NT/13412.

P3/ 2212.
Exprese CD223, CD49d a CD31 u nemocných s chronickou lymfocytární leukemií – pilotní studie
Vroblová Vladimíra, Smolej Lukáš, Šimkovič Martin, Schmitzová Daniela, Krejsek Jan *(Ústav klinické imunologie a alergologie, II. Interní klinika, Oddělení klinické hematologie, LF a FN, Hradec Králové)*

Úvod: CLL má mimořádně různorodou prognózu. V současnosti jsou hledány nové prognostické faktory, které by byly schopné určit rizikové nemocné, nejlépe již v době diagnózy s cílem optimalizace léčebného přístupu. Lymfocyty CLL proliferují v prostředí kostní dřeně/mízních uzlin a jsou rezistentní k apoptóze in vivo, ale v buněčných kulturách rychle podléhají apoptóze. Signály přežití tedy získávají CLL buňky z mikroprostředí (MP), které hraje zásadní roli v biologii CLL. Mezi ukazatele aktivace MP u CLL patří exprese CD49d (alfa-4 integrin) regulující adhezi buněk na extracelulární matrix; dále CD31 (PECAM-1), ligand pro CD38. Exprese CD223 (LAG-3) byla metodou DNA mikročipů a RT-PCR identifikována jako prediktor klinického průběhu CLL. Cílem této pilotní práce bylo stanovit expresi znaků CD49d, CD31 a CD223 a zhodnotit souvislost s ostatními prognostickými ukazateli (exprese CD38, ZAP-70, mutační stav IgVH) a klinickým průběhem CLL. Nemocní a metodiky: V letech 2011-2012 jsme stanovili expresi znaků ZAP-70, CD38, CD49d, CD31 a CD223 u 30 nemocných s neléčenou CLL (23 mužů, 7 žen, medián věku: 63 let, rozmezí: 41-79, Raie I-IV v 20%, U-IgVH geny v 58%, ZAP-70+ v 60% a CD38+ v 27 %). Stabilní/progredující onem. v době odběru bylo přítomno u 16, resp. 14 nemocných. Exprese znaků byla stanovena průtokovou cytometrií povrchovým (CD38,CD31,CD49d,CD223) nebo intracelulárním (ZAP-70) značením v plné krvi. Výsledky: Exprese CD49d byla velmi variabilní (průměr: 25,32 ± 36,6 %). Znak CD31 byl exprimován stabilně ve vysokých hodnotách (96,68 ± 6,54 %). Naopak CD223 byla u většiny nemocných nízká (2,23 ± 5,64 %). Exprese CD31 byla statisticky na hranici významnosti vyšší u pacientů se stabilním vs. progresivním onem. (99,32 ± 1,01% vs .93,67 ± 2,33%; p=0,056). Exprese znaku CD223 byla statisticky významně vyšší u pacientů se stabilním onem. v porovnání s pacienty v progresi (3,59 ± 8,00% resp. 0,96 ± 0,94%; p=0,033) a byl trend k vyšší expresi u nemocných ve stádiu 0 dle Raie v porovnání se stádii I-IV (1,63 ± 0,91% vs. 2,48 ± 6,73%; p=0,063). Nebyla zjištěna významná korelace CD223, CD49d či CD31 s expresí CD38 či ZAP-70. Závěr: CLL lymfocyty nemocných se stabilním onem. Vykazují nižší expresi znaku CD31 a zároveň vyšší expresi znaku CD223. Korelace těchto nových ukazatelů s expresí znaku CD38 a ZAP-70 v našem souboru nebyla prokázána. Vzhledem k malému počtu zařazených nemocných je nutné vyčkat výsledků u rozšířeného souboru. Podpořeno IGA NT/13412, MZČR.

P4/ 2140.

Detekcia mutácii génu TP53 u pacientov s B-CLL

Piačková Barbora, Leitnerová Michaela, Čermák Martin, Copáková Lucia *(Oddelenie lekárskej genetiky, NOÚ Bratislava – SVK)*

Úvod: Chronická lymfocytová leukémia (CLL) je lymfoproliferatívne ochorenie s vysoko variabilným klinickým priebehom. Podľa niektorých analýz až 50% pacientov prežíva bez akejkoľvek liečby. Medzi najvýznamnejšie prognostické faktory patrí prítomnosť chromozómových aberácii (del13q14, del17p13, del11q22 a trizómia 12), mutačný status génu pre ťažký reťazec imunoglobulínu (IgVH), expresia CD38 a expresia ZAP-70. V poslednej dobe sa stále podrobnejšie sleduje aj prítomnosť mutácii génu TP53 a ich prípadný nepriaznivý vplyv na prežívanie s diagnózou B-CLL. Delécie a/alebo mutácie v géne TP53 sa vyskytujú u 10-15% B-CLL pacientov a vedú k agresivnému priebehu ochorenia a intenzifikácii terapie. Cieľom práce bolo stanovenie prítomnosti delécii a/alebo mutácii v géne TP53 u pacientov s CLL, ktorý ešte nepodstúpili liečbu. Metódou FISH a MLPA sme analyzovali súbor s celkovým počtom 90 pacientov. Na analýzu mutácií v géne TP53 boli použité metódy sekvenačnej analýzy a HRMA (High resolution melting analysis). Výskyt mutácii v géne TP53 v priebehu ochorenia a počas liečby sme sledovali u 2 pacientov. Zo súboru 90 pacientov s diagnózou B-CLL bolo celkovo identifikovaných 9 rôznych mutácii (8 missense a 1 nonsense) u 7 (8%) pacientov. U 14 (16%) bola identifikovaná chromozómová aberácia del17p a 5 z nich malo aj mutáciu v géne TP53 a tiež aj del17p. U dvoch pacientov sme zaznamenali dokonca až dve patologické mutácie v géne TP53. Nízky percentuálny záchyt je pravdepodobne spôsobený malým počtom pacientov vo vyšetrovanom súbore. Záver: Podľa najnovších pokynov by malo byť vyšetrovanie mutácii v géne TP53 štandardom pre posúdenie liečby prípadne alogénnej transplantácie kostnej drene a na základe výsledkov jednotlivých chromozómových abnormalít a TP53 mutačného statusu aj zaradenie pacienta do „ultra high risk – CLL“ skupiny.

P5/ 2137.

Inhibice kinázy Chk1 senzitivizuje buňky leukemií a lymfomů s mutacemi p53 na chemoterapeutika

Zemanová Jana, Šebejová Ludmila, Hylse Ondřej, Paruch Kamil, Pospíšilová Šárka, Trbušek Martin *(Středoevropský technologický institut - CEITEC; IHOK, FN; Ústav chemie, MU; Mezinárodní centrum klinického výzkumu, FN u svaté Anny, Brno)*

Mutace v genu TP53 se vyskytují u hematologických malignit méně často než u solidních nádorů, avšak jejich přítomnost je spojena s velmi nepříznivou prognózou, včetně silné rezistence na terapii. Jednou z nadějných možností eliminace těchto agresivních nádorových buněk je koncept syntetické letality založený na inhibici kinázy Chk1. Po této inhibici se předpokládá inaktivaci všech tří kontrolních bodů buněčného cyklu - tedy G1/S (mutace p53), S a G2/M (oba inhibice Chk1) – což by mělo vést k neregulované buněčné proliferaci následované mitotickou katastrofou a smrtí buňky. Možnost této syntetické letality jsme testovali u 14 buněčných linií, z nichž 10 mělo mutaci a/nebo deleci genu TP53. Všechny linie byly odvozeny od B-buněčných malignit (9 x lymfom, 5 x leukémie). Linie byly kultivovány v 96-ti jamkových deskách (50 000 buněk/jamku); polovina desky byla předošetřena (2 h) inhibitorem Chk1 (SCH900776) (200 nmol/l) a následně byla aplikována koncentrační řada fludarabinu, cytarabinu nebo gemcitabinu. Tato nukleosidová analoga byla aplikována ve čtyřech koncentracích a buňky byly kultivovány 72 h. Rozmezí koncentrací všech tří cytostatik bylo optimalizováno pro každou linii zvlášť podle její citlivosti. Fludarabin byl aplikován v rozmezí 20-0,125 μg/ml, cytarabin 1,6 μg/ml – 0,4 ng/ml a gemcitabin 25-0,25 ng/ml. Viabilita buněk na konci kultivace byla stanovena pomocí reagencie WST-1 (Roche). Inhibitor samotný působil na buňky jen minimálně (pokles viability do 90%) nebo vůbec. Viditelná senzitivizace prostřednictvím inhibice Chk1 (vždy alespoň u dvou sousedních koncentrací cytostatika) byla pozorována následovně: pro fludarabin a cytarabin vždy u tří linií (všechny s mutací v p53), a pro gemcitabin u pěti linií (z nichž čtyři nesly mutaci v p53). Nejlepšího výsledku bylo tedy dosaženo pro gemcitabin, což je v souladu s očekáváním, neboť toto cytostatikum je v současné době v klinických testech s inhibitorem SCH900776 právě pro B-buněčné lymfomy. Jasný senzitivizující efekt byl celkově pozorován u 50 % (7/14) linií, přičemž 86 % z nich (6/7) neslo mutaci v p53. Naše výsledky ukazují, že inhibice kinázy Chk1 skutečně může vést k senzitivizaci vysoce agresivních buněk leukémií a lymfomů s mutacemi p53 na cytostatika. Koncept syntetické letality je zajímavý a nadějný přístup pro možnou budoucí léčbu hematoonkologických pacientů s mutacemi p53. Práce byla podpořena projektem MUNI/A/0784/2011 a CZ.1.07/2.3.00/20.0045 a FNUSA-ICRC (CZ.1.05/1.1.00/02.0123).

LABORANTSKÁ SEKCE

P6/ 2127.
Raritní extrémní eosinofilní syndrom v době diagnózy Hodgkinova lymfomu
Matuška Milan, Mikošková Adéla, Ligová Alexandra, Ďuraš Juraj, Richterová Petra, Zuchnická Jana, Urgasová Alena, Gumulec Jaromír *(OKH; Ústav klinické hematologie, FN, Ostrava)*

Hodgkinův lymfom může v době vzniku nemoci u částí pacientů provázet eosinofilie v periferní krvi. Prezentujeme kasuistiku 20leté ženy, u které po úrazu hrudníku po pádu došlo k náhlému vzniku městnaného srdečního selhání pro parciální rupturu závěsného aparátu mitrální chlopně. Při vyšetření byl prokázán raritní eosinofilní syndrom s počtem eosinofilů 87,7% a APEo 54,5! Byla provedena CT/MR vyšetření s nálezem expanzivního postižení horního a předního mediastina, postižení supraklavikulárních lymfatických uzlin vlevo a sleziny. Histologicky prokázán klasický Hodgkinův lymfom, subtyp MC. Kazuistika prezentuje další léčebný postup i dynamiku hematologických laboratorních nálezů.

P7/ 2151.
Porovnání kitů na izolaci DNA ze stěrů bukální sliznice pro účely HLA genotypizace
Klimentová Hana, Vondráčková Hana, Melková Milena, Macnerová Renáta, Vraná Milena, Dobrovolná Marie *(HLA analýza, laboratoř molekulární genetiky, ÚHKT, Praha)*

Porovnání kitů na izolaci DNA ze stěrů bukální sliznice pro účely HLA genotypizace. Základem úspěšné genotypizace HLA polymorfismu je kvalitní DNA. Pro kompletní stanovení genotypu HLA metodou sekvenování či PCR-SSP (polymerázová řetězová reakce se sekvenčně specifickými primery) je potřeba 150 –200ul o minimální koncentraci 20ng/ul. U pacientů, kteří mají výrazně nízký počet leukocytů, používáme jako alternativní způsob získání materiálu ze stěru bukální sliznice. Pro izolaci DNA touto metodou jsme porovnávaly dva komerčně prodávané kity: Invitrogen ChargeSwitch gDNA Buccal Cell Kit a Isohelix DNA Isolation Kit. Oběma postupy jsme zpracovaly sadu vzorků pacientů a několik zdravých osob. Izolace kitem Invitrogen trvá cca 40 minut. Princip je založen na navázání DNA na paramagnetické kuličky a eluce pomocí roztoků s vysokým pH. Potřebná výbava je speciální stojánek s magnety, termostat (nebo termoblok), pipety. Přepipetování vzorku proběhne 2x. Izolace kitem Isohelix probíhá cca 90 minut, včetně hodinové inkubace. Izolace je založena na principu lýzy jaderných membrán a vysrážením DNA (bez užití etanolu). Výbavou je termoblok, pipety, přepipetování je také 2x. U obou metod je množství elučního roztoku 150ul, pro získání vyšší koncentrace vyizolované DNA lze toto množství snížit. Výsledky izolace ukázaly u kitu Invitrogen průměrnou koncentraci 20ug/ul,(12-29), faktor čistoty 1,56 (1,31-2,07), u kitu Isohelix je to 38ug/ul,(10-125), faktor čistoty 1,36 (0,97-1,60). Počet leukocytů vyšetřovaných vzorků byl v rozmezí 0,11 – 7,7. Z uvedených výsledků je zřejmé, že oba kity jsou ve výtěžnosti a kvalitě získané DNA podobné. Jako nevýhodu u kitu Invitrogen vidíme počáteční poměrně velkou investici do stojánku s magnetickými ploškami (MagnaRack), výhodou se jeví práce s magnetickými kuličkami, které jsou barevně výrazné. U kitu Isohelix je výhodou nízká cena, nevýhodou je možnost odsátí pelety DNA během izolace.

MNOHOČETNÝ MYELOM

P8/ 2173.

Sérové mikroRNA jako marker mnohočetného myelomu

Kubiczková Lenka, Ševčíková Sabina, Sedlaříková Lenka, Dementyeva Elena, Kryukov Fedor, Zahradová Lenka, Pour Luděk, Slabý Ondřej, Hájek Roman *(Babákova myelomová skupina, UPF, LF MU; IHOK, FN; Klinika komplexní onkologické péče, MOÚ; LEHABI, OKH, FN, Brno)*

Úvod: Ke sledování remise nebo případného relapsu u mnohočetného myelomu (MM) se většinou používají plazmatické buňky odebrané z kostní dřeně pacientů. Jedná se o velice invazivní postup, který nelze provádět opakovaně, proto je nutné hledat jiné markery. MikroRNA (miRNA) jsou krátké nekódující řetězce RNA, které jsou zapojeny do řady patologických procesů, účastní se i iniciace a progrese nádorů. Bylo zjištěno, že různé typy nádorů mají rozdílné profily exprese miRNA, které umožňují odlišení nádorové tkáně od zdravé tkáně. Výskyt miRNA byl potvrzen i v lidském séru - tyto cirkulující sérové miRNA jsou vysoce stabilní a jejich profil se liší mezi např. zdravými jedinci a pacienty s kolorektálním karcinomem i karcinomem plic. Navíc profil sérových miRNA odráží průběh onemocnění, po odstranění nádorů se hladiny určitých miRNA snížily a při relapsu došlo k jejich opětnému zvýšení. Na základě zmíněných publikací a našich předběžných výsledků předpokládáme, že sérové miRNA by mohly být využity jako indikátor MM. Metody: Analyzovali jsme miRNA ze séra 91 MM pacientů (při diagnóze) a 30 zdravých dárců. Medián věku byl u MM pacientů 63,9 let (41-88), u zdravých dárců 55,5 let (45-64 let). Izolace miRNA ze séra byla provedena pomocí miRNEasy Mini Kit, miRNA byly přepsány do cDNA a jejich exprese byla stanovena pomocí specifických sond metodou real-time PCR na platformě Applied Biosystems. Celkem jsme ověřovali 4 miRNA (hsa-miR-29a, hsa-miR-142-5p, hsa-miR-410 and hsa-miR-660) a miR-16, která byla použita jako interní kontrola. Rozdíly v expresi jednotlivých miRNA byly stanoveny pomocí neparametrického Mann-Whitney U testu mezi dvěma skupinami. Testování sensitivity, specificity a AUC bylo provedeno pomocí ROC analýzy. Výsledky: Exprese sérových miR-142-5p, miR-660 a miR-29a byly signifikantně zvýšeny u MM pacientů ($p=0.0183$, $p=0.0062$ and $p<0.0001$). ROC analýza prokázala, že hladina miR-29a by mohla posloužit jako marker MM ze séra (AUC 0,832 (95 % CI, 0,753 to 0,894)). Na hladině významnosti 0.0103 relativní exprese miR-29a byla sensitivita 88 % a specificita 70 %. Závěr: Oproti odběru kostí dřeně by snadno dostupný sérový marker znamenal nenáročné stanovení, možnost opakovaných měření a zejména méně invazivní zákrok pro MM pacienty. Takovýmto markerem se zdá být sérová miR-29a. Grantová podpora: MSM0021622434, NT11154 a NT12130.

P9/ 2162.

Jednonukleotidové polymorfizmy v genech multilékové rezistence u nemocných s mnohočetným myelomem

Almáši Martina, Sáblíková Barbora, Ševčíková Sabina, Šváchová Hana, Říhová Lucie, Kyjovská Drahomíra, Pour Luděk, Penka Miroslav, Hájek Roman *(Babákova myelomová skupina, Ústav patologické fyziologie, LF MU; IHOK; OKH, FN, Brno)*

Úvod a cíl: MDR1 (gen kódující P-glykoprotein) a MRP1 (gen kódující protein multilékové rezistence) kódují proteiny efluxní transmembránové pumpy dopravující endogenní toxické látky, cizorodé látky a léky z buněk. Jednonukleotidové polymorfizmy (SNPs) v genech MDR1 a MRP1 by mohly změnit funkci těchto proteinů, jejichž snížená aktivita vede k následné akumulaci léku v organismu včetně dalších komplikací, naopak zvýšená aktivita vede k rychlejšímu transportu léku z cílové buňky a tím snižuje jeho účinnost. Cílem bylo hodnocení asociace 3 SNPs v genu MDR1 a 1 SNP v genu MRP1 s intervaly přežití u pacientů s mnohočetným myelomem (MM) léčených bortezomibem. Metody: Pro zjištění frekvence genotypů kandidátních genů bylo provedeno testování genomové DNA od 178 pacientů s MM (92 žen/86 mužů); medián věku při zahájení terapie 67 (rozmezí 34-85) let. Všichni byli léčeni bortezomibem, přičemž 46,1 % (82/178) režimem CVD. Pro genotypizaci byla zvolena metoda TaqMan® alelické diskriminace pomocí real-time PCR na přístroji StepOne™, Applied Biosystems. Výsledky byly hodnoceny v programu Statistika verze 9.0. U každého SNP byla testována Hardy-Weinbergova rovnováha (HWE) pomocí chí-kvadrát (X^2) testu, intervaly přežití byly hodnoceny pomocí Kaplan-Maierových křivek. Výsledky: Všechny sledované polymorfizmy splňovaly kritéria HWE. Při hodnocení analýzy přežití nebyly u dvou SNPs v genu MDR1 (rs1128503 a rs1045642)

nalezeny statisticky významné rozdíly mezi pacienty s různými genotypy. U SNP v genu MDR1 (rs 2032582) byl nalezen rozdíl v časné fázi sledování, avšak rovněž ne statisticky významný (TTP-25,6 měsíců heterozygoti vs. 15,8 měsíců homozygoti s wild-type alelou a 15,3 měsíců s minoritní alelou, p=0,038; PFS-19,2 vs. 15,8 a 15,3měs.,p=0,077; OS od stanovení dg. 87,1 vs. 66,6 a 76,3měs.,-p=0,554;OS od zahájení léčby 27,6 vs. 19,2 a 20,9měs., p=0,285). U genu MRP1 (rs41148356) nebyla nalezena žádná minoritní alela a pouze 9 heterozygotů, rovněž nebyly rozdíly mezi různými genotypy. Závěr: Zjištěné údaje o frekvenci variantních polymorfizmů napovídají, že bortezomib zřejmě není substrátem MDR1 a MRP1 genů spojovaných s multilékovou rezistencí. Je potřeba další údaje a analýzy pro potvrzení těchto výsledků.
Podporováno: MSMT0021622434

P10/ 2133.

Nestin je potenciálním prediktorem léčebné odpovědi na konvenční chemoterapii a nové typy léků a je asociován se ziskem 1q21 u mnohočetného myelomu

Šváchová Hana, Kryukov Fedor, Dementyeva Elena, Kubíczková Lenka, Ševčíková Sabina, Němec Pavel, Grešliková Henrita, Říhová Lucie, Zahradová Lenka, Hájek Roman *(Babákova myelomová skupina, Ústav patologické fyziologie, LF MU; IHOK, FN, Brno)*

Úvod: Nestin, marker kmenových/progenitorových buněk, je považován za vhodný diagnostický a prognostický ukazatel u řady solidních nádorů. V předchozí práci jsme prokázali, že nestin je nádorově-specifický marker pro klonální plazmatické buňky (PC) u mnohočetného myelomu (MM). Cílem této práce bylo A) analyzovat vztah mezi expresí nestinu a cytogenetickými aberacemi nebo standardními prognostickými parametry; B) hodnotit, zda exprese nestinu před léčbou predikuje léčebnou odpověď. Metody: Do analýzy bylo zařazeno 163 pacientů s MM; 67% (93/163) nové dg., 43% (70/163)relaps. Genová exprese nestinu byla hodnocena metodou qRT-PCR u 63% (103/163) pacientů a kvantifikována metodou ddCt. Protein nestin byl analyzován metodou průtokové cytometrie v CD138+38+PC u 51% (83/163) pacientů. Hladina nestinu byla hodnocena jako procento nestin-pozitivních buněk (%Nes+PC) a jako medián fluorescenční intenzity (MFI). Přítomnost del(13q14), del(17p53), IgH, zisk 1q21 a hyperdiploidie v CD138+PC byla hodnocena metodou FISH. Exprese nestinu před léčbou byla hodocena u pacientů bez ASCT léčených konvenční chemoterapií nebo novými typy léků. Výsledky: Byly prokázány signifikantní rozdíly v genové [median RQ 4.0 (0.4-152.0) vs median RQ 7.6 (0.9-309.8); p=0.014] a proteinové expresi nestinu [median MFI 3.5 (1.3-36.8) vs median MFI 4.6 (2.1-75.9); p=0.010] mezi novými dg. a pacienty v relapsu. Hladina nestinu pozitivně korelovala s genovou expresí nestinu u nových dg. (p=0.027) i relapsů (p=0.025). U nově diagnostikovaných pacientů vysoké %Nes+PC (p=0.007) a MFI (p=0.012) asociovaly se ziskem 1q21. Rozdíly v proteinové hladině nestinu mezi pacienty, kteří dosáhli ≥VGPR a pacienty s ≤PR, dosahovaly hraniční významnosti (p=0.053). Pacienti, kteří dosáhli ≥VGPR měli nižší genovou expresi nestinu ve srovnání s pacienty, kteří dosáhli ≤PR [medián RQ 1.3 (0.6-3.9) vs medián RQ 4.6 (1.7-152.0); p=0.001]. U pacientů v relapsu byl také potvrzen vztah mezi ziskem 1q21 a vysokým procentem Nes+PC (p<0.001) a MFI (p=0.008). Korelace mezi genovou či proteinovou expresí nestinu v době diagnózy nebo relapsu a prognostickými parametry nebyla potvrzena. Závěr: Hladina nestinu je asociována se ziskem 1q21 u nových diagnóz i pacientů v relapsu. Exprese nestinu může být potenciálním prediktorem horší léčebné odpovědi u pacientů léčených konvenční chemoterapií nebo novými léky. Prediktivní potenciál nestinu je nutno ověřit na větším souboru pacientů. Grantová podpora: MSM0021622434 a NT11154.

NE-HODGKINSKÉ LYMFOMY

P11/ 2183.

Imunoterapie CD20+ lymfomů pomocí geneticky modifikovaných T lymfocytů exprimujících chimerický antigenní receptor anti-CD20 navázaný na intracelulární signalizační domény TCRzeta a 4-1BB

Otáhal Pavel, Král Vlastimil, Fabry Milan, Hořejší Václav, Trněný Marek *(I. interní klinika, 1.LF UK a VFN; Ústav molekulární genetiky AVČR v.v.i., Praha)*

Mezi nejnovější terapeutické postupy, které jsou zkoušeny v rámci klinických studií patří adoptivní imunoterapie pomocí T lymfocytů exprimujících chimerický antigenní receptor (CAR). Tento postup je založen na izolaci T lymfocytů, následné in vitro transdukci pomocí lentivirového vektoru, který vnese do genomu T lymfocytů sekvenci DNA kódující upravený povrchový receptor specificky reagující s antigeny přítomnými na povrchu nádorových buněk jako je např. CD20 nebo CD19, následné expanzi in vitro a vrácení zpět do organismu pacienta. Připravili jsme chimerický antigenní receptor specifický na CD20 (CD20 CAR), který jsme pomocí lentivirového vektoru vnesli do primárních T lymfocytů. Tento CD20 CAR je tvořen variabilní doménou protilátky specifické na CD20 (scFv) spojené s intracelulární signalizačni doménou TCR zeta řetězce a kostimulační molekuly 4-1BB. Po navázání tohoto chimerického receptoru na antigen CD20 nacházející se na povrchu nádorových buněk dojde k aktivaci buněčných signalizačních kaskád T lymfocytu, které napodobují přirozenou aktivaci cytotoxického T lymfocytu a následné lýze nádorových buněk. Naše výsledky ukazují, že T lymfocyty exprimující CD20 CAR jsou velmi účinně aktivovány CD20+ buňkami in vitro a tato aktivace je částečně inhibovatelná anti-CD20 protilátkou. Zároveň CD20 CAR T lymfocyty účinně lyzují CD20+ buňky in vitro. Naše výsledky jsou pilotními experimenty v připravovaném projektu adoptivní imunoterapie CD20+ lymfomů a leukemií.

P12/ 2167.

Vlasatobuněčná leukémie – přehled 12 případů

Starostka David, Novosadová Libuše, Mikula Peter *(OKH, Nemocnice s poliklinikou Havířov)*

Vlasatobuněčná leukémie (HCL) by neměla být opomenuta při diferenciální diagnostice pancytopenií. Jde o vzácné onemocnění - v souboru 252 nově diagnostikovaných leukemizovaných B-lymfoproliferací na našem pracovišti byl její výskyt 3,5 %. Při důvodném podezření na HCL je diagnostika většinou rychlá, přímočará a nekomplikovaná (imunocytologie, imunohistochemie). Potíže může činit diferenciální diagnostika leukocytózy s HCL fenotypem (variantní HCL, splenický lymfom z marginální zóny, splenický difúzní malobuněčný B-lymfom z červené pulpy). Soubor pacientů léčených na OKH Nemocnice s poliklinikou Havířov zahrnuje 12 případů (9 mužů a 3 ženy, věkové rozpětí v době diagnózy 41-72 let s mediánem 48 let). Doba sledování od stanovení diagnózy je v souboru 12-243 měsíce (medián 94 měsíce), všichni nemocní žijí. V době diagnózy byl výskyt pancytopenie 10/12, bicytopenie (leukopenie + trombocytopenie) 2/12, splenomegalie 7/12 a mediastinální lymfadenopatie 1/12, u jednoho nemocného jsme pozorovali leukemický infiltrát měkkých tkání stehna. Léčebné modality 1. linie zahrnovaly: kladribin 7/12, kladribin + konsolidace 4 dávkami rituximabu 3/12, interferon-α 1/12, splenektomie 1/12 s touto léčebnou odpovědí: CR 8/12 (po kladribinu nebo kladribinu s rituximabem), PR 3/12 (po kladribinu nebo splenektomii), SD 1/12 (po interferonu-α). Interval od zahájení léčby 1. linie do zahájení léčby 2. linie byl 2-132 měsíce (medián 96.5 měsíce). Léčba 2. linie u 5/12 nemocných: kladribin + konsolidace 4 dávkami rituximabu 4/5 (léčebná odpověď typu CR u všech nemocných včetně pacientů s předchozí PR), interferon-α 1/12 (dosaženo PR). Léčba 3. linie u 1 nemocné (interferon-α, PR). Rituximab jsme podávali u nemocných s MRD detegovanou flowcytometricky za 3 měsíce od ukončení léčby kladribinem. Relevantní komplikující příhody zahrnovaly exantém s vaskulitickým rysem (7/12), nekrotizující erysipel (1/12), gramnegativní sepsi s DIC (1/12), perimyokarditidu se srdečním selháním (1/12), protrahovaný neinfekční SIRS (1/12). Závěr: HCL představuje vzácnou indolentní B-lymfoproliferaci s výbornou odpovědí na léčbu kladribinem a příznivou prognózou. Rituximab může být vhodným nástrojem konsolidace kladribinové terapie u nemocných s MRD.

TRANSPLANTACE

P13/ 2225.

Indikátory kvality autologního štěpu periferních kmenových buněk – korelace laboratorních parametrů a přihojení štěpu

Skoumalová Ivana, Horálková Lenka, Pikalová Zuzana, Novák Martin, Marešová Ivana, Faber Edgar
(Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc)

V roce 2008 vstoupil v platnost zákon číslo 296/2008 Sb. o zajištění jakosti a bezpečnosti lidských tkání a buněk určených k použití u člověka. V souvislosti s tímto zákonem jsme od roku 2010 začali v našem centru zpracovávat štěpy uzavřeným systémem. Tímto způsobem zpracováváme štěpy autologní i alogenní, periferních kmenových buněk, kostní dřeně i dárcovských lymfocytů. Kvalita štěpů byla hodnocena pomocí následujících parametrů: počet CD34+ buněk, vitalita a růst progenitorů CFU-GM a BFU-E. Měření počtu CD34+ buněk a vitality probíhá v laboratoři průtokové cytometrie metodou validovanou SEKK a mezinárodními testy (CD-CHEX CD 34, Streck a BD QAS). Hodnocení růstu progenitorových kolonií pomocí validované metody (mezinárodní srovnávací test Human Bone Marrow Proficiency Testing Program, StemCell) zabezpečuje laboratoř tkáňové banky. Progenitorové buňky a vitalita jsou sledovány ve třech časových rovinách – u nativního štěpu, bezprostředně po zamrazení štěpu a v čase podání štěpu. Celkem bylo od 1. 1. 2010 k 31. 3. 2012 na transplantační jednotce podáno 80 autologních štěpů periferních kmenových buněk zpracovaných uzavřeným systémem. Vedle samotného počtu CD 34+ buněk a vitality je počet progenitorových buněk dalším důležitým parametrem, který udává schopnost buněk štěpu diferencovat se. Laboratorní hodnoty všech výše uvedených parametrů byly dány do souvislosti s klinickým obrazem, tj. s přihojením štěpu. Práce prezentuje naše výsledky.

CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKEMIE / MYELOPROLIFERATIVNÍ ONEMOCNĚNÍ

P14/ 2241.

Prínos mutácií v 12. exóne génu JAK2 k diagnostike pravej polycytémie u 2 pacientov s izolovanou erytrocytózou

Katrincsáková Beáta, Hluší Antonín, Srovnalík Karel, Novosadová Alena, Jarošová Marie, Indrák Karel *(Hemato-onkologická klinika, FN a LF UP, Olomouc; Hematologické a transfúzní oddělení, Vsetínská nemocnice a.s., Vsetín)*

Polycythemia vera (PV) patrí do skupiny Ph negatívnych myeloproliferatívnych neoplázií (Ph-MPN) a je charakteristická prítomnosťou bodovej mutácie JAK2(V617F) u viac ako 95% prípadov. U časti pacientov (<1%) bez mutácie JAK2(V617F) boli popísané alternatívne mutácie v 12. exóne génu JAK2. Podľa WHO klasifikácie sa zaraďuje nález JAK2 mutácií medzi hlavné diagnostické kritériá PV. V príspevku popisujeme kazuistiky 2 pacientov odoslaných na HOK FNOL s diagnózou polyglobúlia nejasnej etiológie. Prvý muž (vek 55 rokov v dobe dg, absolútna erytrocytóza [Hb 217g/L; Ery 6.8x1012/L, Hkt 0.63], zvýšený objem erytrocytov [38 ml/kg],ale neprítomnosť JAK2(V617F), trepanobiopsia bez známok myeloproliferácie),nespĺňal veľké resp. malé diagnostické kritériá pre PV. Po vylúčení známych príčin sekundárnej polyglobúlie bolo indikované vyšetrenie mutačného profilu 12. exónu génu JAK2, ktoré potvrdilo mutáciu JAK2(R541-E543delinsK). Pacient je toho času liečený pravidelnou erytrocytaferézou,je klinicky stabilizovaný bez známok hyperviskozity či trombotických komplikácií. U druhého muža (vek 59 rokov v dobe dg) bola absolútna erytrocytóza [Hb 198g/L; Ery 8,23 x1012/L, Hkt 0.67] iniciálne zachytená ako polyglobúlia nejasného pôvodu. Predchádzajúci pobyt v horskom prostredí, neprítomnosť JAK2(V617F), trepanobiopsia bez známok myeloproliferácie spochybnili diagnózu PV,kým hypersenzitivita kolónií erytrocytov k erytropoetínu a pretrvávajúca absolútna erytrocytóza naopak upozorňovali na pravdepodobnú primárnu polycytémiu. Následná sekvenčná analýza periférnej krvi potvrdila mutáciu JAK2(N542-E543del). Toho času má pacient stabilné hodnoty krvného obrazu, nevyžaduje venepunkcie. Okrem uvedených 2 prípadov bola sekvenčná analýza 12. exónu JAK2 doplnená v ďalších 19 prípadoch Ph- MPN alebo čistej erytrocytózy NS JAK2(V617F) negatívnej. Ďalšie mutácie JAK2 identifikované neboli. Prítomnosť mutácií v 12. exóne JAK2 sme potvrdili v 2 prípadoch absolútnej izolovanej erytrocytózy nejasnej etiológie. Nález mutácií génu JAK2 prispel u týchto pacientov k potvrdeniu diagnózy PV. Naše kazuistiky poukazujú na to, že vyšetrenie mutačného profilu 12. exónu JAK2 môže v klinickej praxi výrazne prispieť k diagnostike Ph- MPN i v zriedkavých (<5%) prípadoch JAK2(V617F) negatívnych PV charakterizovaných absolútnou čistou erytrocytózou, u ktorých je nutné diagnózu pravej polycytémie potvrdiť na základe dôkladného zhodnotenia ďalších klinických a laboratórnych nálezov.Grantová podpora: LF-2012-007

P15/ 2177.

Detekce mutací v MPL genu u JAK2 negativních pacientů s MPN

Kubová Barbora, Žmolíková Jana, Marková Daniela, Šimová Jarmila, Jalůvková Michaela, Urbanovská Irena, Konvalinka David, Žebráková Iveta, Uvírová Magdalena, Dvořáčková Jana *(CGB laboratoř a.s.; LF, Ostravská Univerzita, Ostrava)*

Úvod: Myeloproliferativní neoplázie (MPN) tvoří skupinu klonálních onemocnění hematopoetické kmenové buňky charakterizované proliferací jedné nebo více řad hematopoezy. Nejčastěji se vyskytující somatickou mutací u MPN je mutace V617F v JAK2 genu. Přibližně 50% pacientů s diagnózou esenciální trombocytémie (ET) a primární myelofibrózy (PMF) však nenese výše uvedenou mutaci a dle diagnostických kritériích WHO je doporučeno vyšetření dalších genetických změn – především mutace v MPL genu. MPL gen (myeloproliferative leukemia virus oncogene, OMIM*159530) se nachází na chromosomu 1, v lokusu p34 a kóduje trombopoetinový receptor. Gen se skládá z 12 exonů a nejčastěji se vyskytující mutace v exonu 10 MPL genu (W515L a W515K) mají za následek konstitutivní aktivaci JAK2/STAT signální dráhy. Získané mutace v MPL genu se vyskytují u tzv. BCR-ABL/Ph 1 negativních MPN, zejména u pacientů s diagnózou ET (1-5%) a PMF (5-10%). Materiál a metody: Na našem pracovišti provádíme detekci mutací v exonu 10 a 11 MPL genu u JAK2 negativních pacientů s diagnózou MPN. Na genetickou analýzu jsou použity vzorky

DNA izolované z kostní dřeně a granulocytů periferní krve. Analýza je prováděna pomocí real-time PCR (MPL W515L/K MutaScreenTM kit, Ipsogen) a sekvenováním exonu 10 a 11 MPL genu (Big-Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit, Applied Biosystems). Metoda real-time PCR umožňuje rychlou detekci mutací s vysokou citlivostí (detekční limit 1,5%), detekce je však omezena pouze na mutace W515L a W515K, případné další mutace nejsou detekovány. Naopak metoda sekvenace je schopná detekovat všechny mutace v sekvenované oblasti MPL genu (méně časté substituce – např. W515R, W515A, S505N, delece/inzerce), avšak má mnohem nižší citlivost (uváděný detekční limit 15-20%). Výsledky: V období 2011-3/2012 bylo vyšetřeno 37 pacientů na přítomnost mutací v exonech 10 a 11 MPL genu u JAK2 (V617F) negativních vzorků. Mutace v exonu 10 MPL genu (W515L) byla nalezena ve třech případech (8,1%), mutace v exonu 11 MPL genu nebyla námi dosud zachycena. Závěr: V diagnostických kritériích WHO je pro diagnostiku MPN zahrnuta jak detekce mutací v JAK2, tak i v MPL genu. Detekce mutací v MPL genu je tedy pomocným diagnostickým markerem v diferenciální diagnostice reaktivních, sekundárních trombocytémií a jiných forem MPN a vyšetření také přispívá k diagnostice familiárních trombocytóz (mutace S505N).

P16/ 2217.

Analýza mutací Bcr-Abl tyrozinkinázové domény u pacientů s CML z pohledu laboratoře molekulární biologie HOK, FN Olomouc

Gazdová Jana, Rožmanová Šárka, Faber Edgar, Rohoň Peter, Skoumalová Ivana, Marešová Ivana, Divoká Martina, Indrák Karel *(Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc)*

Optimalizace léčby chronické myeloidní leukemie (CML) je kontinuální proces. V 1. linii léčby je standardně podáván imatinib (IM), v důsledku rezistence nebo intolerance k tomuto inhibitoru tyrozinové kinázy (TKI) však odpoví na léčbu suboptimálně asi 15% pacientů, u části pacientů navíc dochází po primárně optimální léčebné odpovědi k progresi onemocnění. Jedním z Bcr-Abl závislých mechanizmů rezistence jsou bodové mutace Bcr-Abl tyrozikinázové domény (BCR-ABL-TKD). Řada mutací snižuje do různé míry senzitivitu k IM. Vedle dobře prostudovných mutací s prokazatelným vlivem na vznik rezistence k IM existuje mnoho bodových substitucí, jejichž vliv je vzhledem k malé incidenci sporný. V oblasti TKD bylo dosud nalezeno přes sto bodových substitucí z nichž asi 50 vede ke změně aminokyseliny. Více než 35 z nich bylo popsáno u CML pacientů rezistentních k IM. Na našem pracovišti vyšetřujme mutace z RNA izolované z leukocytů periferní krve metodou přímé sekvenace 863 bp dlouhého produktu dvoukolové RT-PCR. V letech 2008 – 2012 byly mutace TKD vyšetřeny u 59 pacientů (46 mužů, 13 žen). Medián věku v době vyšetření byl 56 let (30 – 80). Terapie v době vyšetření byla následující: imatinib 76%; dasatinib 17%; nilotinib 5% a hydroxyurea 2%. Mutace TKD byly detekovány u 11 (19%) z vyšetřených pacientů, přičemž u 4 pacientů jsme potvrdili více než jednu bodovou substituci. Celkem bylo v našem souboru pacientů zachyceno 17 mutací postihujících 10 různých aminokyselin. Jejich zastoupení bylo následující: T315I (3) pacienti, F317L (3), F359V (2), M244V (2), L248V (1), Y253H (1), K271R (1), V299L (1), F311L (1), M351T (1), F359C (1). V době detekce mutace 82% pacientů progredovalo. Z jedenácti pacientů s mutací v TKD již 5 zemřelo, 4 z nich v souvislosti s progresí onemocnění. Jeden pacient podstoupil alogenní transplantaci krvetvorných buněk v důsledku rozvoje MDS typu refrakterní cytopenie s multilineární dysplázií a je nyní v remisi onemocnění. U tří pacientů bylo přechodem léčby na TKI 2. generace docíleno velké molekulární odpovědi nebo kompletní molekulární odpovědi. Dvěma pacientům byl indikován TKI 2. generace a léčebná odpověď není zatím zhodnocena. Závěr: Přestože je výběr terapeutického postupu ve 2. linii léčby výsledkem mnoha faktorů, detekce některých specifických mutací by měla být jeho součástí.

Podpořeno projekty IGA UP LF-2012-007 a NT 12218-4/2011.

P17/ 2218.

Targeted metabolomic analysis of leukocytes from patients with chronic myeloid leukemia

Župková Marcela, Mičová Kateřina, Fikarová Iveta, Galoczová Michaela, Janečková Hana, Friedecký David, Adam Tomáš *(Laboratoř dědičných metabolických poruch; Ústav molekulární a translační medicíny, UP a FN, Olomouc)*

Backround: Metabolite profiling refers to the interpretation of information-rich data with the aim to understand metabolic processes. The goal of this work was to examine the influence of tyrosine

kinase inhibitor on the leukocytes from chronic myeloid leukemia (CML) patients. Material and method: Leukocytes were isolated from whole blood and incubated with imatinib for 10 hours. Leukocytes were collected at different time of cultivation and after centrifugation extracted by the chloroform/methanol/water mixture. Analysis of 398 metabolites was performed using high performance liquid chromatography (Ultimate 3000, Dionex) coupled with tandem mass spectrometry (QTRAP 5500, AB Sciex). Metabolites were detected using multiple reaction monitoring in positive and negative mode and evaluated using MultiQuant 2.0.2 software. Results and discussion: The method detects various metabolites - aminoacids, organic acids, bases, ribosides, nucleotides, sugars, and alcohols. Total 191 metabolites were identified on the basis of its transition and retention time in leukocytes. In dependence on incubation time and compared to control group we found significant changes of specific aminoacids, acylcarnitines and organic acids. Conclusion: In this study metabolome of human leukocytes was defined and changes of compounds levels were observed during incubation. This work was supported by grants IGA MZČR NT12218 and LF UP 2012-016. The infrastructural part of this project (Institute of Molecular and Translational Medicine) was supported from the Operational programme Research and Development for Innovations (project CZ.1.05/2.1.00/01.0030).

P18/ 2130.

Rozlišení mezi raritními přestavbami e6a2 a e19a2 v diagnostice fúzního genu BCR-ABL

Součková Martina, Richterová Rradmila, Roszková Barbora, Zemanová Karla, Broučková Adéla, Polák Jaroslav, Machová Poláková Kateřina *(ÚHKT, Praha; P& R LAB a.s., Laboratoř molekulární biologie, Nový Jičín)*

Úvod: Molekulární potvrzení diagnózy chronické myeloidní leukémie (CML) a Ph+ akutních leukémií je založeno na detekci transkriptu fúzního genu BCR-ABL a určení typu přestavby. Přestože toto vyšetření je v laboratořích velice rozšířené, existují ojedinělé případy pacientů nesoucích raritní přestavby a jejich správné určení může být problematické. Proto je nutné přistoupit k alternativním postupům umožňujícím jasně ověřit typ přestavby. Znalost typu přestavby je důležitá pro následující kvantifikaci hladiny transkriptu BCR-ABL a zamezení falešně negativním výsledkům. Případ: muž, 35. ročník, suspektní CML, podezření na přestavbu micro BCR-ABL Metodika: Multiplex RT PCR (dle Cross et al., 1994) je vhodná k průkazu exprese fúzního genu BCR-ABL a k určení typu jeho přestavby (major, minor a mikro). V jednom kroku je současně amplifikována oblast cDNA specifická pro jednotlivé přestavby fúzního genu BCR-ABL a netranslokovaná oblast kontrolního genu BCR, jejíž pozitivní amplifikace slouží ke kontrole kvality templátu. Postup práce a výsledky: Při diagnostickém vyšetření fúzního genu BCR-ABL jsme potvrdili v cDNA vzorku periferní krve proužek o délce ~ 1000 bp. Bylo nutné rozlišit, zda se jedná o přestavbu e6a2 (926 bp) či e19a2 (1123 bp). Přítomná sada primerů v multiplex PCR, která umožňuje amplifikovat úseky cDNA obou přestaveb, hybridizuje k úsekům ohraničujícím exony 1 (e1, primer BCR-C) a 13 (e13, primer B2B) genu BCR ve směru sense, exon 21 (e21, primer C5e-) genu BCR a exon 3 (a3, primer CA3) genu ABL ve směru antisense. Po elektroforetické separaci PCR produktu je určení délky málo přesné a nedostačuje k jasnému určení typu přestavby. Pro potvrzení/vyvrácení přítomnosti e6a2 jsme proto v dalším kroku provedli singleplex PCR za použití primerů BCR-C a CA3-. Do této reakce bylo nutné zařadit také pozitivní kontrolu s přestavbou b3a2 (1922 bp) či b2a2 (1847 bp), která slouží pro kontrolu amplifikace dlouhých úseků. Pro potvrzení/vyvrácení přestavby e19a2 jsme provedli PCR reakci s použitím specifických primerů e19a2-F a e19a2-R pro amplifikaci přestavby micro (135 bp). Při této PCR je znemožněna amplifikace úseku e6a2. U tohoto CML případu jsme potvrdili přestavbu e19a2. Závěr: Bez nutnosti časově náročného sekvenování pro potvrzení raritních přestaveb BCR-ABL jsme pomocí tohoto alternativního rychlého postupu jasně určili přestavbu micro transkriptu fúzního genu BCR-ABL.

Podpořeno: MZČR IGANT11555

VARIA

P19/ 2134.

Cirkulující endoteliální progenitorové buňky po hemorheoferéze u věkem podmíněné makulární degenerace

Bláha Milan, Vokurková Doris, Rencová Eva, Langrová Hana, Lánská Miriam, Rozsíval Pavel, Malý Jaroslav *(II. interní klinika, OKH; Ústav klinické imunologie a alergologie; Oční klinika, LF a FN, Hradec Králové)*

Úvod: Rheohemaferéza (RHF) je dosud jedinou možností léčby suché formy věkem podmíněné makulární degenerace (AMD), hlavní příčiny praktické slepoty starších obyvatel rozvinutých zemí. Je třeba mít k disposici spolehlivé a dosažitelné ukazatele okamžité aktivity choroby. Jedním z ukazatelů aktivity endotelu by mohl být počet cirkulujících endoteliálních progenitorových buněk (EPC). Soubor nemocných a metodika: a) Naše metoda RHF: Plazma získaná separátorem Cobe-Spectra je promývána sekundárním přístrojem Adasorb s filtrem Evaflux 4A (Kuraray, Osaka, Japonsko), který odstraní přesně definované spektrum vysokomolekulárních látek. U nemocných bylo provedeno 8 procedur během 10 týdnů. b) Soubor nemocných: Dosud bylo léčeno 40 pacientů a u posledních 18 (7 mužů, 11 žen ve věku 67.4 ± 6.6 let) bylo vyšetřeno množství EPC. Analyzovali jsme párové vzorky vždy před a po RHF na začátku, uprostřed a na konci léčebné serie 8 procedur. c) Metodika: Citrátová krev byla inkubována s koktejlem protilátek proti povrchovým buněčným receptorům - anti-CD34/FITC, anti-CD133/APC, anti-VEGF/PE a anti-CD45/PC7. Před měřením byla do každého vzorku přidána suspense FlowCount Beads (BeckmanCoulter) pro určení absolutních hodnot měřených buněk. Čtyřbarevná analýza byla provedena na průtokovém cytometru FC-500 pomocí software Kaluza, version 1.1 (BeckmanCoulter). EPCs byly charakterizovány jako CD45lowVEGF+CD34+CD133+ buňky. Rozdíly před a po RHF byly hodnoceny párovým Wilcoxonovým testem (MedCalc software) po určení normality dat. Signifikantní směrodatná odchylka: $p \leq 0,05$. Výsledky: Provedeno 108 měření (54 párových vzorků) u 18 pacientů. Hladina EPC před RHF byla 295±345 buněk/ml a významně klesla po výkonech (229±231), $p = 0,0073$. Hodnota po výkonech opět stoupá a za 4 týdny je na výchozí hodnotě. Diskuse a závěr: Při chorobách, kde hraje důležitou roli neovaskularizace (jako je AMD), je zvýšen počet EPC (literatura není zcela jednotná). V počtech EPC byl poměrně velký rozdíl, a to i u stejných pacientů. Jde o poměrně citlivou metodu, ovlivňovanou i dalšími faktory (některé léky, věk, obesita, kardiovaskulární choroby aj.). RHF vede k poklesu množství EPC, což může přispívat k dalšímu utlumení procesu neovaskularizace a zástavě progrese suché formy do vlhké formy AMD. Měření počtu EPC se jeví jako citlivý a relativně dostupný parametr, který je využitelný při sledování účinnosti léčby RHF.

Poděkování: Práce byla podporována grantem IGA MZ ČR NST/12287-5

P20/ 2163.

Kvalita transfúzneho lieku s obsahom erytrocytov pripraveného kryokonzerváciou

Tupý Jaromír, Mitura Juraj, Husarčíková Oľga, Chrenková Oľga, Tupá Miriam, Lacko Anton *(Fakulta zdravotníctva KU; ÚHaT ÚVN Ružomberok – FN, Ružomberok - SVK)*

ÚVOD: Náhrada a zásobovanie prípravkami je stálym strategickým problémom transfúznych služieb celého sveta, ktorý vyplýva z podstaty krvi ako liečiva s obmedzenou dobou použiteľnosti, špecifických podmienok prepravy, skladovania a aplikácie pacientom. Tieto skutočnosti predstavujú hlavné limity transfúznych služieb vojenského zdravotníctva, hromadných nešťastí a medicíny katastrof. Východiskom je nutnosť mať k dispozícii kedykoľvek mobilizovateľnú zásobu erytrocytov, ktorých expirácia nie je časovo limitovaná. Tejto požiadavke najlepšie zodpovedá strategický sklad kryokonzervovaných erytrocytov. CIEĽ: Cieľom práce bolo overiť požadovanú kvalitu transfúzneho lieku s obsahom erytrocytov pripraveného kryokonzerváciou a analyzovať ju v závislosti od času skladovania, možnosti dosiahnutia deleukotizovaného produktu a účinku leukodeplécie. METODIKA: Súbor sa celkovo skladal z 45 transfúznych jednotiek, rozdelených podľa spôsobu prípravy - deleukotizácie - na dve podskupiny (ESI - bez vstupnej deleukotizácie, ESII - deleukotizovaný produkt). Štatisticky sa vyhodnotili a porovnali hematologické a biochemické parametre kvality, metabolizmu a apoptózy, merané po deglycerolizácii a resuspenzácii v SAG-M v dňoch 0, 4, 7 a 10. VÝSLEDKY: Prezentované sú kvalitatívne výsledky parametrov (hemoglobin/TU, % hemolýzy, hemoglobín v su-

pernatante, osmolalita), ktoré dokladujú možnosť použitia transfúzneho lieku hneď po deglycerolizácii, premytí a revitalizácii bez ohľadu na vstupnú leukodepléciu. Časová analýza charakterizovala zmeny súvisiace predovšetkým s rozpadom nevitálnych erytrocytov poškodených v priebehu procesu zmrazenia a rozmrazenia. Takmer všetky dosiahnuté hodnoty značne favorizovali podskupinu pripravenú vstupnou leukoredukciou k možnosti predĺženej expirácie (ESI - 4 dni; ESII - 7 dní). Vstupný počet leukocytov/TU v ESII podskupine ($x = 0,225$, max - 0,263, $p < 0,001$), ako aj hodnoty merané v jednotlivých dňoch skladovania, boli významne nižšie ako požadovaná maximálna hodnota kvality, čo podporilo možnosť dosiahnutia deleukotizovaného produktu. V dosiahnutých výsledkoch prevažuje vyššia porekonštitučná stabilita erytrocytov pripravených vstupnou leukodepléciou, ktorá predurčuje metódu za štandard vstupného odberu. ZÁVER: Práca obohatí transfúziológiu o možnosť prípravy transfúzneho lieku o metódu, ktorá má uplatnenie hlavne v krízových situáciách. Výsledky umožnia akceptovať produkt, čo je predpokladom i ďalšieho civilného použitia.

ANÉMIE

P21/ 2236.

Alfa-talasemie diagnostikované v ČR na molekulární úrovni: nové diagnostické přístupy

Divoká Martina, Koláčková Monika, Lapčíková Anna, Divoký Vladimír, Indrák Karel *(Hemato-onkologická klinika, FN a LF UP; Ústav biologie, LF UP Olomouc)*

Talasemie jsou nejčastější příčinou vrozených anémií spojených s poruchami globinové syntézy. V minulém roce jsme na OHD prezentovali molekulární charakterizaci β-talasemií a hemoglobinových variant v české a slovenské populaci. Screeningové testy 63 nemocných s talasemickým syndromem, ale s normální hladinou HbA2 a HbF naznačily, že se v ČR vyskytují i α-talasemie, ale molekulární podstata většiny z nich zůstala neodhalena. Alfa-talasemie jsou nejčastěji způsobeny delecemi úseků DNA HBA lokusu na 16. chromozomu. Tradičně jsme pro analýzu HBA lokusu využívali technologie Southern blotu. Nově jsme zavedli alelově-specifickou PCR (ASO-PCR), která umožní identifikaci nejběžnějších 6ti α-talasemických mutací. Novou technologií molekulární diagnostiky je MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), která je založena na ligaci dvou sond a následující amplifikaci. MLPA slouží k detekci změn počtu kopií genových sekvencí – od malých (nukleotidových) delecí až po rozsáhlé delece celého lokusu, ale i duplikací a amplifikací. Systém MLPA KIT P140_HBA (MRC-Holland) detekuje změny v počtu kopií u 24 různých sekvencí v rámci HBA lokusu. Díky nově zavedeným metodám jsme zahájili molekulární vyšetření celé sestavy 63 nemocných s podezřením na α-talasemii. Kromě již dříve diagnostikované delece -α3.7, resp. triplikace ααα anti3.7, jsme poprvé v ČR potvrdili přítomnost dalších α-globinových delecí. Vyšetřením sestavy 63 pacientů (z několika hematologických center v ČR a SR) jsme pomocí ASO-PCR u 15ti z nich detekovali přítomnost genetické změny v rámci α-globinového klasteru. U 6ti pacientů převážně vietnamského původu jsme detekovali tzv. --SEA deleci, která je běžná v oblasti jihovýchodní Asie. Osm pacientů bylo pozitivních na přítomnost delece -α3.7, která byla u 1 pacienta detekována v homozygotní formě. U jedné pacientky s fenotypovými projevy HbH (průkaz erytrocytárních H-tělísek) byla detekována delece --MED běžně se vyskytující u jedinců ve Středomoří. Všechny pozitivní výsledky byly potvrzeny sekvenační analýzou získaného PCR produktu a nově i technologií MLPA. Pomocí MLPA jsme navíc v souboru 63 pacientů detekovali řadu dalších genetických změn HBA, vč. poprvé v české populaci zjištěné rozsáhlé delece HBA klasteru, zahrnující regulační oblast lokusu HS-40. Alfa--talasemické alely budou se stupňující se migrací postupně přibývat i v ČR a s tím bude stoupat i nutnost jejich přesné diagnostiky.

Podpora: IGA NT11208 a LF_2012_007.

P22/ 2226.

Vzácná příčina anémie - kazuistiky

Lavičková Alena, Hajšmanová Zdeňka, Ferdová Eva, Šlechtová Jitka *(ÚKBH; KZM, FN, Plzeň)*

Úvod: V období 1/2009-3/2012 jsme na našem pracovišti zaznamenali čtyři případy vzácného autoimunitního onemocnění. Uvádíme případy 2 žen a 2 mužů ve věku 52 až 66 let, kteří byli k hematologickému vyšetření doporučeni pro anemii a klinické příznaky připomínající B- symptomy. 3 ze 4 pacientů byli již podrobně vyšetřeni za hospitalizace na interním oddělení. Příčina jejich potíží a laboratorního nálezu nebyla prokázána. Popisy případů: V popředí klinických potíží byly u všech pacientů protrahované subfebrilie až febrilie bez průkazu zánětlivého fokusu, únava, váhový úbytek a ve 2 případech i noční pocení. Laboratorně dominovala vysoká sedimentace (82-120/ hod) a vysoké CRP (106-120). V krevním obraze leukocyty v normě, normocytární nebo lehce mikrocytární anemie (hemoglobin 84-120 g/l), u 2 pacientů mírná trombocytóza (trombocyty 403-538 x 10 9/l). V séru nízká hladina železa a vysoký ferritin. Žádný z pacientů neměl periferní adenomegalii ani splenomegalii. U 3 ze 4 nemocných jsme provedli vyšetření kostní dřeně. Maligní infiltrace nebyla prokázána, cytologický i histologický obraz odpovídal anemii chronických onemocnění. U všech pacientů bylo indikováno PET CT, které prokázalo vaskulitidu aorty a velkých tepen. Od vzniku klinických příznaků do správné diagnózy a zahájení léčby uplynulo u jednotlivých případů 5 týdnů až 5 měsíců. Závěr: Diagnostika vaskulitid je vzhledem k nespecifičnosti klinických projevů obtížná. Pokud jsou přítomny specifické kožní nebo orgánové projevy (např. nefritida), lze diagnózu potvrdit histologickým vyšetřením biopsie postižené tkáně. Často však lze k diagnóze dospět až po vyloučení jiných onemocnění, která mohou mít podobný klinický obraz (záněty, malignity…). PET CT je významným přínosem v diagnostice, zejména pokud jde o postižení aorty a velkých tepen.

MDS

P23/ 2213.
Myelodysplastický syndrom v podmínkách nefakultního pracoviště - přehled vybraných kazuistik
Kadlčková Eva, Rohoň Peter *(Hematologicko-transfuzní oddělení, Krajská nemocnice Tomáše Bati, Zlín; Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc)*

Myelodysplastický syndrom (MDS) zahrnuje heterogenní skupinu maligních klonálních onemocnění krvetvorby charakterizovaných inefektivní hemopoezou, periferní cytopenií a rizikem rozvoje akutní leukemie. Pro volbu terapeutické modality u konkrétního pacienta je důležité nejen přesné určení subtypu MDS, ale zejména stanovení rizika progrese do akutní leukemie dle mezinárodního prognostického skórovacího systému (IPSS). Autoři uvádějí soubor vybraných pacientů s MDS diagnostikovaných a léčených v hematologické ambulanci KNTB ve Zlíně v letech 2009 -2012, často ve spolupráci s vyššími pracovišti fakultního typu. Z 11 hodnocených osob mají 2 pacienti 5q- syndrom, 3 pacienti refrakterní anemii s multilineární dysplazií, 1 pacient refrakterní anemii s prstenčitými sideroblasty, 4 pacienti refrakterní anemii s excesem blastů (RAEB I-II)a jedna pacientka trpí chronickou myelomonocytární leukemii (CMML podtyp I nebo II). IPSS se pohybuje od (0-2,5 skorovacích bodů). 7 pacientů vykazuje transfuzní závislost, 1 pacient je léčen rekombinantním erytropoetinem alfa, 1 pacient dostává epigenetickou terapii 5-azacytidinem. U 2 pacientů je zvolena observace, resp. užívají pouze pyridoxin nebo acidum folicum. Cílem práce je poukázat na možnosti diagnostiky a léčby MDS v podmínkách pracoviště nefakultního typu s důrazem na morfologickou diagnostiku a spolupráci s cytogenetickou laboratoří. Jednotlivé nálezy budou demonstrovány spolu s morfologickou dokumentací a se zaměřením na klinickou aplikaci získaných laboratorních nálezů.
Práce byla podpořena studentským grantem LF-2012-007.

P24/ 2124.
Změny proteomu plazmy u pacientů s RAEB-1
Májek Pavel, Reicheltová Zuzana, Pečánková Klára, Suttnar Jiří, Čermák Jaroslav, Dyr Jan Evangelista *(ÚHKT, Praha)*

Refrakterní anemie s nadbytkem blastů, typ 1, (RAEB-1) je jednou z podskupin myelodysplastického syndromu (MDS). Jedná se o onkohematologické onemocnění postihující především starší pacienty. Cílem této proteomické studie bylo hledat změny proteomu plazmy pacientů s RAEB-1. Vzorky plazmy pacientů (n=7) a kontrolní skupiny zdravých dárců (n=17) byly depletovány, analyzovány pomocí 2D SDS-PAGE (pI 4–7) a statisticky vyhodnoceny programem Progenesis SameSpots. Proteiny byly identifikovány pomocí nanoLC-MS/MS a dva vybrané proteiny byly podrobeny relativní kvantifikaci pomocí hmotnostní spektrometrie. Detekováno bylo 56 signifikantně se lišících spotů (při porovnání skupiny pacientů s RAEB-1 a kontrolní skupiny), proteiny v 52 spotech se podařilo identifikovat a odpovídaly celkem 50 různým proteinům. Plazmatická hladina proteinu retinol-binding protein 4 byla snížena oproti kontrolní skupině, u proteinu leucine-rich alpha-2-glycoprotein byl prokázán vliv posttranslační modifikace na změny pozorované u pacientů s RAEB-1. U dalšího proteinu, inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4, byla pozorována fragmentace a změny v jeho nalezených fragmentech. V této studii byly nalezeny změny plazmatického proteomu pacientů s RAEB-1, identifikováno 50 různých proteinů, a u proteinu leucine-rich alpha-2-glycoprotein byl prokázán vliv posttranslační modifikace na změny pozorované u skupiny pacientů.
Práce byla podpořena grantem P205/12/G118.

AKUTNÍ LEUKÉMIE

P25/ 2144.

Charakteristika ALL pacientov s translokáciou t(1;19)(q23;p13)

Ružbacký Rastislav, Svoreň Zdenko, Kutková Martina, Čermák Martin, Žákovičová Alena, Leitnerová Michaela, Mikulášová Zuzana, Janíková Petra, Szabóová Žofia, Copáková Lucia *(Národný onkologický ústav, Bratislava – SVK)*

Translokácia t(1;19)(q23;p13) je pozorovaná v 2-5% prípadoch detí s pre B bunkovou akútnou lymfoblastovou leukémiou (ALL). Translokácia zahŕňa gén E2A na chromozóme 19 a gén PBX1 na chromozóme 1, a vedie k vzniku fúzneho génu E2A/PBX a následne k produkcii fúzneho transkriptu. Cytogeneticky boli identifikované dve formy, jedna vyvážená t(1;19)(q23;p13) a druhá nevyvážená der(19)t(1;19)(q23;p13). Pri liečbe pacientov podľa staršieho protokolu, mala t(1;19) vo všeobecnosti horšiu prognózu, avšak neskôr zavedená intenzívnejšia chemoterapia zlepšila prognózu a prežívanie pacientov. Na našom pracovisku bolo v rokoch 2008 až 2011 vyšetrených 134 pacientov s diagnózou ALL, kde sme u štyroch z nich identifikovali translokáciu t(1;19)(q23;p13). Vyšetrenie bolo realizované klasickou cytogenetikou, metódou fluorescenčnej in situ hybridizácie a molekulovým vyšetrením pomocou RT PCR. V našej práci prezentujeme kazuistiky vybraných pacientov, ktoré zahŕňajú klinické a hematologické údaje a tiež údaje o dosiahnutí kompletnej remisie alebo relapsu na cytogenetickej a molekulárnej úrovni.

P26/ 2143.

Prehľad genetických aberácií u pacientov s ALL vyšetrených na OLG NOÚ

Rotíková Lívia, Žákovičová Alena, Ružbacký Rastislav, Leitnerová Michaela, Janíková Perta, Karolčíková Daša, Szabóová Žofia, Copáková Lucia *(Oddelenie lekárskej genetiky, NOÚ, Bratislava - SVK)*

V skupine akútnej lymfoblastovej leukémie je prítomnosť genetických aberácií často krát kľúčovým bodom rozhodujúcim o ďalšej stratifikácii ALL pacientov do jednotlivých rizikových skupín. Výskyt chromozómových aberácií varíruje v závislosti od typu ALL (B-ALL/T-ALL) ako aj od samotného veku pacientov (dospelí/detskí pacienti). Až v 80% prípadov s dg. ALL je prítomná numerická alebo štrukturálna aberácia. Od roku 2008 sme metódou klasickej cytogenetiky, molekulárnej cytogenetiky (FISH) a metódami molekulovo–genetickej analýzy vyšetrili 153 pacientov s dg. ALL. Nezrelá B-ALL:V našom súbore ALL pacientov (28 dospelých, 125 detských) sme metódou molekulárnej cytogenetiky FISH detekovali translokáciu t(9;22) u 25% (5/20) dospelých pacientov a u 3% (3/107) detských pacientov. Translokáciu t(12;21) -TEL/AML1 sme detekovali pomocou FISH alebo RQ PCR v 31% (32/107) prípadov detí s nezrelou B--ALL. Hyperdiploidný klonový vývin bol zaznamenaný v 15% (3/20) dospelých a v 25% (27/107) detských pacientov s nezrelou B-ALL. Z menej častých prognosticky nepriaznivých aberácií sme v podskupine nezrelej B-ALL zaznamenali u detských pacientov v 7% (8/107) prestavbu génu MLL, to vrátane mimoriadne nepriaznivej translokácie t(4;11). Približne v 4% (4/107) prípadov detských B-ALL sme identifikovali nevyváženú translokáciu t(1;19) –E2α/PBX . Zrelá B-ALL (Burkittov lymfóm): Zrelá B-ALL má v porovnaní s nezrelou B-ALL horšiu prognózu. Práve genetická analýza umožňuje potvrdenie dg. B-ALL pomocou detekcie prestavby génu MYC, ktorá je popisovaná v cca 90% prípadov. V našom súbore pacientov sme zaznamenali nález translokácie t(8;14) u 80% (4/5) detí. U 1 dieťaťa sme potvrdili prítomnosť menej častej translokácie t(2;8). V skupine dospelých pacientov sme detekovali translokáciu t(8;14) v 2 prípadoch. T--ALL: Pre T-ALL sú charakteristické kryptické delécie génu CDKN2A (INK4A) (9p21) a génu TAL1 (1p32). Delécia génu CDKN2A (9p21) bola zaznamenaná v našom súbore u 33% (2/6) dospelých pacientov a u 58% (7/12) detských pacientov. Fúzny transkript SIL/TAL1 bol detekovaný v 50% (6/12) prípadov avšak len v podskupine detských T-ALL.

P27/ 2235.

Stanovení exprese vybraných leukemiemi asociovaných antigenů u pacientů s AML při diagnóze a v průběhu onemocnění

Petrboková Radka, Polák Jaroslav, Hájková Hana, Šálek Cyril, Haškovec Cedrik *(ÚHKT, Praha)*

U pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML) je stále potřeba vyhledávat vhodné molekulární markery pro sledování minimální reziduální nemoci (MRN) Geny MSLN, ST18, CSPG4,XAGE1 a CA9,

které patří do skupiny leukémiemi asociovaných genů (LAA) se nám zdáli jako nadějní kandidáti pro sledování MRN u pacientů s AML. Tyto geny geny byly vybrány proto, že mají vysokou expresi v buňkách leukemických pacientů a u zdravých jedinců nejsou exprimováni vůbec, nebo jen zcela minimálně. Hladinu MRN jsme určovali pomocí kvantitativní RT-PCR založené na mRNA. U 154 pacientů jsme monitorovali hladinu exprese genu MSLN při diagnóze, z toho byla overexprimována u 39 (25%) pacientů. U 153 pacientů jsme monitorovali hladinu exprese genu XAGE1 a CSPG4 při diagnóze, z toho XAGE1 byla overexprimována u 29 (19%) pacientů a CSPG4 u 69 (45%) pacientů. ST18 jsme sledovali u 152 pacientů AML při diagnóze a tento gen byl overexprimován u 78 (51%) pacientů. Jako poslední jsme sledovali gen CA9 u 149 pacientů AML při diagnóze a vyšší expresi jsme našli u 58 (39%) pacientů. U 8 pacientů, kteří měli nízkou expresi genu WT1 při diagnóze a neměli mutovaný gen NPM1, byla sledována MRN pomocí LAA v průběhu nemoci. Výsledky odpovídají klinickému stavu pacienta. Monitorování MRN pomocí LAA je výhodné u těch pacientů, kteří mají nízkou expresi genu WT1 a nebyla u nich nalezena mutace genu NPM1.

P28/ 2161.

Analýza současného výskytu mutací a zvýšené exprese některých genů (prognostických faktorů) u pacientů s akutní myeloidní leukémií s normální cytogenetikou a mutací genu CEBPA

Fuchs Ota, Kostečka Arnošt, Vostrý Martin, Holická Monika, Polák Jaroslav, Marková Jana, Schwarz Jiří, Soukup Petr, Cetkovský Petr *(ÚHKT, Praha)*

Úvod: Mutace genu CEBPA pro transkripční faktor C/EBPalfa («CCAAT/enhancer-binding protein alpha»)jsou příznivým prognostickým faktorem pro klinický výsledek u pacientů s AML s normálním karyotypem. Analyzovali jsme asociaci mutací genu CEBPA s mutacemi a expresí dalších genů (prognostické faktory). Tato asociace by mohla mít význam nejen pro prognózu, ale i pro terapii těchto pacientů AML s normálním karyotypem. Metodika: Genomová DNA a celková RNA byla izolována z mononukleárních buněk získaných z kostní dřeně nebo periferní krve. CEBPA je genem bez intronů a lze sekvenovat z DNA i cDNA po namnožení překrývajících se fragmentů pomocí PCR nebo RT-PCR. Exprese vybraných genů byla měřena kvantitativní PCR v reálném čase. Výsledky: Analyzovali jsme soubor 82 pacientů AML s normálním karyotypem. Nalezli jsme mutace v genu CEBPA u 23% těchto pacientů. 21,7% z nalezených FLT3-ITD mutací je asociováno s mutacemi CEBPA, tedy značně méně než u mutací NPM1 (nukleofosmin), se kterými je asociováno 45,2% z nalezených FLT3-ITD mutací. 50% z nalezených případů zvýšené exprese genu MN1 («meningioma 1»), 30,4% z nalezených případů zvýšené exprese genu ERG («ets related gene»), 39% z nalezených případů zvýšené exprese genu BAALC («brain and acute leukemia, cytoplastic») a 4,35% z nalezených případů zvýšené exprese genu EVI1 je asociováno s mutacemi genu CEBPA. U pacientů s mutovaným genem CEBPA bylo v 87% dosaženo remise a jen v 18.2% následoval relaps (zde byli vypuštěni transplantovaní pacienti). U zbytku pacientů s nemutovaným genem CEBPA bylo dosaženo remise v 61,4% a následoval relaps u 47,4% těchto pacientů (zde byli vypuštěni transplantovaní pacienti). Závěr: Potvrdili jsme, že mutace v genu CEBPA jsou příznivým prognostickým faktorem u pacientů s AML s normálním karyotypem. Zvýšená exprese genu MN1 je dalším prognostickým faktorem, který je z námi analyzovaných faktorů nejvíce asociován s mutacemi genu CEBPA.

P29/ 2157.

Detekcia molekulových prognostických markerov u pacientov s akútnou myeloblastovou leukémiou

Mikulášová Zuzana, Leitnerová Michaela, Čermák Martin, Svoreň Zdenko, Skultétiová Katarína, Copáková Lucia *(Oddelenie lekárskej genetiky, NOÚ, Bratislava - SVK)*

Úvod: Akútna myeloblastová leukémia (AML) je zhubné nádorové ochorenie krvotvorby charakterizované malígnou transformáciou hemopoetických progenitorových buniek. Približne u 55-60% prípadov je možné pomocou metód klasickej cytogenetiky, FISH a molekulovo-genetických metód identifikovať chromozomálne aberácie. Zmeny karyotypu v čase diagnózy sú veľmi dôležitým znakom pre stratifikáciu AML pacientov do jednotlivých prognostických skupín. Zvyšných 40-45% pacientov má normálny karyotyp a kedysi sa zaraďovali do skupiny so stredným rizikom. V posledných rokoch sa však identifikovali nové somatické mutácie v génoch NPM1, FLT3, CEBPA, MLL, NRAS a zmeny v expresii rôznych génov, ktoré napomáhajú pri roztriedení tejto heterogénnej

skupiny pacientov. Cieľom našej práce bola identifikácia prognosticky významných molekulových markerov, ktoré umožňujú stratifikáciu a monitorovanie priebehu ochorenia u pacientov s AML. Súbor pacientov: V priebehu rokov 2010-3/2012 sme na OLG NOÚ vyšetrili vzorky kostnej drene 59 pacientov s potvrdenou diagnózou AML: 40 dospelých pacientov- 20 mužov a 20 žien vo veku 18-82 rokov (medián: 50 rokov) a 19 detských pacientov- 8 dievčat a 11 chlapcov vo veku < 1-17 rokov (medián: 10 rokov). Materiál a metódy: Vzorky kostnej drene sme vyšetrili pomocou metód klasickej cytogenetiky, FISH a molekulovo-genetických metód: Real-Time RT-PCR- AML panel: BCR-ABL, AML1-ETO, PML-RARA, CBFB-MYH11; restrikčnej analýzy- FLT3-TKD a RT-PCR-MLL-TD, FLT3-ITD, NPM1. Výsledky: Zo súboru 59 pacientov sa nám u 14/59 (23,72%) pacientov nepodarilo stanoviť karyotyp, avšak u 10 pacientov sme pomocou FISH a Real-Time RT-PCR identifikovali chromozomálne aberácie a fúzne transkripty a u 3 pacientov sme detegovali mutácie v génoch FLT3 a NPM1. 32/45 (71,11%) pacientov malo cytogenetický nález. Zmeny karyotypu sme overili pomocou FISH a molekulovo-genetických metód. Najčastejšou aberáciou identifikovanou u 10/59 (16,95%) pacientov bola t(15;17)(q22;q21), pri ktorej dochádza k vzniku PML-RARA fúzneho transkriptu a je zároveň priaznivým prognostickým faktorom. Zvyšných 13/45 (28,88%) pacientov malo normálny karyotyp. Z tejto skupiny pacientov sme u 12 identifikovali somatické mutácie, a to u 1/12 MLL-TD, 2/12 FLT3-TKD, 2/12 FLT3-ITD, 2/12 NPM1, 2/12 FLT3-TKD a NPM1, 3/12 FLT3-ITD a NPM1. Záver: U väčšiny AML pacientov sa nám podarilo identifikovať genetické markery, ktoré umožňujú zaradenie pacienta do rizikovej skupiny a sledovanie priebehu ochorenie.

P30/ 2216.

Pozdní komplikace úspěšné léčby akutní myeloidní leukémie

Šustková Zuzana, Szotkowski Tomáš *(Hemato-onkologická klinika LF UP, Olomouc)*

Úvod: Současná kurativní léčba akutní myeloidní leukemie (AML) je založena na podávání intenzivní chemoterapie s rizikem vážných nežádoucích účinků, včetně účinků potenciálně kancerogenních a leukemogenních. S narůstající účinností protinádorové léčby a prodloužením života nemocných vzrůstá i riziko pozdních komplikací této léčby. Jedná se především o sekundární malignity včetně myelodysplastického syndromu (MDS), chronickou extenzivní reakci štěpu proti hostiteli (GvHD - graft versus host disease) a poruchy orgánových funkcí. Cíl: Cílem naší práce bylo zhodnotit typ a frekvenci pozdních komplikací úspěšné léčby AML, zhodnotit prognostické faktory u těchto nemocných a navrhnout možnosti prevence a řešení uvedených komplikací. Metodika práce: Od ledna 1996 do prosince 2008 byla na Hemato-onkologické klinice FNOL diagnostikována AML u 573 pacientů, ve věku 18-89 let (medián 60). 376 z nich (65,6%; medián věku 54 let) bylo léčeno kurativně, 256 (68% kurativně léčených) dosáhlo kompletní remise. V této skupině nemocných byl analyzován výskyt úmrtí z jiných příčin než relaps a progrese AML nebo akutní toxicita terapie a také výskyt závažných zdravotních komplikací (sekundární malignity, chronická extenzivní GvHD, závažné infekce, hormonální poruchy, postižení orgánových funkcí) v remisi základního onemocnění. Data byla analyzována k 1.3.2012. Výsledek: Pozdní komplikace úspěšné léčby se vyskytly u 24 nemocných, tj. 9,4% všech nemocných, kteří dosáhli kompletní remise. Medián věku při stanovení diagnózy těchto pacientů byl 43 let, při diagnóze pozdní komplikace 47 let. Nejčastějším typem byla sekundární malignita – 10 případů (včetně 3 nemocných se sekundárním MDS). U 7 alogenně transplantovaných nemocných došlo k rozvoji chronické extenzivní GvHD. Dalších 9 nemocných mělo či má různé projevy pozdní orgánové toxicity. U 1 nemocného byl zaznamenán výskyt všech 3 uvedených druhů komplikací. Příčinou smrti se některá z výše uvedených komplikací stala u 9 nemocných (5x sekundární malignita, 3x GvHD, 1x infekce). K datu analýzy žilo celkem 92 nemocných (tj. 35,9% z nemocných, kteří dosáhli KR a 24,4% z celkového počtu kurativně léčených nemocných) v trvající kompletní remisi AML, u 15 z nich (16,3%) byla zjištěna některá z pozdních komplikací léčby. Vypracováno s podporou grantu IGA UP LF-2012-007

HEMOSTÁZA

P31/ 2123.
Simplified platelet sample preparation for proteomic studies
Reicheltová Zuzana, Májek Pavel, Pečánková Klára, Riedel Tomáš, Suttnar Jiří, Dyr Jan Evangelista
(Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague)

The analysis of platelet proteomes holds great promise in identifying novel cardio-markers for the screening, diagnosis, etc. Since platelets are easily activated by various agonists, also due to the conditions during platelet isolation and storage, then platelet proteome changes can occur. Therefore, the appropriate retrieval and storage conditions of platelet samples are inevitable pre-requisites for proper proteomics workflow, especially following blood collection during (emergency) management of a patient with an acute coronary syndrome. We have proposed a protocol suitable for platelet collection and handling for a large case-control proteomic study, which would be feasible for both clinical collection and protein profiling. Blood was collected by venipuncture into tubes coated with EDTA; and platelet rich plasma (PRP) was obtained by centrifugation. PRP was then stored refrigerated in closed Falcone tubes. Platelets were isolated from the PRP by centrifugation, the platelet pellet was resuspended in a PBS/EDTA (4 mM) isolation buffer; and the centrifugation--resuspension step was repeated once again. Finally, the pellet of washed platelets was immediately frozen and stored at -70°C until its use for 2D SDS-PAGE. All samples were obtained with informed consent from ten healthy volunteers who had not been on medication for the previous 14 days. PRP was prepared and stored in Falcon tubes for 0, 1, 2, 3, 5, and 7 days under refrigeration. Proteome changes were examined using 2D SDS-PAGE (10% polyacrylamide gel, IEF pI 3-10). The gels were stained with colloidal Coomassie blue stain and evaluated using Progenesis SameSpots software. Spots that differed significantly in the gels of fresh and stored platelet samples were excised, digested by trypsin, and further analyzed using nanoLC-MS/MS. Individual proteins were identified using MASCOT and the SWISS-PROT. During the 7-day follow-up period, we found 20 spots that differed significantly. During the first two days of PRP storage in test tubes; however, only 9 spots significantly differed in all samples. In these spots we identified 14 different proteins. Therefore, we present a protocol for two days platelet rich plasma storage which is suitable for platelet proteomic studies.
This study was supported by the Czech Science foundation P205/12/G118.

P32/ 2147.
Fibrin networks containing extracellular matrix proteins for blood vessel engineering
Riedel Tomáš, Brynda Eduard, Chlupáč Jaroslav, Filová Elena, Bačáková Lucie, Dyr Jan Evangelista *(Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague; Institute of Macromolecular Chemistry, AS CR, v.v.i., Prague; Institute of Physiology, AS CR, v.v.i., Prague)*

Synthetic vascular prostheses, mostly made of polytetrafluoroethylene or polyethyleneterephtalate, do not support adhesion and growth of endothelial cells and formation of the endothelium. When exposed to blood, any surface other than that of undamaged vascular wall endothelium induces blood coagulation. Fibrin network formed after injury to stop bleeding, later, serves as a temporary scaffold for cells repairing the damaged vessel. These processes help organism to maintain haemostasis after vessel injury, however, they are a source of troubles when synthetic materials are used in cardio-vascular surgery. Particularly, small diameter vessel grafts displayed high failure ratios due to thrombus formation and perianastomotic hyperplasia. A confluent, semipermeable layer of endothelial cells (EC) grown in vitro on the inner side of grafts can solve the problems. The aim of the study was to prepare fibrin-based two- and three-dimensional assemblies coated with extracellular matrix proteins (collagen, laminin, fibronectin) and to evaluate endothelial cell adhesion, proliferation and differentiation on these assemblies in vitro. Modification of fibrin with collagen, laminin and fibronectin was followed by the surface plasmon resonance technique and the morphology of the layers was observed using atomic force microscopy. On all fibrin assemblies, endothelial cells reached higher cell densities compared to polystyrene after 3 and 7 days of culture. Immunoflurescence staining showed better assembly of talin and vinculin into focal adhesion plaques as well as more apparent staining of VE-cadherin on surface-attached three-dimensional fibrin and protein-coated fibrin assemblies. In addition, on these samples, endothelial cells contained a lower concentration

of ICAM-1, measured by ELISA. Higher concentrations of CD31 and von Willebrand factor were found on 3D fibrin coated with laminin and on 3D fibrin coated with type I collagen, respectively. The results indicate that extracellular matrix protein-coated 2D and 3D fibrin assemblies could be used for applications where endothelialisation of various prostheses is desirable.

P33/ 2149.
Modifikace fibrinogenu látkami simulující oxidační stress
Štikarová Jana, Suttnar Jiří, Dyr Jan Evangelista *(ÚHKT, Praha)*

Fibrinogen, plasmatický glykoprotein o molekulové hmotnosti 340 kDa, patří mezi proteiny náchylné k působení oxidačního stresu. Fibrinogen hraje zásadní roli v sekundární hemostase, kdy po odštěpení fibrinopeptidů z jeho molekuly aktivovaným trombinem vzniká fibrin, který polymeruje a vytváří fibrinovou síť. Je velmi důležitý také v primární hemostáze, kde se aktivované krevní destičky váží přes povrchový receptor GPIIb-IIIa na fibrinogen. Oxidační stres je chápán jako stav organismu, při kterém dochází k nekontrolovatelné tvorbě volných radikálů. Ty mohou reagovat s biomolekulami a tím pozměnit jejich chemické a fyzikální vlastnosti. Během jejich působení na biomolekuly může docházet k modifikaci postranního řetězce aminokyselin, prokřížení nebo k neenzymatickému štěpení. Důsledkem může být narušení biologické funkce. V této práci byly studovány funkční i strukturní změny fibrinogenu vystaveného podmínkám oxidačního stresu. Oxidační modifikace byly vyvolány současným působením dvou různých činidel – malondialdehydu (MDA) a chlornanu sodného (NaOCl). Tato modifikační činidla byla vybrána tak, aby simulovala možné reakce probíhající v organismu (MDA je jedním z produktů lipoperoxidace; NaOCl simuluje působení chlornanových aniontů uvolňovaných například při aktivaci buněk imunitního systému). K popsání rozsahu modifikace byla použita metoda stanovení karbonylových skupin. U modifikovaného i kontrolního fibrinogenu byla stanovena OFR (oxidized fibrinogen reactivity). Při statické adhezi byl sledován počet adherovaných krevních destiček na sorbovaný fibrinogen. K dynamické adhezi byl použit přístroj „Cone and Plate“, který dokáže simulovat fysiologické podmínky průtoku krve. Dynamická adheze probíhala v přítomnosti modifikovaného, kontrolního nebo nativního fibrinogenu. Tvorba fibrinové sítě byla sledována pomocí zákalových křivek. Působením modifikačních látek vznikly nové karbonylové skupiny. Bylo zjištěno, že modifikovaný fibrinogen vykazoval vyšší OFR než kontrolní. Statická i dynamická adheze modifikovaného fibrinogenu se odlišuje od kontrolního. Odlišná byla i tvorba fibrinové sítě. Zjištěná data ukazují na možnost ovlivňování fibrinové sítě a adheze destiček v místě tvorby reaktivních kyslíkových a dusíkatých látek při patologických dějích v organismu.
Tato práce vznikla za podpory grantu GA ČR P205/12/G118.

P34/ 2156.
Má syndróm lepivých doštičiek (SPS) u darcu vplyv na rozvoj venóznej trombózy u príjemcu aferetického trombocytárneho koncentrátu?
Pizurová Renáta, Pietrzyková Mária, Kotuličová Daniela *(Klinika hematológie a transfuziológie, Univerzitná nemocnica, Martin – SVK)*

Úvod: Syndróm lepivých doštičiek (SPS) predstavuje vrodený, autozómovo dominantne dedičný trombofilný stav, ktorý vedie k abnormálnej agregabilite krvných doštičiek. Táto porucha môže ostať klinicky nemá alebo sa manifestuje rozvojom tromboembolickej príhody. SPS spôsobuje približne 13,2- 14,1% zo všetkých inak nevysvetliteľných žilových trombóz. U asymptomatických darcov krvi s náhodne zisteným SPS bolo pri aferetických odberoch trombocytov častejšie zaznamenané zvýšené zhlukovanie trombocytov v odberovom vaku. Preto bola vyslovená hypotéza o vplyve hyperagregability darcovských trombocytov na rozvoj tromboembolických komplikácii u príjemcu aferetického trombocytárneho koncentrátu. Cieľ: Retrospektívne odsledovať výskyt tromboembolických príhod u pacientov, ktorým boli podané aferetické trombocytárne koncentráty od darcov, u ktorých bol náhodne dokázaný SPS a zhodnotiť možný vplyv SPS u darcu na rozvoj venóznej trombózy u príjemcu trombocytárneho aferetického koncentrátu. Pacienti a metódy: Sledovaná skupina pozostávala z 12 darcov, u ktorých bolo zaznamenané zvýšené zhlukovanie trombocytov v odberovom vaku pri aferetickom odbere trombocytov. Podľa prítomnosti SPS boli rozdelení na 2 skupiny: s dokázaným SPS (n=5), a bez SPS (n=7). Kontrolná skupina bola tvorená darcami bez SPS (n=7), u ktorých nebolo pozorované zhlukovanie trombocytov vo vaku po odbere. Diagnóza SPS bola založená na dôkaze hyperagregability trombocytov pri vyšetrení plazmy bohatej na doštičky svetel-

nou agregometriou (PACKS-4) metódou podľa Mammena. Retrospektívne bolo vyhodnotených spolu 72 podaných aferetických trombocytárnych koncentrátov (24 koncentrátov v každej hodnotenej skupine) jednotlivým pacientom so zameraním na výskyt tromboembolických komplikácií po podaní a prítomnosť iných rizikových faktorov. Výsledky: Z celkovo 30 pacientov u 4 pacientov (t.j.13,3 %), ktorým boli podané aferetické trombocytárne koncentráty od darcov s dokázaným SPS, bola zaznamenaná novozistená akútna venózna trombóza, v ďalších 2 skupinách nebola u pacientov zaznamenaná následne žiadna tromboembolická komplikácia. Záver: Pozorované prípady venóznej trombózy u príjemcov aferetického trombocytárneho koncentrátu od darcu s SPS by mohli poukazovať na možný vplyv hyperagregability darcovských trombocytov. Výsledky pilotnej štúdie by bolo vhodné overiť na väčšom súbore.

P35/ 2200.
Rozlišení endogenních a exogenních příčin ASA rezistence in vitro
Úlehlová Jana, Slavík Luděk, Krčová Věra, Hluší Antonín, Procházková Jana, Palová Miroslava *(HOK, FN, Olomouc)*

Souhrn: Akutní infarkt myokardu patří podle nové klasifikace pod pojem akutní koronární syndrom, který není chápán jako jednorázová ukončená příhoda, ale jako epizoda v průběhu ischemické srdeční choroby (ICHS), která vyžaduje další charakteristiky k posouzení svého významu. S rizikem aterotrombogeneze, která se podílí na vzniku ICHS jsou dnes spojovány i mutace genu receptorů destiček jako je polymorfismus enzymu cyklooxygenázy 1 (COX-1). Běžnou součástí druhotné profylaxe akutního koronárního syndromu je duální antiagregační léčba. Jelikož genetická predispozice v polymorfismu destičkového receptoru COX–1 není jedinou příčinou rezistence, pokusili jsme se využít impedanční agregometrie po podání ASA měřena po stimulaci arachidonovou kyselinou k rozlišení exogenních od endogenních příčin selhání protidestičkové léčby. Materiál a metody: Vyšetřili jsme skupinu 90 pacientů s akutní koronárním syndromem, kteří užívali jako antiagregační terapii ASA. Pomocí impedanční agregometrie na analyzátoru Multiplate, po podání ASA, byla měřena agregace trombocytů po stimulaci arachidonovou kyselinou (1 µmol/l). Základ tvořily pilotní poznatky získané z měření vlivu ASA *in vitro*. Pro měření byli dále vybráni pacienti, kteří neodpovídali na protidestičkovou léčbu. Vzorky jejich krve byly inkubovány s příslušným množstvím ASA (18,2 mg/ml ředěné 1:2, 1:4, 1:8 a 1:16 roztokem NaCl) po dobu 5 minut. Následně byla detekována změna agregační schopnosti po přidání kyseliny arachidonové na přístroji Multiplate. Výsledky: Pacienti na účinné léčbě ASA mají inhibici agregace pod 220 AUC/min. Výsledná data prokazují, že řada pacientů při testech in vitro odpovídá na léčbu. Absolutní data budou prezentována v tomto sdělení. Závěr: Prostřednictvím této metody lze vyloučit poruchu destičkového receptoru, a tím odhalit endogenní příčiny rezistence (nepravidelný příjem léčiva či poruchu vstřebávání). U většiny pacientů byla detekována dostatečná odpověď na přítomnost ASA. V jednom případě je však patrná změna aktivace destičky až při vysoké dávce ASA. Zde lze usuzovat na již zmíněné příčiny selhání protidestičkové terapie a je nutné změnit léčbu. Neúčinnost preventivního podávání ASA může být způsobena ASA rezistencí. Příčinou ASA rezistence může být řada faktorů jako je nízká absorpce, neadekvátní dávkování ASA, genetické faktory či interakce s ostatními medikamenty pacienta.
Podpořeno grantovým projektem LF-2012-007.

P36/ 2227.
Směsné testy – jednoduchý princip, obtížná interpretace
Janek Daniel, Amborská Petra *(Hematologicko-transfuzní oddělení, NsP, Karviná)*

Prodloužení screeningových koagulačních časů (PT, aPTT a/nebo trombinový čas) je způsobeno přítomností inhibitoru koagulace nebo deficitem koagulačního faktoru. Klíčovým testem při vyšetřování prodloužených koagulačních časů je směsný test, jehož cílem je zjištění, zda iniciálně prodloužený čas koagulace je v testu zkrácen či korigován přidáním ekvivalentního množství normální poolované plazmy (NPP) do reakce. V případě deficitu koagulačních faktorů dochází zpravidla k úplné normalizaci prodloužených koagulačních časů, neboť již 50% aktivita kteréhokoli z faktorů koagulační kaskády je schopna zajistit normální čas srážení v příslušných testech. V přítomnosti inhibitoru koagulace naopak ke korekci koagulačních časů nedochází. Každá laboratoř si stanoví svá vlastní kriteria ke zhodnocení, zda prodloužený čas je ve směsném testu „dostatečně" korigován. Autoři ve svém krátkém sdělení retrospektivně vyhodnotili provedené směsné testy a porovnali jejich závěry při použití různých interpretačních kritérií.

LABORATORNÍ HEMATOLOGIE

P37/ 2206.

Methemoglobinémie způsobená sníženou aktivitou cytochrom-b5-reduktázy: jedna nová mutace CYB5R3 genu

Partschová Martina, Mojzíková Renáta, Pospíšilová Pavla, Pospíšilová Dagmar, Masárová Katarína, Divoký Vladimír *(Ústav biologie, LF UP; Dětská klinika, FN a LF UP, Olomouc – CZE, Klinika hematológie a transfuziológie FNsP, Bratislava – SVK)*

Úvod. Methemoglobin (MetHb) je za normálních podmínek v organismu odbouráván cytochrom-b5-reduktázou (Cb5R, NADH-methemoglobinreduktáza). Nedostatek Cb5R vede k vrozené autozomálně recesivní methemoglobinémii (RCM) projevující se zvýšenou hodnotou MetHb (> 1 %). Jsou známy 2 typy RCM: a) deficit Cb5R postihuje jen erytrocyty (Typ I); b) deficit postihuje všechny buňky (Typ II). Hlavním projevem RCM typu I je cyanóza (MetHb 25 – 40 %), která je u RCM typu II doprovázená mentální retardací a neurologickými symptomy. Existuje ještě methemoglobinémie typu III, která je spojena s výskytem hemoglobinu (Hb) M a je autozomálně dominantní. Vrozené methemoglobinémie je nutné odlišit od těch získaných nebo asociovaných s přítomností nestabilního Hb. Pacienti a metody. 1. pacient: 15-letý chlapec s MetHb 7 - 11 %. Viditelným projevem bylo namodralé zbarvení kůže; účinky MetHb jsou redukovány kys. askorbovou. 2. pacient: náhodný záchyt 75-leté ženy s MetHb 11 % bez klinických projevů. V obou případech byla vyloučena hemoglobinopatie. Aktivita erytrocytární Cb5R byla stanovena spektrofotometricky pomocí artificiálního substrátu ferrikyanidu. Genomická DNA byla použita pro sekvenační analýzu. Výsledky. U prvního pacienta byla stanovena snížená aktivita Cb5R (3 IU/g Hb; kontrolní rozmezí 8,26 – 12,39 IU/g Hb). Molekulárně-genetická analýza potvrdila, že je heterozygotem pro známý polymorfizmus (c. G132A resp. p. P44P) a novou mutaci (A400G resp. p. M134V) v CYB5R3 genu. Asymptomatická matka má normální aktivitu Cb5R a není nositelkou ani jedné ze substitucí (otec není k dispozici). U druhé pacientky bylo prokázáno, že je heterozygotem pro substituci c. G890A tj. p. R297H. Stanovení aktivity Cb5R nebylo možné zajistit. Závěr. Mutace M134V se nachází na C-konci beta-řetězce FAD--vazebné domény, který je spojen krátkou smyčkou s NADH-vazebnou doménou. Záměna by mohla vést k oslabení kontaktu mezi oběma doménami a ovlivnit tak stabilitu enzymu. Záměna R297H je situována ve FAD-vazebné doméně v blízkosti vazebného místa pro NADH a mohla by nepřímo ovlivňovat interakci mezi oběma kofaktory. Mutace M134V nebyla dosud popsána. Substituce c. G890A pro záměnu R297H je uváděna v databázi (www.ensembl.org) jako vzácný SNIP. Oba pacienti vykazují mírnou resp. asymptomatickou methemoglobinémii; v recesivní konfiguraci bez dalších funkčních studií nelze kauzalitu mutací CYB5R3 genu jednoznačně hodnotit. Podpořeno MZ ČR NT11208 a IGA UP LF_2012_016.

P38/ 2228.

Izolácia DNA zo slín na HLA typizáciu u leukopenických a transfúzne závislých pacientov

Farkašová Denisa, Kušíková Mária, Stemnická Denisa, Al Sabty Firas, Skraková Marcela, Mistrík Martin *(Klinika hematológie a transfuziológie, LFUK, SZU a UNB, Národný register darcov kostnej drene, Nemocnica sv. Cyrila a Metoda, Bratislava – SVK)*

Úvod: u leukopenických a transfúzne závislých pacientov, ktorí sú indikovaní na alogénnu transplantáciu krvotvorných buniek (TKB) nie je vždy možné vyizolovať dostatočne koncentrovanú a čistú DNA zo vzorky krvi z dôvodu leukopénie a alokontaminácie leukocytmi darcov. HLA typizácia pacientov molekulovo – biologickými metódami si vyžaduje dostatočné množstvo a koncentráciu DNA. Cieľ: zhodnotenie izolácie DNA zo slín u leukopenických a transfúzne závislých pacientov. Metódy: súbor našich pacientov tvorí 5 pacientov s hematoonkologickými ochoreniami, ktorí boli indikovaní na alogénnu TKB. Pre ťažkú leukopéniu nebolo možné vyizolovať DNA z periférnej krvi a preto sme zvolili alternatívnu metódu izolácie DNA zo slín použitím odberového kitu OG-510 od firmy DNA genotek. DNA sme izolovali podľa protokolu k danému kitu. Efektivita izolácie DNA bola hodnotená spektrofotometrickou analýzou a následne sa HLA typizácia vykonávala PCR-SSP metódou. Výsledky: použitím kitu OG-510 na izoláciu DNA z 2ml slín sme u všetkých pacientov vyizolovali 200µl DNA. Spektrofotometrická analýza ukázala, že koncentrácia DNA je od 122 ng/µl – 214 ng/µl a index čistoty je od 1,56- do 1,7. Vyizolovaná DNA bola následne nariedená na koncentráciu 15 ng/µl

a použitá na HLA typizáciu metódou PCR-SSP. Úspešnosť PCR reakcii bola 100%. Pre porovnanie: pri izolovaní DNA cez kolónky z periférnej krvi u zdravých darcov s normálnym počtom leukocytov vyizolujeme 200µl DNA s koncentráciou 25-30 ng/µl a indexom čistoty 1,7. Záver: metóda izolácie DNA zo slín pre potreby transplantačného programu u leukopenických a transfúzne závislých pacientov sa na našom pracovisku osvedčila. Izolácia DNA zo slín vedie k získaniu vysokého množstva koncentrovanej a čistej DNA, ktorá sa používa v molekulárno – biologických metódach HLA typizácie. HLA typizácia pacientov nie je obmedzená pri leukopénii a po podaní transfúznych liekov.

POUZE PUBLIKACE

N 2150.

Kongenitální dyserytropoetická anémie IV. typu (CDA-IV) se závažnou perinatální prezentací

Lejhancová Kateřina, Malý Jan, Špaček Josef, Fátorová Ilona, Honzík Tomáš, Šimáková Eva *(Dětská klinika, FÚP, OKH, FN, Hradec Králové; KDDL, VFN, Praha)*

Úvod: Kongenitální dyserytropoetické anémie (CDA) jsou členěny do základních 3 kategorií, CDA I – III. Je popsáno několik dalších vzácných variant, které mají specifickou klinickou a morfologickou prezentaci. Demonstrujeme případ novorozence s CDA IV. typu. Kasuistika: V rodině probanda bylo úmrtí novorozené sestry pod obrazem kongenitálního hydropsu, kardiomyopatie a extramedulární hematopoesy(EMH)v roce 2006. Naše pacientka se rodí v roce 2011 s identickýcm klinickým obrazem a bicytopenií.Při podpůrné léčbě dochází postupně ke spontánní úpravě stavu, regresi organomegalie a kožních ložisek EMH,stabilizaci kardiálních funkcí a úpravě trombocytopenie. U dítěte přetrvává normocytární anemie se závislostí na transfuzí erytrocytární masy (EM). Aspirát kostní dřeně v 3. měsíci věku prokazuje přítomnost 25% doujaderných normoblastů. Modifikovaný Hamův test byl negativní, nebyly laboratorní známky hemolýzy. Od 6. měsíce života se v krevním obraze (KO) objevila elevace retikulocytů, nekonstantně normoblasty. Laboratorně již pozitivní známky hemolýzy. V kostní dřeni v 7. měsíci života tvořila erytroidní řada 80% s 20% dvoujaderných normoblastů. Přítomny i normoblasty tříjaderné a normobalsty s hvezdičkovitými jádry. Elektronový mikroskop prokazuje v erytroblastech efekt tzv. „double membrane“, povrchové deformity a cytolysosomy. Ve věku 7 měsíců je pacientka trvale závislá na převodech EM, s narůstající splenomegalií. Fetální hemoglobin je ve věkové normě, exprese CD 44 na erytrocytech fyziologická. Psychomotorický vývoj je velmi příznivý. Diagnosu pacientky uzavíráme jako CDA IV. typu. Probíhá testování genu SEC23B. Zpětným vyšetření byl zjištěn histologický obraz dyserytropoesy i v post mortem odebraných vzorcích kostní dřeně zemřelé sestry. Závěr: Rodinný výskyt CDA IV. typu s kongenitálním hydropsem, masivní EMH a kardiomopatií. Kardiomyopatie nebyla dosud u CDA IV.typu explicitně popsána.

N 2190.

Fulminantne prebiehajúca autoimunitná hemolytická anémia s multiorgánovým zlyhaním (kazuistika)

Lukáš Jozef, Rimajová Veronika, Zwiewka Michal *(KHaT, UNB sv. CaM, Antolská, Bratislava – SVK)*

44 ročný pacient bez vážnejšieho predchorobia bol hospitalizovaný pre 2 dni trvajúcu slabosť, nechutenstvo, subfebrílie a výrazne ikterickú farbu kože. Pri príjme v hemograme prítomná leukocytóza, makrocytová anémia ťažkého st. (Hb: 45 g/l), absolútne retikulocyty a trombocyty v norme. V biochemických parametroch dominovali extrémne zvýšené hladiny bilirubínu (1023 umol/l) s prevahou nekonjugovanej formy (556 umol/l) a ostatné známky intravaskulárnej hemolýzy - vysoká laktát dehydrogenáza (35 ukat/l), spotrebovaný haptoglobín a hemoglobinúria. Náter periférnej krvi bol bez schistocytov. Imunohematologickým vyšetrením sme potvrdili pozitivitu PAT a NAT s nálezom polyšpecifických tepelných autoprotilátok (IgG, C3d) a stanovili dg. AIHA. V rámci pátrania po vyvolávajúcej príčine realizované celotelové CT vyšetrenie, ktoré bolo okrem splenomegálie v norme. Lieková anamnéza bez pozoruhodností - dlhodobo v liečbe beta blokátor pre vyššie hodnoty krvného tlaku. Pacient bol refrakterný na iniciálnu 3.dňovú pulznú kortikoterapiu metylprednisolonom (1g/d) a v rámci druholíniovej liečby podaná monoklonálna antiCD20 protilátka – rituximab, intravenózny imunoglobulín, cyklofosfamid a realizované výmenné plazmaferézy. Napriek komplexnej farmakologickej liečbe sa hemolýza zhoršovala, hodnoty hemoglobínu aj pri intenzívnej hemosubstítúcii klesali. Na 7.deň hospitalizácie sa u pacienta rozvinula oligúria na podklade akútnej tubulárnej nekrózy a porucha vedomia pri metabolickom rozvrate vnútorného prostredia. Pacient exitoval tesne pred preložením na chirurgický sál, kde sa mala z vitálnej indikácie realizovať splenektómia. Záver: Prípad je okrem fulminantného a refraktérneho priebehu zaujímavý extrémne vysokou hyperbilirubinémiou, ktorá sa v literatúre popisuje pri hemolytických anémiach prebiehajúcich v koincidencii s poruchou metabolizmu bilirubínu - napr. Gilbertov syndróm.

N 2153.

CML s dominující trombocytózou, abnormálním cytogenetickým nálezem a micro-BCR přestavbou

Strnková Aneta, Roszková Barbora, Bóday Arpád, Macková Jitka, Cibulková Petra, Richterová Radmila, Plonková Hana, Baník Martin, Stoklasová Martina, Gumulec Jaromír *(P&R LAB a.s., Laboratoř cytogenetiky, Laboratoř molekulární biologie, Nový Jičín; Ústav klinické hematologie, FN, Ostrava)*

Úvod: Diagnóza chronické myeloidní leukémie je asociována s nálezem Filadelfského (Ph) chromosomu, který vzniká reciprokou translokací mezi chromosomy 9 a 22 a vytváří fúzní gen BCR/ABL. Velikost sledovaného transkriptu se může lišit podle oblasti zlomů, ke kterým dochází v genech BCR a ABL. Podle zlomových míst v BCR genu rozlišujeme oblasti nazývané M-BCR, m-BCR a µ--BCR. Vznikající proteiny se pak liší velikostí a transformačním potenciálem. M-BCR vede ke vzniku transkriptů e13a2 nebo e14a2 a proteinu p210,typické pro CML. Při m-BCR přestavbě se tvoří transkript e1a2 a protein p190,typický pro akutní lymfoblastickou leukemii. Třetí vzácnou je µ-BCR, která dává vznik transkriptu e19a2 a proteinu p230, vzácně se objevující u pacientů s CML s významnou neutrofilní maturací a/nebo trombocytózou. METODY: Karyotyp pacienta byl stanoven z kultivované kostní dřeně klasickou cytogenetickou analýzou a pomocí M-FISH (multicolour fluorescence in situ hybridization). K detekci přestavby BCR/ABL na interfázních jádrech (I-FISH) i metafázích byla použita dual fusion sonda (Metasystems XL BCR/ABL Plus). Přítomnost specifické mRNA byla v buňkách periferní krve detekována za použití metody multiplex reverzně transkripční PCR se specifickou sadou primerů. Přesná lokalizace zlomů v genech BCR a ABL byla identifikována přímým sekvenováním. VÝSLEDKY: Vyšetřením karyotypu a M-FISH byl u pacienta identifikován komplexní karyotyp. FISH analýza odhalila BCR/ABL fúzní signály na dvou dicentrických chromosomech tvořených Ph chromosomy a chromosomy 19 a pouze zelený signál na dlouhém raménku chromosomu 9 ukazující na deleci sekvencí proximálně od zlomu. Paralelní molekulární analýzou byl detekován transkript velikostně odpovídající přestavbě µ-BCR (e19a2), která byla potvrzena přímou sekvenací příslušného produktu. ZÁVĚR: V této práci předkládáme výsledky vyšetření abnormálního genetického nálezu u pacienta s CML manifestovanou významnou izolovanou trombocytózou a negativitou JAK2 V617F resp. JAK2 v exonu 12. Změny v karyotypu jako jsou zisk Ph chromosomu a delece na dlouhém raménku chromosomu 9 mohou způsobit atypický obraz při I-FISH analýze, což může vést k chybné interpretaci výsledků. V takovém případě by měly být výsledky hodnoceny nejen ve spojení s analýzou metafází, ale rovněž v kontextu s molekulárně biologickými výsledky, které odhalí přesnou lokalizaci zlomů v genech BCR a ABL, což má pro pacienta konkrétní prognostický, diagnostický a léčebný význam.

N 2205.

Metachronní výskyt CLL u nemocné s neléčenou hairy cell leukémií

Novák Martin, Procházka Vít, Urbanová Renata, Pikalová Zuzana, Holzerová Milena, Humplíková Lenka, Prouzová Zuzana, Lapčíková Anna, Indrák Karel *(Hematoonkologická klinika, FN a LF UP, Olomouc; Ústav klinické a molekulární patologie, LF UP, Olomouc)*

Duplicity hematologických malignit jsou relativně často popisovaným fenoménem. V tomto případě prezentujeme raritní metachronní výskyt dvou klonálně nepříbuzných B-lymfoproliferací. 58-letá žena byla referována na naši ambulanci v září 2004 pro nález asymptomatické splenomegalie. Krevní obraz (KO) byl až na lehkou trombocytopenii (119*10^9/l), zcela v normě, v nátěru periferní krve (PK) byly patrné atypické vilózní lymfocyty (10 %). Adenomegalie nebyla přítomna a slezina dle UZ dosahovala 16cm. Průtoková cytometrie (FC) odhalila 14 % lymfocytů s imunofenotypem CD19+/CD20+/CD22+/FMC7+/ CD11c+/CD25+/CD103+/DBA-44+. Nález byl uzavřen jako typická hairy cell leukémie (HCL). Kritéria pro zahájení léčby nebyla splněna, nemocná byla sledována. Pro prostupnou progresi lymfocytózy (až 12,2*10^9/l) a záchyt atypických lymfocytů s úzkým lemem plasmy a Gumprechtových stínů v nátěrech PK byla v 6/2011 opakována FC s průkazem druhého klonu buněk s fenotypem CD19+/CD20+/CD23+/CD5+. Stav byl uzavřen jako duplicitní chronická lymfocytární leukémie (CLL). Z celkového počtu lymfocytů v PK tvořila populace CLL 67 % a populace HCL 9 % buněk. Dle FISH detekován malý klon buněk s delecí 13q. Stanovení mutačního stavu IgVH bylo provedeno metodou multiplexní PCR s následným sekvenováním a porovnáním s databází IMGT. Byly detekovány dva klony s nemutovaným stavem IgVH: VH3-11 UM-IgVH (99,3 %) a VH1-

24 UM-IgVH (98,3 %). V rámci diferenciální diagnostiky lymfocytózy byl u pacientky s typickou HCL odhalen duplicitní výskyt CLL. Synchronní výskyt HCL a CLL je raritní, metachronní výskyt chronické lymfatické leukémie v terénu neléčené hairy cell leukémie dosud nebyl ve světové literatuře publikován. Výzkum byl podporován grantem LF-2012-007

N 2121.

Dermatotoxicita při liečbe bendamustínom

Večeřova Daniela, Chudej Juraj, *(FN, Trenčín – SVK; KHaT, UN, Martin – SVK)*

Bendamustín (Levact) je efektívne cytostatikum zo skupiny alkylačných látok s dobrou účinnosťou a s prijateľným rizikom toxicity, vhodný aj u starších a polymorbídnych pacientov. Indikácie liečby B: • 1. línia liečby pacientov s CLL, u ktorých nie je vhodná liečba s fludarabínom • monoterapia u pacientov s indolentným NHL s progresiou počas liečby alebo recidívou ochorenia do 6 mesiacov po liečbe rituximabom(R) alebo režime zahŕňajúcom R • liečba I. línie u pacientov s mnohopočetným myelómom u pacientov do 65 r., ktorí nie sú vhodní na TKB a majú polyneuropatiu, ktorá kontraindikuje podanie talidomidu a bortezomibu. V kazuistike popisujeme prípad 71 r. polymorbídnej pacientky s CLL Rai III liečenej kombináciou rituximab(R)+bendamustin(B), ktorá bola sprevádzaná kožnou reakciou. Z obavy pred kombináciou tumor lysis syndromu a nežiadúcich účinkov R sme najskôr podali samotný B. Aby sme predišli kožným reakciám nepodávali sme alopurinol. Prvý aj 2. cyklus CHT bol dobre tolerovaný, dyspepsia a nauzea bola zvládnutá podaním granisetronu p.o. Už týždeň po podaní B- významný pokles počtu lymfocytov. Nebola pozorovaná hematologická toxicita. Vyskytla sa kožná reakcia (grade3) po 3., resp. 4. cykle CHT, ktorá bola dôvodom na ukončenie liečby B. V klinických štúdiách aj v postmarketingovom sledovaní sú známe vedľajšie reakcie po podaní B spolu s inými liekmi. Výskyt dermatotoxicity u pacientov s CLL liečených B asi 8%, ťažké kožné reakcie u 3% pacientov. Liečba musela byť ukončená u 3,9% pacientov pre alergické reakcie. Odporúčania pri podávaní CHT s benadmustínom v prevencii kožných reakcií: 1. nepodávať alopurinol 2. ATB len nevyhnutne (ak je možné vyhnúť sa cotrimoxazolu, chinolónom) 3. v prípade kožných reakcií nepodávať v jeden deň súčasne rituximab a bendamustín -modifikovať R-deň 1. + B deň1., 2. R--deň 1., B-deň 2.a 3. 4. v prípade kožných prejavov v prevencii podať prednison 60 mg/m2p.o. večer pred podaním B, ráno 30 min pred podaním B prednison, prednisolon v dávke 60mg i.v./m2 5. na zvládnutie prípadnej rozsiahlejšej kožnej lézie podávať kortikoidy i.v., p.o + lokálna liečba 6. v prípade dermatotoxicity aj po príprave- liečbu B ukončiť Záver: Benadmaustín je účinné „staronové“cytostatikum s prijateľným rizikom toxicity.

N 2189.

Z dárce kostní dřeně pacientem transplantační jednotky

Hrabětová Marcela, Vokurka Samuel, Koza Vladimír, Svoboda Tomáš, Jindra Pavel, Karas Michal, Navrátilová Jana, Schützová Miroslava, Lysák Daniel, Steinerová Kateřina *(Hematologicko-onkologické odd., FN, Plzeň)*

Úvod: Nedílnou součástí transplantačního programu jsou dárcovství a odběry krvetvorných buněk. Dárce příbuzenský i nepříbuzenský musí být před vlastním odběrem řádně vyšetřen k minimalizaci rizik souvisejících s odběrem. Ani provedená předodběrová vyšetření však nemohou zcela zaručit, že dárce je opravdu zdráv a neonemocní v následujících letech nemocí, která nebyla v době odběru diagnostikovatelná běžně prováděnými testy, či ještě byla pod hranicí možné detekce. Tuto situaci popisuje naše kazuistika. Případ: muž nar. 1960, dárce krve a dárce kostní dřeně Českého národního registru dárců dřeně (ČNRDD) podstoupil v 9/2000 odběr pro nepříbuzného pacienta. Všechna provedená předodběrová vyšetření byla bez patologického nálezu, vlastní odběr kostní dřeně v celkové anestezii proběhl bez komplikací. V 9/2006 byla při vyšetření krevního obrazu před darováním krve zachycena leukocytóza s lymfocytózou (leu 11,9x10^9/l, z toho lymfo76%) a následně potvrzena CLL klin. st. I dle Raie, bez celkových příznaků, s vysokou expresí CD38, bez exprese ZAP 70, s nemutovaným stavem IgVH genu, delATM(11q22), delp16,p15, s bulky uzlinovým postižením retroperitonea. V 10/2010 1.relaps nemoci s transformací CLL do paraimunoblastické formy, po 2. linii chemoimunoterapie (5 cyklů R-CHOP) bylo dosaženo parciální remise. Byla indikována a v 11/2011 také realizována nepříbuzenská alogenní transplantace krvetvorných buněk (HLA identický bratr nezpůsobilý k dárcovství pro hepatitis B) s dosažením přihoje-

ní štěpu a kompletní cytologickou a cytogenetickou remisí CLL. U tohoto dárce-pacienta byl retrospektivní analýzou DNA prokázán klon CLL ve vzorku jeho krve z období dárcovství dřeně v r. 2000. Příjemkyně jeho kostní dřeně (transplantace pro B-ALL, Ph pozitivní) zemřela v r. 2003 v souvislosti s komplikovaným průběhem plicní formy GvHD a nebylo možné zhodnotit případný přenos klonu CLL štěpem. Závěr: tato kazuistika dokládá význam, ale i limity předoběrových vyšetření dárců krvetvorných buněk a zároveň dokládá dlouhodobý vývoj CLL z molekulárně detekovatelného klonu do klinicky manifestního onemocnění.

N 2243.

LGL leukemia (Large granular lymphocyte leukemia, Lymfocytová leukemia s veľkými granulami)

Nosál Miloš, Mistrík Martin *(KHaT LFUK, UNB, SZU, Nem. sv. Cyrila a Metoda, Bratislava - SVK)*

Úvod: Lymfocytová leukemia s veľkými granulami (LGL leukémia) je charakterizovaná klonálnou expanziou buď CD3+ cytotoxickými alebo CD3- NK bunkami. Hlavné klinické znaky T-LGL leukemie zahrnujú neutropeniu, anemiu a reumatoidnú atritídu (RA). Konečný efektorový pamäťový fenotyp (CD3+/CD45RA+/CD62L-CD57+) T-LGL naznačuje kľúčovú chronickú antigénovú odpoveď. LGL prežitie potom postúpené PDGF a IL-15, vyplýva do celkovej dysregulácie apoptózy a rezistencie na normálne cesty aktiváciou-navodenej bunkovej smrti. Tieto patogenetické črty vysvetľujú, prečo liečba T-LGL leukemie je založená na imunosupresívnej liečbe. Väčšina pacientov napokon potrebuje liečbu pre ťažkú alebo symptomatickú neutropeniu, anemiu alebo RA. Nie je stanovená štandardná liečba, pre nedostatok veľkých prospektívnych štúdií. Spočiatku sa používajú malé dávka methotrexatu u pacientov s LGL leukemiou s neutropeniou a/alebo RA alebo perorálne cyklofosfamid ako počiatočná liečba pri anemii. Ak liečba nie je úspešná, pacienti prejdu na iný prípravok alebo cyklosporin. U väčšiny pacientov má ochorenie klinicky indolentný priebeh. Pacienti zomierajú zriedkavo, na infekcie spojené s ťažkou neutropeniou. Ak nie sú tieto liečebné terapeutické postupy pre T-LGL leukemiu úspešné, použijú sa nové postupy. Metóda: popis 57 ročnej pacientky, ktorá sa liečila na RA 10 rokov, reumatológ ordinoval MTX 10 mg/m2/týždeň, ktorý pac. užívala tri týždne. Objavila sa mierna splenomegália 180 x 85 mm, v krvnom obraze sa objavila leukopénia a anémia. Pacientka odoslaná na hematologické vyšetrenie, v krvnom nátere sa objavili LGL bunky 1.5 G/l, anémia Hgb 105 g/dl. LGL bunky sa potvrdili FCM vyšetrením CD3 a CD8. Odporučili sme pokračovať v MTX, pridali sme ESA. O tri mesiace nastal pokles LGL na hodnoty 0.4 G/l, zlepšila sa anemia Hgb stúpol na 118 g/dl. Po pol roku má pacientka v KO Lkc: 4.0 G/l, Hgb: 125.0 G/l, Plt: 145.0 G/l, zmenšila sa slezina 165 x 65 mm. Záver: LGL leukémia nie je častá, treba na ňu myslieť pri autoimúmmom ochorení, ak je prítomná pancytopénia. Najčastejšie sa vyskytuje pri RA. Pri liečbe je prognóza priaznivá.

N 2244.

Laboratórne odlíšenie sideropenickej anémie z nedostatku železa od sideropenickej anémie pri zápale

Nosál Miloš, Stecová A., Waczuliková I., Galisová R., Fischerová S. *(Hematologické oddelenie, Univerzitná nemocnica, Nemocnica Staré Mesto; Medirex s.r.o, Bratislava - SVK)*

Úvod: pri bežnom laboratórnom vyšetrení metabolizmu železa nemožno odlíšiť sideropéniu pri anémii z nedostatku železa od sideropenicekej anémie pri zápalovom procese. Preto sme hľadali možnosť ako uvedenú situáciu riešiť a dať klinickým pracovníkom odpoveď na túto otázku. Zaviedli sme výpočet indexu solubilný Trf.receptor/log.feritinu, hodnoty < 0.8 poukazujú na zápalový proces, hodnoty > 1.5 na sideropenickú anémiu z nedostatku žedleza. Metodika: Vyšetrili sme 19 pacientov, 9 žien, 10 mužov so sideropenickou anémiou. Žien je menej, pretože v našej nemocnici nie je gynekologické oddelenie. Traja pacienti pri zápalovom procese a skupinu 8 kontrol dve ženy a šesť mužov. U všetkých pacientov sme vyšetrili hladinu sérového železa (FeS umol/l), transferin (Trf.g/l), saturáciu trasnferinu v% (sat.Trf.%), feritin (Fer.,ug/l), solubilný transferinový receptor (sTrfR,mg/l), index solub.TrfR/log.feritin, hemoglobin (Hgb., g/l), stredný objem erytrocytu (MCV, fl.), CRP (mg/l) Výsledky: zaznamenali sme viaceré štatisticky významné hodnoty jednotlivých vyšetrených parametrov a vysoko významný rozdiel medzi skupinami pre index solub.TrfR/log.feritin p< 0.0001 Záver: Z našich výsledkov vyplýva že index solubilný Trf.receptor/log.feritinu < 0.8 poukazuje na zápalový proces, a hodnota indexu > 1.5 na sideropenickú anémiu z nedostatku železa. Odporúčame výpočet tohto indexu pre klinickú prax.

REJSTŘÍK AUTORŮ

Adam T. 44, 59
Adam Z. 30
Adamová D. 12, 13, 36
Al Sabty F. 47, 71
Almáši M. 54
Amborská P. 70
Ambrůzová Z. 39
Antošová L. 15
Antošová M. 15
Babinská L. 50
Bačáková L. 68
Bačovský J. 12
Bachh A. 22
Balcárková J. 13
Balhárek T. 29, 35, 37
Baník M. 75
Barbui T. 27
Bartová R. 25, 26
Batelová A. 50
Bátorová A. 2
Berková A. 42
Bizíková T. 7, 50
Bláha M. 61
Blatný J. 27
Bóday A. 75
Bojtárová E. 44
Bornhauser B. 18
Bosly A. 17
Bourková L. 15
Bourquin J.-P. 18
Broučková A. 43, 60
Brychtová Y. 22, 23
Brynda E. 68
Březinová J. 42
Burda P. 10, 11
Bystřická E. 7
Calábková L. 10
Cetkovský P. 66
Cibulková P. 75
Cools J. 17
Copáková L. 51, 64, 65, 66
Čermák J. 46, 64
Čermák M. 51, 64, 66
Čermáková Z. 12
Červínek L. 46
Čmejla R. 19
Čuřík N. 10
Dastych M. 12
De Benedittis C. 43
De Keersmaecker K. 17
Demečková E. 44, 47
Dementyeva E. 54, 55
Divoká M. 59, 63
Divoký V. 9, 10, 63, 71
Dobrovolná M. 39, 53
Doležal D. 9
Doubek M. 22, 23
Drabkin H. A. 17
Dulová I. 30
Ďuraš J. 53
Dvořáčková J. 58
Dworzak M. 18
Dyr J. E. 64, 68, 69
Entrová A. 6
Faber E. 25, 28, 32, 44, 57, 59
Fabry M 56
Faltýnek L. 25
Farkašová D. 71
Farkašovská D. 6
Fátorová I. 74
Ferdová E. 63
Ferreiro J. F. 17
Fikarová I. 59
Filová E. 68
Fischerová S. 77
Fišer K. 18, 19
Flodr P. 18, 36
Friedecký D. 44, 59
Froňková E. 18, 19
Fuchs O. 66
Gadgil S. 17
Galisová R. 77
Gallo J. 25
Galoczová M. 59
Galuszková D. 6, 16
Gazdová J. 44, 59
Graux C. 17
Gregora E. 12, 13
Grešlíková H. 55
Gruntová D. 26
Grycová P. 15, 26
Guman T. 30
Gumulec J. 12, 13, 53, 75
Hájek R. 12, 13, 14, 30, 54, 55
Hájková H. 65
Hajšmanová Z. 63
Hanušovská E. 33
Hanzlíková J. 3, 13
Hardekopf D. W. 19
Haškovec C. 65
Hatalová A. 43
Heinzová V. 12
Heřmanová I. 17
Hlebašková M. 30
Hlinková Z. 7
Hluší A. 28, 58, 70
Holečková M. 12
Holická M. 66
Hollý P. 7
Holub D. 9
Holzerová M. 3, 13, 21, 36, 75
Honzík T. 74
Horáček J. M. 46
Horák P. 25
Horálková L. 57
Horváthová M. 9, 10
Hořejší V. 56
Houda J. 9
Hrabětová M. 29, 40, 76
Hrnčár M. 29
Hrubá P. 16
Hrušák O. 18, 19
Hubáček J. 28
Hudeček J. 29
Humplíková L. 21, 75
Husarčíková O. 61
Hylse O. 51
Chalupníková P. 25
Charvátová E. 6
Chlupáč J. 68
Chmelová S. 6
Chrenková O. 61
Chrenová D. 7
Chudej J. 29, 30, 76
Chvojková I. 7
Indrák K. 3, 13, 21, 25, 28, 32, 35, 36, 44, 58, 59, 63, 75
Jakl M. 46
Jalůvková M. 58
Jancusková T. 19
Janečková H. 59
Janek D. 70
Janíková P. 64, 65
Jarkovský J. 12
Jarošová M. 3, 13, 21, 35, 36, 44, 58
Jebavý L. 46
Jelínková E. 7
Ježáková J. 25
Jindra P. 29, 32, 33, 40, 76
Jiruchová Z. 50
Jonášová A. 46
Jordanová B. 27
Jungová A. 40
Juráňová J. 25, 26
Jurkovičová J. 30
Juřeníková P. 5
Kadlecová J. 15, 25
Kafková A. 30
Kajaba V. 5
Kaldlčková E. 64

Kapalová M. 11
Kapitáňová Z. 35, 36
Kapralová K. 9
Karas M. 29, 32, 33, 40, 76
Karolčíková D. 65
Katrincsáková B. 3, 58
Kessler P. 12, 13, 46
Klamová H. 43
Klimentová H. 53
Klincová M. 13, 14
Koláčková M. 63
Kolář M. 4
Kolek V. 26
Konečná V. 15
Konvalinka D. 58
Kornblau S. M. 17
Kostečka A. 66
Kosyakova N. 19
Kotuličová D. 69
Koza V. 29, 32, 33, 34, 40, 76
Král V. 56
Krčméry V. 6
Krčová V. 70
Krejčí M. 23, 30
Krejsek J. 50
Kropáčková J. 3, 13
Krpatová J. 8
Krutílková L. 19
Kryukov F. 54, 55
Kubešová B. 22
Kubiczková L. 54, 55
Kubová B. 58
Kubová Z. 36
Kušíková M. 71
Kutková M. 64
Kviatkovská Z. 37
Kyjovská D. 54
Labudíková M. 5
Lacko A. 61
Langová K. 28
Langrová H. 61
Lánská M. 61
Lapčíková A. 15, 63, 75
Lavičková A. 63
Leitnerová M. 51, 64, 65, 66
Lejhancová K. 74
Liehr T. 19
Ligová A. 53
Lochmanová J. 22
Lošťáková V. 25, 26
Ludíková B. 9
Lukáš J. 74
Lysák D. 29, 32, 33, 40, 76
Macková J. 75
Macnerová R. 53
Machálková K. 12
Machová B. 50
Machová Poláková K. 43, 60
Maisnar V. 12, 13
Májek P. 64, 68
Malý Jan 74
Malý Jaroslav 46, 50, 61
Marcinek J. 2, 29, 37
Marešová I. 21, 57, 59
Marková D. 58
Marková J. 42, 66
Masárová K. 71
Mašková Z. 46
Matuška M. 53
Mayer J. 22, 23, 30
Melková M. 53
Mičák J. 37
Mičková P. 3, 13, 36
Mičová K. 44, 59
Michalová K. 42
Michaux L. 17
Mikošková A. 53
Mikula P. 12, 56
Mikulášová A. 14
Mikulášová Z. 64, 66
Mikulenková D. 15
Minařík J. 12, 25
Mistrík M. 43, 44, 47, 71, 77
Mitura J. 61
Mojzíková R. 9, 71
Motyčková M. 22
Mrázek F. 39
Murray P. 18
Navrátilová J. 40, 76
Navrkalová V. 22
Nedomová R. 3, 13, 36
Nekvindová J. 50
Němec P. 55
Neplechová D. 25
Neuwietová R. 46
Nosál M. 77
Novák L. 40
Novák M. 57, 75
Nováková L. 46
Novosadová A. 58
Novosadová L. 12, 56
Novotová E. 15
Obernauerová J. 12
Otáhal P. 56
Painuly U. 50
Palová M. 70
Papajík T. 21, 28, 35, 36
Partschová M. 71
Paruch K. 51
Pavlíček P. 12, 13
Pečánková K. 64, 68
Peková S. 19
Penka M. 13, 14, 15, 42, 54
Petrboková R. 65
Petřek M. 39
Piačková B. 51
Pietrzyková M. 69
Pika T. 12, 13
Pikalová Z. 21, 28, 36, 57, 75
Pizurová R. 69
Plachý R. 19
Plameňová I. 30
Plank L. 2, 35, 37
Plonková H. 12, 75
Polák J. 60, 65, 66
Pospíšil V. 11
Pospíšilová D. 3, 9, 15, 71
Pospíšilová P. 71
Pospíšilová Š. 22, 51
Pour L. 12, 30, 54
Prekopová. I. 3, 13
Prchal J. 2, 3
Prikrylová Vranová H. 25
Procházka V. 6, 21, 28, 35, 36, 75
Procházková J. 28, 70
Prouzová Z. 75
Provazová J. 6
Pudil R. 46
Racek J. 34
Radocha J. 12, 13
Raida L. 23, 28, 32
Rajdl D. 34
Rašková Kafková L. 10
Reicheltová Z. 64, 68
Rejlová K. 17
Rencová E. 61
Reptová S. 3, 36
Riedel T. 68
Richterová P. 53
Richterová R. 60, 75
Rimajová V. 74
Rohoň P. 28, 59, 64
Roszková B. 60, 75
Rothbauerová A. 6
Rotíková L. 65
Rozsíval P. 61
Rožmanová Š. 44, 59
Rusiňáková Z. 28, 32
Ružbacký R. 64, 65
Řezáčová Š. 7
Řezníčková L. 18, 19
Říhová L. 13, 14, 54, 55
Sáblíková B. 54
Salavec M. 8
Sandecká V. 12, 13, 14
Sečkařová M. 25
Sedláček P. 39

Sedláčková L. 19
Sedláčková T. 34
Sedlaříková L. 54
Schmitzová D. 50
Schützová M. 29, 76
Schwarz J. 42, 66
Schwarz R. 6
Sičová K. 28
Skácelová M. 25
Sklenářová J. 25
Skoumalová I. 57, 59
Skraková M. 71
Skultétiová K. 66
Slabý O. 54
Slámová M. 17
Slámová L. 18, 19
Slánská M. 27
Slavík L. 25, 70
Slezáková K. 44
Smetana K. 47
Smolej L. 21, 22, 50
Smržová A. 25
Sninská Z. 44
Sokol J. 29
Součková M. 60
Soukup P. 66
Soverini S. 43
Srovnalík K. 58
Starková J. 17, 18, 19
Starostka D. 12, 13, 36, 56
Starý J. 18
Stecová A. 77
Steinerová K. 29, 32, 33, 40, 76
Stemnická D. 71
Stoklasová M. 75
Stopka T. 10, 11
Straub J. 12, 13
Strnková A. 75
Sulovská L. 9
Surová M. 30
Suská R. 14
Suttnar J. 64, 68, 69
Svoboda T. 29, 32, 33, 34, 40, 76
Svoreň Z. 64, 66
Sýkorová M. 25
Szabóová Ž. 64, 65
Szépe P. 2, 35, 37
Szotkowski T. 21, 28, 67
Szturz P. 30
Šálek C. 65
Šárová I. 42
Ščudla V. 12, 13, 25
Šebejová L. 22, 51
Ševčíková S. 54, 55
Šimáková E. 74
Šimkovič M. 22, 50
Šímová J. 58
Šípková K. 50
Šlechtová J. 63
Špaček J. 74
Špačková J. 5
Špička I. 12, 13
Špiříková I. 16
Šponerová D. 46
Štecová N. 30
Štika J. 19
Štikarová J. 69
Šustková Z. 67
Šváchová H. 54, 55
Takáč V. 30
Tichý Martin 18
Tichý Miloš 12, 46
Tomíška M. 23
Tóthová E. 2, 30
Trbušek M. 22, 51
Trka J. 17, 18, 19
Trnavská I. 15
Trněný M. 56
Tupá M. 61
Tupý J. 61
Turcsányi P. 21, 23
Tůzová E. 15
Úlehlová J. 25, 70
Urbánková H. 36
Urbanová J. 8
Urbanová R. 21, 28, 75
Urbanovská I. 58
Urgasová A. 53
Uvírová M. 58
Váleková L. 29, 30
Válková V. 39
Vandenberghe P. 17
Vargová K. 11
Varmužová T. 14
Vašatová M. 46
Vávrová J. 12
Večeřová D. 76
Vítková J. 4
Vodárek P. 22
Vodičková Marcela 5
Vodičková Marta 16
Vokurka S. 29, 32, 33, 34, 40, 76
Vokurková D. 61
Vondráčková H. 53
Vondráková J. 46
Vonke I. 12, 13
Vostrý M. 66
Vozobulová V. 29
Vraná M. 39, 53
Vrbacký F. 50
Vrbová O. 26
Vroblová V. 50
Výrutová R. 40
Waczulíková I. 77
Walterová L. 12, 13
Weise A. 19
Wlodarska I. 17
Wróbel M. 12, 13
Zahradová L. 12, 13, 30, 54, 55
Zapletal O. 27
Zapletalová J. 21, 25
Zarbochová P. 14
Zemanová J. 22, 51
Zemanová K. 60
Zemanová Z. 46
Zikmund T. 11
Zítková M. 5
Zuchnická J. 53
Zuna J. 18
Zwiewka M. 74
Žák P. 46
Žáková A. 16
Žákovičová A. 64, 65
Žebráková I. 58
Žejšková L. 19
Židová Z. 9
Žmolíková J. 58
Župková M. 59