



SBORNÍK ABSTRAKT



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

**XVII. Konference ošetřovatelství
a zdravotních laborantů**

**6th Symposium on Advances
in Molecular Hematology**

www.olhemdny.cz

Akreditováno EHA



12. – 14. 5. 2013

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
Fakultní nemocnice Olomouc



POD ZÁŠTITOU

rektora UP v Olomouci Prof. RNDr. M. Mašláň, CSc.
děkana LF UP v Olomouci Prof. MUDr. M. Kolář, Ph.D.
hejtmana Olomouckého kraje ing. J. Rozbořila
ředitele FNOL doc. MUDr. R. Havlíka, Ph.D.
předsedy HS ČLS JEP doc. MUDr. J. Čermáka, CSc.

GENERÁLNÍ PARTNER

Novartis s.r.o.



HLAVNÍ PARTNEŘI

Bristol-Myers Squibb s.r.o. / GlaxoSmithKline s.r.o. / Roche s.r.o.
Takeda Pharmaceutical Czech Republic s.r.o.



VÝZNAMNÍ PARTNEŘI

AMGEN s.r.o. / AOP Orphan Pharmaceuticals AG / Astellas Pharma s.r.o.
Janssen – Cilag s.r.o. / Medicom International s.r.o. / Pfizer s.r.o.
Sysmex CZ s.r.o. / Terumo BCT Europe N.V.



PARTNEŘI

Baxter Czech s.r.o.
BIOHEM s.r.o.
BioTech a.s.
Celgene s.r.o.
CSL Behring s.r.o.
EXBIO Praha a.s.
Fresenius Medical Care – ČR s.r.o.
HPST s.r.o.
I.T.A. – Intertact s.r.o.
KRD – Obchodní společnost s.r.o.
Merck Sharp & Dohme s.r.o.
Octapharma CZ s.r.o.
Sandoz s.r.o.
sanofi-aventis s.r.o.
TEVA Pharmaceuticals CR s.r.o.
The Binding Site s.r.o.
Werfen Czech s.r.o.

GRIFOLS

ZA PODPORY



OBSAH

2 PŘEDNÁŠKY

- 2 EDUKACE 1 – POSTGRADUÁLNÍ PŘEDNÁŠKY
- 2 EDUKACE 2 – POSTGRADUÁLNÍ PŘEDNÁŠKY
- 3 SYMPOSIUM ON ADVANCES IN MOLECULAR HEMATOLOGY – PATHOLOGY OF LYMPHOID TISSUE
- 5 SYMPOSIUM ON ADVANCES IN MOLECULAR HEMATOLOGY – NOVEL MARKERS IN LEUKEMIA AND LYMPHOMA
- 8 SYMPOSIUM ON ADVANCES IN MOLECULAR HEMATOLOGY – ERYTHROPOIESIS
- 11 KONFERENCE OŠETŘOVATELSTVÍ A ZDRAVOTNÍCH LABORANTŮ – OŠETŘOVATELSTVÍ 1
- 14 KONFERENCE OŠETŘOVATELSTVÍ A ZDRAVOTNÍCH LABORANTŮ – OŠETŘOVATELSTVÍ 2
- 17 KONFERENCE OŠETŘOVATELSTVÍ A ZDRAVOTNÍCH LABORANTŮ – ZDRAVOTNÍ LABORANTI 1
- 19 KONFERENCE OŠETŘOVATELSTVÍ A ZDRAVOTNÍCH LABORANTŮ – ZDRAVOTNÍ LABORANTI 2
- 22 BMT A AL
- 26 CLL 1
- 28 CLL 2
- 31 PODPŮRNÁ PÉČE A AITP
- 34 CML A PH- MPN
- 38 LYMFOMY 1
- 41 LYMFOMY 2
- 44 MNOHOČETNÝ MYELOM
- 47 MDS

49 POSTEROVÁ ČÁST

- 51 NHL A CLL
- 58 AKUTNÍ LEUKEMIE
- 64 MNOHOTNÝ MYELOM A AMYLOIDÓZA
- 71 MDS, CML A PH- MPN
- 78 TRANSFUZNÍ, LABORATORNÍ A EXPERIMENTÁLNÍ SEKCE
- 87 HEMOSTÁZA

Sborník abstrakt vydalo

Vydavatelství UP Olomouc
 Univerzita Palackého v Olomouci
 Křížkovského 8
 771 47 Olomouc
 ISBN 978-80-244-3480-3
 Olomouc, 2013
 1. vydání

Odpovědní redaktoři:

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

EDUKACE 1 – POSTGRADUÁLNÍ PŘEDNÁŠKY

2485.

Epidemiologie, dědičnost, rizikové faktory vzniku CLL

Trněný M. (1. IK LF UK a VFN, Praha)

2468.

Molekulární biologie CLL - význam molekulárních prognostických faktorů

Pospišilová Š., Malčíková J., Plevová K., Tichý B., Trbušek M., Doubek M., Mayer J. (Interní hematologická klinika LF MU a FN Brno a CEITEC MU, Brno)

2399.

Cytogenetika a molekulární cytogenetika CLL

Jarošová M., Papajík T., Procházka V., Holzerová M., Krůžová L., Indrák K. (HOK FN, Olomouc)

2458. Vyšetření pacienta s nově diagnostikovanou CLL a stanovení individuální prognózy

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

EDUKACE 2 – POSTGRADUÁLNÍ PŘEDNÁŠKY

2476.

Initial treatment of CLL patient

Robak T. (Department of Hematology Medical University of Lodz Copernicus Memorial Hospital, Lodz, Poland)

2419.

Léčba relabujících a refrakterní chronické lymfocytární leukémie

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

2404.

Nové léčebné možnosti u chronické lymfocytární leukémie

Doubek M. (Interní hematologická a onkologická klinika LF MU a FN, Brno)

2487.

Richterův syndrom

Rossi D. (Amedeo Avogadro University of Eastern Piedmont – Italy)

Slizniční a systémová imunita v obraně a toleranci

Městecký J. (Birmingham – USA)

SYMPOSIUM ON ADVANCES IN MOLECULAR HEMATOLOGY - PATHOLOGY OF LYMPHOID TISSUE

2484.

Physiology and Immunopathology of Human IgA System

Mestecky J., Raska M., Moldoveanu Z., Novak J. (Department of Microbiology, University of Alabama at Birmingham – USA; Department of Immunology, Palacky University, Olomouc – CZ)

In phylogenetic diversification of immunoglobulin (Ig) isotypes, IgA represents a relatively new addition to the Ig family. The quantitative biosynthetic data clearly indicate that in humans the daily production of IgA by far exceeds the combined production of Igs of all isotypes, multiplied by a factor of 1.5. Approximately two thirds of IgA is produced in the intestinal tract and is selectively transported by a receptor-mediated mechanism into the gut secretions. IgA of a systemic and mucosal origin displays structural and physiological differences, including the dominance of the monomeric form of IgA1 subclass and of polymeric forms of IgA2 subclass in the intestine. Furthermore, systemic and mucosal IgA compartments display vastly different maturation patterns and spectra of specific antibody activities which indicate the independence of these two compartments. The primary function of IgA in the mucosal compartment is the containment of mucosal microbiota in the form of biofilms in its physiologic mucosal environment. In the systemic compartments IgA displays strong anti-inflammatory activity as an effective inhibitor of complement activation. Although the deficiency of IgA is the most common immunodeficiency disease in humans, only a minority of such patients have a higher incidence of recurrent infections, particularly of the upper respiratory tract, and of allergic and autoimmune diseases. In most IgA-deficient patients, external secretions contain the secretory form of IgM as the dominant Ig isotype. Increased production of IgA1 in its polymeric form and with altered glycan moiety occurs in patients with the most common glomerulonephritis of the autoimmune character, IgA nephropathy. In this disease molecules of IgA1 that are deficient in galactose residues on glycans linked to the hinge region are recognized by ubiquitous, naturally occurring anti-glycan antibodies resulting in the formation of nephritogenic immune complexes deposited in the glomerular mesangium. Marked structural and metabolic alterations and changes in the level of total as well as antigen-specific antibodies have been reported as a consequence of several mucosally acquired infectious diseases including HIV-1-infections. In summary, antibodies of the IgA isotype contribute significantly to the maintenance of mucosal and systemic homeostasis without inflammatory consequences.

2482.

New Genetic Prognostic Factors in Chronic Lymphocytic Leukemia

Rossi D. (Division of Hematology, Department of Translational Medicine, Amedeo Avogadro University of Eastern Piedmont, Via Solaroli 17, 28100 Novara, Italy)

2272.

Germinal centre disruption by the EBV oncogene LMP1 is mediated by loss of the lipid receptor S1PR2

Murray P. G., Nagy E., Vockerodt M., Liebelt D., Reynolds G., Simmonds W., Abdullah M. (University of Birmingham – USA)

The majority of B cell lymphomas, including Hodgkin's lymphoma, arise from germinal centre B cells. In around one half of cases the malignant Hodgkin/Reed-Sternberg cells of Hodgkin's lymphoma carry the Epstein-Barr virus, an oncogenic herpesvirus. To investigate the early events in the germinal centre which potentially lead to EBV-induced lymphomagenesis, we have developed a method for the separation and transfection of primary human germinal centre (GC) B cells. This model was used to examine the transcriptional consequences that follow the expression of the Epstein Barr virus oncogene, latent membrane protein 1 (LMP1) in germinal centre B cells. We compared the transcriptional targets induced by LMP1 with those induced by its cellular homologue CD40 in germinal centre B cells. In keeping with their ability to activate shared signalling pathways, we found a striking overlap between the transcriptional targets of LMP1 and CD40 in this cell back-

ground. However, we also identified a subset of genes that were regulated by LMP1, but not by CD40, and which were also concordantly expressed in primary HRS cells. These genes included the sphingosine-1-phosphate receptor-2 (S1PR2), which has recently been shown to be required for the maintenance of germinal centre integrity. Our data provide a model for EBV-driven lymphomagenesis based on the early disruption of normal germinal centre architecture induced by LMP1.

2403.

BMI1, The Polycomb-group Gene, is Recurrently Rearranged in Progressive/Transformed CLL and MCL

Wlodarska I., Rouhi L., Ferreiro J.F., Put N., Tousseyn T., Lefebvre C., Gardiner A., De Kelder W., Demuyck H., Verschuere J., Théate I., Vicente C., Michaux L. (*Center for Human Genetics, KU Leuven – Belgium; Dtp of Oncogenetics, CHU Albert Michallon Grenoble – France; Dpt of Hematology, Royal Bournemouth Hospital Bournemouth – UK; Dpt. of Hematology, Hospital of Roeselare – Belgium; Dpt of Hematology, Hospital of Ronse – Belgium; Dpt of Pathology, Cliniques Universitaires Saint. Luc, Brussels – Belgium*)

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) has a variable clinical course, ranging from a very indolent to a rapidly progressing disease. In up to 10% of CLL patients, transformation to highly aggressive and usually fatal lymphoma (Richter syndrome) has been reported. Accumulating evidence indicate that, Richter transformation may be triggered by an aberrant activation of various oncogenes by iG-related chromosomal translocation, like t(8;14)/IGH-CMYC, t(14;19)/IGH-BCL3 and dic(9;14)/IGH-NOTCH1, acquired during evolution of disease. These observations are supported by our recent finding of the novel IGH/IGL-mediated t(10;14)(p12;q32) and t(10;22)(p12;q11) identified in six cases of progressive/ transformed CLL. The BAC-walking FISH analysis mapped the 10p12 breakpoint in the region harbouring BMI1, a Polycomb group gene. Upregulation of BMI1 mRNA was demonstrated by QRT-PCR analysis in one case documented by paired diagnostic/follow-up samples. Of note, the IGH/BMI1 rearrangement was not associated with a particular molecular subtype of CLL and the patients were negative for common mutations of NOTCH1 and TP53. As amplification of BMI1 occurs in MCL, we additionally studied 16 MCL cases with various 10p11-13 aberrations. Using FISH and aCGH, we identified a spectrum of BMI1 rearrangements including duplications/ amplifications, translocations and insertions, which led to an aberrant expression of BMI1 mRNA. Collectively, our work identified BMI1, the Polycomb group gene and postulated lymphoma-related oncogene, as a new player implicated in progression and high grade transformation of CLL and confirmed its involvement in the pathogenesis of MCL. Although BMI1 is implicated in pathogenesis of many types of solid tumors and haematological malignancies, the underlying 10p12 chromosomal rearrangements (except of gain/amplification) have never been reported in human cancers.

SYMPOSIUM ON ADVANCES IN MOLECULAR HEMATOLOGY - NOVEL MARKERS IN LEUKEMIA AND LYMPHOMA

2457.

Profiling of childhood acute leukaemia cells using a novel method of affinity proteomics

Černá D., Kanderová V., Stuchlý J., Fišer K., WeiWei Wu, Holm A., Hrušák O., Lund-Johansen F., Kalina T. (*CLIP-cytometrie, KHDO 2.LF UK a FNM, Praha – CZ; Dpt. of Haematology, Rikshospitalet, Oslo – Norway*)

Acute leukaemia (AL) is the most common childhood malignancy characterized by a number of aberrations at the DNA, mRNA and protein level. Current research is mainly focused on the detection of mutations at the DNA level and functional consequences of these alterations on cellular level are not fully understood. Proteins are the entities that form connection between gene expression and cell physiology, therefore more effective and sensitive approaches that could search for new prognostic markers on protein level are in development. Using SEC-MAP technology (Size-exclusion Chromatography - Microsphere-based Affinity Proteomics), we are searching for the expression and activation (e.g. phosphorylation) of differentially expressed proteins in AL cells regarding to cell type (B-cell, T-cell, myeloid), genotype (fusion genes, aneuploidy) and early response to treatment detected as minimal residual disease. SEC-MAP is a set of 1728 populations of fluorescently-labeled latex microbeads, each carrying an antibody against a human protein. We isolate the cellular proteins from membranes, cytoplasm and nucleus using detergents, label them with biotin and separate them using gel chromatography into 24 fractions. These fractions are incubated with SEC-MAP microbeads and the antibody-protein binding is detected using fluorescently-labeled streptavidin by flow cytometry. We have examined the expression of cytoplasmic (n=980) and membrane combined with DNA-binding (n=769) proteins in 69 diagnostic samples of AL. Due to ability of SEC-MAP to separate proteins according their size we have identified proteolysis in 12 samples, which have been therefore excluded from the analysis. The analysis was performed using an automatic software created in R-project. For the normalization of protein expression we have used Loess normalization commonly used in mRNA profiling studies. So far we have identified 77 proteins (e.g. SH2D1A, FAS, LAT, KIT, CD72) differentially expressed in different subtypes of AL. We have discovered e.g. higher expression of cAMP-dependent protein kinase PRKACA in TEL-AML1+ AL. Recently we are verifying SEC-MAP data using other proteomic approach. Since we detect not only protein expression, but also its size, presence in complex and cellular localization, SEC-MAP is a novel method of functional proteomics combining the capacity of DNA microarrays and high-throughput evaluation by flow cytometry. GAUK 596912, IGA NT/13462, P302/12/G101, UNCE 204012

2467.

Oncogenic MICRORNAS in Cerebrospinal Fluid and Serum: Sensitive Tool for Detection of CNS Lymphoma in Response to Therapy

Pospíšil V., Mociková H., Paličková M., Kozák T., Trněný M., Klener P., Stopka T. (*Pathophysiology, First Faculty of Medicine, Charles University, Praha - CZ; Department of Clinical Hematology, Third Faculty of Medicine, Charles University Hospital Kralovske Vinohrady, Praha – CZ; First Dept. of Medicine, First Faculty of Medicine and General Faculty Hospital, Charles University and Institute of Hematology and Blood Transfusion, Praha - CZ*)

MicroRNAs (miRs) are non-coding RNAs (19-23nt) that negatively regulate expression by interference with RNA stability or translation. Leukemias and lymphomas overexpress oncogenic miRs (such as miR-17-92 and miR-155) that influence tumor growth and spreading. Unlike longer species of RNA, miRs are preserved and detectable in body fluids including serum/plasma and cerebrospinal fluid (CSF), however their kinetics in body fluids upon course of therapy or possible trafficking of tumor derived miRs to liquids and tissues has not been explored. We investigated and compared abundance of miRs in the CSF and sera of lymphoma patients with (N=22) or without (N=21) CNS involvement and tested whether their levels are elevated at diagnosis or changed upon the treatment. CSF and sera were collected at multiple (5-20) time-points before, during and after therapy (DLBCL 29, MCL 12, Burkitt 2). 20 candidate miRs were quantitated. Our data demonstrate that miRs are detectable in both

CSF and sera. Prominently changed miRs (members of miR-17-92 cluster and miR-21) were elevated to similar extent in CSF in PCNSL (N=11) and systemic lymphomas with CNS involvement (SCNSL, N=11). In turn, all SCNSL patients and ~60% of systemic lymphomas without CNS involvement expressed high levels of these oncomiRs in the sera. Surprisingly, also a subset of PCNSL patients has elevated these miRs in the sera and in turn, subset of systemic lymphomas without CNS involvement showed partially elevated oncomiRs in the CSF. These data indicate that 1) lymphoma patients with CNS involvement are characterized by presence of oncogenic miRs in CSF, 2) blood brain barrier is permissive for miRs in both directions. Next we investigated the dynamics of these miRs during treatment in ten patients with PCNSL or SCNSL. In therapy-responders (N=4) the oncomiRs gradually decreased in CSF. However, their levels were not completely normalized. In contrast, refractory lymphoma (N=3) displayed gradual increase of these miRs in CSF upon treatment. Interestingly, clinical CNS relapse of two lymphoma patients was preceded by gradually elevated miRs in CSF by three months. The measurement of oncomiRs in CSF and sera represents sensitive tool for CNS lymphoma detection, estimation of therapy efficacy and prediction of the relapse. Role of oncomiRs in promoting tumorigenesis in distant tissues is being further studied in newly established mouse model that allows tracking of tumor derived miRs in recipient tissues.

2470.

Whole Genome and Targeted Bisulfite Sequencing Reveals 3 DNA Methylation Clusters and New Biologically Relevant Hypermethylated Genes in AML Patients

Hájková H., H.-Y. Fritz M., Krejčík Z., Belíčková M., Merkerová M. D., Šálek C., Petrboková R., Marková J., Schwarz J., Fuchs O., Cetkovský P., Beneš V., Haškovec C. (*Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha – CZ; European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg – Germany*)

In acute myeloid leukemia (AML), aberrant DNA methylation has been linked to the pathogenesis and progression of the disease. Changes in DNA methylation of promoters, or other regions, are studied primarily with respect to which pathways are involved in tumor transformation and their impact on prognosis. Whole genome (3 AML, 2 controls) and targeted (14 AML, 1 control) bisulfite libraries were run on a HiSeqTM2000 sequencer (Illumina) using 105 bp paired-end sequencing reads. HumanHT-12 v4 Expression BeadChip (Illumina) was utilized for whole genome expression profiling. Unsupervised hierarchical clustering of CpG methylation outside and/or inside CpG islands revealed three DNA methylation clusters. From the clinical and molecular characteristics, only CBF/MYH11+ patients clustered together. A correlation between methylation and expression data enabled us to distinguish between aberrant DNA methylation with no effect on expression of downstream located genes (probably tissue-specific methylation) and biologically relevant DNA methylation (accompanied with changes of gene expression). ELAVL2 and CACNA1E had enormous differences in DNA methylation between AML samples and controls; however they are very probably genes displaying tissue-specific methylation changes, because we did not detect their expression even in healthy precursor cells. On the other hand, there were genes - most notably CHFR and PBX3, where DNA methylation changes were accompanied with a change in their expression. We measured expression of CHFR and PBX3 genes in 123 AML samples at diagnosis. 454 pyrosequencing confirmed the role of DNA methylation in down- and up-regulation of PBX3 gene, hypomethylation (median methylation level 0.25, range 0.15 – 0.36) of a regulatory region was connected with elevated levels of PBX3, whereas hypermethylation (median methylation level 0.51, range 0.31 – 0.98) with decreased levels of expression. Control samples displayed intermediate levels of methylation (median 0.35, range 0.19 – 0.51). Furthermore we observed correlation between PBX3 and HOXA9 expression, which is consistent with recently published data that PBX3 is an important cofactor of HOXA9 in leukemogenesis. In summary, we found new and biologically important genes that are influenced by differential DNA methylation and were able to distinguish 3 major DNA methylation clusters in AML patients. This study was supported by the MŠMT OC10042 grant and institutional funding grant IHBT00023736.

2471.

L-asparaginase strongly affects bioenergetics in leukemic cells

Heřmanová I., Vališ K., Nůšková H., Fišer K., Trka J., Starková J. (*Childhood Leukaemia Investigation Prague, Department of Pediatric Hematology/Oncology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University Prague - Czech Republic; Laboratory of Molecular Structure Characterization Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague - Czech Republic; Department of Bioenergetics, Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague - Czech Republic*)

L-asparaginase (L-asp) is an important component of childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) therapy. Its cytotoxic effect is based on the depletion of extracellular asparagine and glutamine. Leukemic cells are sensitive to this depletion due to the lower ability to synthesize asparagine compared to healthy cells. However, the mechanism of resistance development remains unclear. The aim of this study was to obtain further insights into the mechanisms underlying the cytotoxic effect of L-asp. We used preB ALL leukemic cells REH, NALM6 and cells resistant to L-asp derived from REH, NALM6 by long-term incubation with L-asp. GEP revealed that two pathways, one regulating protein translation, the other metabolism, are strongly involved in the effect of L-asp. Glutamine is an important cellular energy source, it is also important for the activation of PI3K/Akt/mTOR pathway - the key regulator of translation. We focused on the effect of L-asp treatment on translation and bioenergetics in leukemic cells. The amount of p-P70S6K expression fell in REH and NALM6 after treatment with L-asp. The MTS assay proved that the L-asp and rapamycin co-treatment strongly diminished viability of all cell lines, even those resistant to L-asp. c-Myc as an activator of glutamine catabolism showed a significant decrease in REH and NALM6 after incubation with L-asp. Importantly, c-Myc activates glycolysis which is a main energy generator in cancer cells rather than oxidative phosphorylation (OXPHOS). We showed diminishment of Glucose transporter type 1 protein expression and reduced level of lactate, the product of cancer cell glycolysis, in media after L-asp exposure. Cell respiration, that mirrors OXPHOS, was increased in REH and NALM6 after L-asp exposure. Respiration of healthy lymphocytes was not changed after incubation with L-asp. Our results indicate that leukemic cells, which normally depend on glycolysis for energy generation rather than OXPHOS, are able to swap these two mechanisms of energy generation under amino acid deprivation stress. L-asp inhibits mTORC1, glycolysis and activates OXPHOS. We believe that these metabolic changes are mainly caused by the effort of the cells to mobilize another mitochondrial pathway with the aim to supply depleted amino acids. We conclude from these data that resistance of the cells is caused by better biochemical adaptability to the nutrient deprived environment. NT/12429-5, UNCE204012

2397.

NK cells in dasatinib-treated chronic myeloid leukemia patients are terminally differentiated effector cells lacking homing and KIR receptors

Colom-Fernandez B., Kreutzman A., Maestro Gutiérrez B., López Huete V., García-Gutiérrez V., Steegmann J. L., Muñoz Calleja C. (*Instituto de Investigación Sanitaria Princesa, Servicio de Inmunología, Hospital Universitario de La Princesa, Madrid – Spain; Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain*)

BCR-ABL1 inhibitors have dramatically improved the prognosis of chronic myeloid leukemia (CML) patients. One of them is dasatinib, which is known to have immunomodulatory effects in vivo. Previous studies have suggested that NK cells might improve therapy responses in dasatinib-treated patients. Our aim was to perform a complete NK cell phenotyping in these patients to study the suggested role of NK cells in the enhanced therapy responses. Peripheral blood samples were obtained from 14 dasatinib-treated patients (13 CML and 1 Ph+ ALL), both first-line (n=5) and second-line (n=9), before the intake of their daily drug dose. As controls, samples from 11 healthy donors were analyzed. The samples were phenotyped with a comprehensive 8-color flow cytometry panel (total 32 antibodies). The patients had been using dasatinib for 1-60 months (mean 17). The age of the patients ranged between 26-76 (mean 49 years) and of the healthy between 25-57 years (mean 42 years). Dasatinib-treated patients have equal proportions of NK cells (CD3negCD56+) of total lymphocytes as healthy (mean 17.9 vs. 11.8%; p=0.64). NK cells from patients expressed lower proportions of the trafficking receptors CCR7 (6.8 vs. 25.8%; p=0.019), CD62L (24.9 vs. 45.7%; p=0.038), and CD11b (29.6 vs. 70.4%; p=0.003). Further, a lower frequency of the activation and proliferation markers CD25 (2.4 vs. 5.7%; p=0.035), CD27 (5.3 vs. 16.6%; p=0.031), CD28 (0.5 vs. 2.9%; p=0.002), and CD45RO (1.5 vs. 5.4%; p=0.023) were observed in the patients. Also, the patients had a lower frequency of NK receptors: NKG2D (69.1 vs. 85.8%; p=0.040), NKP30 (36.7 vs. 74.3%; p=0.004), CD158d (1.2 vs. 2.8%; p=0.065), NKG2A (22.6 vs. 39.8%; p=0.063), NKB1 (6.3 vs. 16.4%; p=0.005) and CD161 (31.2 vs. 68.6%; p=0.003). In contrast, the frequency of CD57+ (61.3 vs. 36.0%; p=0.013) NK cells was higher in the patients than in the healthy donors. In summary, NK cells in dasatinib-treated patients has similar phenotype to chronically activated NK cells, characterized by terminally differentiated effector cells lacking homing receptors and KIR receptors. Functional studies are ongoing to determine the cytotoxicity of these specific NK cell subtypes.

SYMPOSIUM ON ADVANCES IN MOLECULAR HEMATOLOGY - ERYTHROPOIESIS,

2503.

Molecular Heterogeneity and Diagnostic Challenges of Haemoglobinopathies in Dubai

Baysal E. (*Genetics Center, Al-Wasl Hospital, Dubai - SAE; cestovné hrazeno z OPVK projektu UP: reg. č. CZ.1.07/2.3.00/20.0164 a CZ.1.07/2.2.00/28.0088*)

2415.

VHL mutations associated with congenital polycythemia

Láníková L., Prchal T. J. (*Department of Biology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc – CZ; Division of Hematology, University of Utah and VA Health Care, Salt Lake City - USA*)

Von Hippel-Lindau (VHL) is a tumor-suppressor gene, mutations of which have been long recognized to predispose to renal cancer, pheochromocytoma and other cancers. Notably, mutations clustering at different position appear to favor certain tumor types. VHL is a negative regulator of hypoxia inducible transcription factors (HIFs). While HIF-1 plays a central role in cancerogenesis more remains to be learned of the genesis of cancer and associated augmented hypoxic signaling. The detailed study of pre-cancerous mutations and their progression, or lack-of-progression, to a cancer phenotype provides such an opportunity. Two homozygous mutations located at the 3' portion of the VHL coding region cause polycythemia but not VHL syndrome cancers: Chuvash VHL R200W and Croatian VHL H191D. We recently found a second polycythemic Croatian VHL H191D homozygote distantly related to the first propositus. Three generations of both families were genotyped for analysis of shared ancestry. Biochemical and molecular tests were performed to better define their phenotypes, with an emphasis on comparison with Chuvash polycythemia. The VHL H191D mutation did not segregate in the family defined by the known common ancestor ~6 generations ago, as the founder of this mutation. We show that EPO levels in homozygous VHL H191D individuals are higher than in VHL R200W patients of similar ages, and their native erythroid progenitors, unlike Chuvash VHL R200W, are not hypersensitive to EPO. We also described a new homozygous VHL exon 2 mutation (VHL P138L) associated in the affected homozygote with congenital polycythemia but neither she nor her heterozygous relatives have cancer. This contrasts with reports of other heterozygous VHL mutations replacing the same amino acid residue VHL P138R, VHL P138T that have been reported in tumors of VHL syndrome; i.e. renal cancer. We show that VHL P138L has a perturbed interaction with HIF1 α . Further, VHL P138L protein has decreased stability in vitro and reduced affinity for HIF1 α , resulting in a reduced rate of ubiquitination under non-hypoxic conditions. Similarly to what was reported in Chuvash polycythemia, and some other instances of HIFs up-regulation, VHL P138L erythroid progenitors are hypersensitive to EPO. These studies further define the hematologic phenotype of VHL mutations associated with polycythemia and provide additional evidence for phenotypic heterogeneity associated with the positional effects of VHL mutations.

2416.

The germline E846D JAK2 mutation from a patient with congenital polycythemia causes increased and prolonged activation of STAT5

Kapralová K., Horváthová M., Kučerová J., Pospíšilová D., Divoký V. (*Ústav biologie LF UP, Olomouc; Dětská klinika, FN, Olomouc*)

We have analyzed the erythropoietin receptor and hypoxia-sensing pathways in a young Czech patient with congenital erythrocytosis. Two heterozygous mutations, an E846D in JAK2 and a Q157H in PHD2, were detected in the propositus; each being inherited from one parent. Both parents had normal red blood cell parameters. The propositus exhibited an increase in hemoglobin level (172 ± 5 g/l), with $5.6 \pm 0.2 \times 10^{12}$ /l RBC count, plethora and splenomegaly. The test of the in vitro sensitivity of erythroid progenitors to erythropoietin showed hypersensitivity for the patient's erythroid progenitors and slightly increased sensitivity of both parents' samples when compared to normal controls. Functional analyses of the E846D JAK2 mutation revealed no survival advantage but increased

and prolonged activation of STAT5 and prolonged activation of ERK1/2 when compared to wild-type JAK2. The second Q157H PHD2 substitution was recently classified as a rare SNP. Our data suggest that the mild functional impact of E846D JAK2 mutation may predispose to polycythemia and in combination with other lesion(s) results in the full manifestation of the disease phenotype. Grant support: GAČR P301/12/1503, IGA MZČR NT/11208-4, LF UP grant LF_2013_010.

2421.

Repressive chromatin modifications of a key hematopoietic transcription factor PU.1 in MDS indicate complex disruption of PU.1 transcription regulation.

Burda P., Vargová K., Dusílková N., Jonášová A., Stopka T. (*Ústav patologické fyziologie 1.lékařské fakulty UK, Praha; 1. interní klinika - klinika hematologie, 1. lékařská fakulta, UK v Praze a VFN, Praha*)

Introduction: Erythroid differentiation, process perturbed in Myelodysplastic syndromes (MDS), is regulated by interplay between transcription factor GATA-1 (erythroid-megakaryocytic program) and PU.1 (myeloid-lymphoid). PU.1 is down-regulated during erythroid maturation and its deregulation blocks erythroleukemia differentiation. PU.1 gene transcription is regulated by coordination of distal enhancers (including the upstream regulatory element, URE) with the proximal promoter. Deletion of URE in mouse decreases PU.1 expression and causes AML. Chromatin modifications and DNA methylation play central role in regulation of PU.1 expression. We have reported that 5-azacitidine (AZA) demethylates PU.1 URE DNA accompanied by increased histone H3K9 acetylation and decreased H3K9 trimethylation all associated with increased mRNA and protein of PU.1 and sign of cell differentiation. We herein provide chromatin immunoprecipitation (ChIP) data to document histone modification of PU.1 gene locus in four AML/MDS derived cell lines and five high risk MDS patients. We also provide new aspects of PU.1 gene regulation via GATA-1 binding to PU.1 enhancing regions in MDS, process preceded chromatin remodeling. Methods: Five patients (classified according to WHO) represented rather advanced disease, three with AML transformation and two RAEB I. Following AZA two patients achieved partial remission and three stable disease with haematology improvement. All are long survivors with median OS more than 24 months. ChIP was done on bone marrow cells depleted of B and T cells and on AML/MDS derived cell lines exhibiting defect in myelopoiesis (OCI-M2, HEL, K562, SKM1). Results: We provide data that in MDS patients the URE, enhancer (-12.5kb) and the PU.1 promoter are ~ 10 fold enriched with H3K9Me3 modification correspondingly to apparent DNA methylation status at URE. We found that these regions are enriched by H3K27Me3 indicating involvement of additional repressive mechanisms. The same regions were also characterized by inverted pattern of H3K9 acetylation. We also used AML/MDS-derived cell lines and observed prominent overlap of the ChIP data. Furthermore, our experiments using manipulation with GATA-1 levels in nucleus prove that GATA-1 repress PU.1 gene expression in AML/MDS. GATA-1 binding to PU.1 is suspected mechanism preceding pathological repressive chromatin and DNA methylation changes. Grants: GAČR P-301/12/P380, UNCE 204021, PRVOUK-P24/LF1/3, SVV-2012-264507.

2428.

GATA-1-mediated transcriptional regulation of Erythropoietin receptor (EpoR) gene is impaired by downregulation of Divalent metal transporter (Dmt1)

Čuřík N., Burda P., Zikmund T., Savvulidi F., Horváthová M., Divoký V., Stopka T. (*Institute of Pathological physiology, First Faculty of Medicine, Charles University, Praha; Department of Biology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc*)

Dmt1 is responsible for transfer of iron internalized by transferrin receptor across the membrane of acidified endosome into the cytoplasm of erythrocytes. Patients carrying mutations affecting DMT1 expression suffer from severe microcytic anemia. Their erythroid progenitors are small, slowly growing and morphologically abnormal compared to progenitors derived from healthy controls. In vivo, this defect can be rescued by stimulation of erythropoiesis by EPO. In vitro, addition of high doses of EPO together with iron-saturated salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (a non-transferrin iron donor) to the cultures significantly improved the growth of patient's DMT1-deficient erythroid progenitors. That supposes that low expression of functional DMT1 in erythroid progenitors may in-

terfere with some parts of EpoR/ EpoR signaling. Process of growth, survival, differentiation and maturation of erythroid progenitors is directed by transcription factor GATA-1. This process involves active transcription of EpoR gene during erythroid commitment. Process of erythroid differentiation is antagonized by pro-monocyte/granulocyte transcription factors PU.1 and CEBP/α. We used mouse erythroleukemia (MEL) pro-erythroblast cells expressing inducible transgenes of GATA-1 (GER) or PU.1 (PUER) to elucidate mechanisms of EpoR regulation. We established that GATA-1 and PU.1/ CEBP/α regulate EpoR gene expression directly by recruitment on DNA. Expression is regulated by GATA-1 and PU.1 in opposite manner and is accompanied by either enrichment or depletion of active chromatin mark H3K9Ac at novel putative regulatory region of EpoR. We found that Dmt1 downregulation by siRNA prevents activation of EpoR expression during GATA-1-induced erythroid differentiation of MEL cells. Downregulation of Dmt1 diminishes GATA-1 expression and consequently GATA-1-dependent activation of EpoR gene. To establish impact of Dmt1 deficiency on EpoR expression in vivo we are currently using model of mk/mk mice with natural mutation of Dmt1 affecting expression of properly matured protein resulting in microcytic anemia. Our aim is to isolate hematopoietic progenitors and cell populations in several stages of erythroid commitment from bone marrows of mk/mk and wt mice via FACS sorter and determine expression of EpoR, GATA-1 and PU.1 in cell populations of mk/mk and wt mice. Grants: P305/11/1745, P301/12/P380, P305/12/1033, PRVOUK-P24/LF1/3, UNCE 204021, SVV-2012-264507, GAUK 251135 82210

2488.

MDS 5q- and Diamond-Blackfan anemia - two different hematological diseases with the same etiology of severe macrocytic anemia?

Pospišilová D. (*Dětská klinika FN, Olomouc*)

KONFERENCE OŠETŘOVATELSTVÍ A ZDRAVOTNÍCH LABORANTŮ - OŠETŘOVATELSTVÍ 1

2477.

Sestra a její současné postavení, role, vize

Jurásková D. (*VFN a 1. LF UK, Praha*)

2325.

Supervizní program pro NLZP v adaptačním procesu

Zítková M., Špačková J. (*Interní hematologická a onkologická klinika, FN Brno a LF MU, Brno*)

Úvod Pravidelná reflexe vlastní ošetrovatelské práce, která se během supervizního procesu odehrává v bezpečném, podpůrném a přátelském prostředí, je nejlepší způsob, jak zvyšovat kvalitu poskytované péče a profesní dovednosti a také jak se naučit konstruktivně řešit problémy v kolektivu pracovníků. Z těchto důvodů by se měla supervize stát součástí adaptačního procesu pro nově nastupující pracovníky a také pro pracovníky v pracovním procesu již zařazené. V českém ošetrovatelském prostředí není dosud pojem supervize plně zažit. Metoda Na základě grantového úkolu IGF 5/11 byl v roce 2012 realizován supervizní program pro NLZP, kteří procházeli adaptačním procesem. V prvním roce realizace jsme se soustředili především na stanovení základního rámce realizace supervizního programu, vytvoření edukačního materiálu pro NLZP, realizaci supervizních setkání a v neposlední řadě jsme se věnovali dalšímu prohlubování vzdělání supervizorů. Výsledky V průběhu roku 2012 bylo na konkrétním pracovišti zrealizováno 25 supervizních skupinových setkání v celkovém rozsahu 34 hodin supervizní práce se 4 supervizními skupinami. Supervizní setkání trvalo v průměru 80 minut, průměrný počet zúčastněných NLZP byl 5. Účast pracovníků na supervizních setkáních byla 92%. Důvody absence na setkáních byly také analyzovány. Supervizní skupiny byly vytvořeny z nově nastupujících NLZP na dané pracoviště. Vzhledem k počtu nově nastoupivších pracovníků byly postupně vytvořeny 4 supervizní skupiny. Základním kritériem zařazení do určité skupiny byl podobný termín nástupu na pracoviště. Na zařazení na konkrétní oddělení kliniky nebyl záměrně brán zřetel. K datu 31. 12. 2012 je v aktivním supervizním programu zařazeno 27 NLZP. Závěr Zavedení pravidelného režimu supervizí pro NLZP v adaptačním procesu si klade za cíl udržení patřičné úrovně motivace pracovníků, podporu osobnostního růstu, upewnění profesní sebejistoty a také přispění k naplnění jejich potřeb ve vztahu k práci.

2380.

Výskyt plicních a bronchiálních infekcí u pacientů po transplantaci krvetvorných buněk provedených v pokojích s nebo bez HEPA filtrace vzduchu – konečné výsledky studie

Bystřická E., Vokurka S., Brandejsová R., Škardová J., Labudíková M., Pavlicová V., Zítková M., Hrabánková-Navrátilová D., Jindra P., Koza V., Indrák K., Malý J., Mayer J., Trněný M.

(*Hematologicko-onkologické oddělení FN, Plzeň; FN, Olomouc; FN, Hradec Králové; FN, Brno; VFN, Praha*)

Úvod: HEPA filtrace vzduchu je doporučována v pokojích pacientů během transplantací krvetvorných buněk, obzvláště alogenních. V některých centrech však není HEPA filtrace dostupná a transplantace mohou být bezpečně prováděny nejspíše i v pokojích bez HEPA filtrace vzduchu. Sesterská skupina East Forum EBMT spolupracuje od 1/2010 na observační studii, která si klade za cíl ověřit výskyt plicních a bronchiálních infekcí u pacientů s ohledem na dostupnost HEPA filtrace v transplantačních pokojích. Metodika a pacienti: Sledovací, prospektivní, multicentrická studie. Každý transplantovaný pacient spolupracujícího centra je chronologicky zařazen do sledování. K záznamům dat jsou připraveny monitorovací karty. Sledování probíhá od dne přijetí pacienta k transplantaci do dne +100 po transplantaci. Definice: Plicní nebo bronchiální infekce = klinická (např. kašel, dušnost) nebo radiologická (RTG, CT) známka plicní nebo bronchiální infekce společně se zvýšenou tělesnou teplotou a/nebo zvýšeným CRP. Výsledky: Od 1.2010 do 6.2012 bylo do sledování zařazeno 689 pacientů. Jediný důležitý a téměř statisticky významný rizikový faktor pro rozvoj pneumonie ($p = 0,05$) byla léčba GVHD kortikosteroidy. Nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl v celkové mortalitě do dne +100: 14% na pokojích s HEPA filtrací vzduchu a 17% bez HEPA filtrace ($p = 0,6$) z celkového počtu

rozvinutých pneumonií. Závěr: Incidence pneumonie do dne +100 u autologních HSCT je obecně velmi nízká a autologní HSCT mohou být bezpečně prováděny na dvoulůžkových pokojích bez filtrace vzduchu. Dvakrát více pneumonií bylo pozorováno u alogenní HSCT, zejména u pacientů léčených kortikosteroidy, s vysokou mírou úmrtnosti a převládající mykotické etiologie. Nebyl prokázán rozdíl mezi pacienty léčenými na pokojích s HEPA, nebo bez HEPA filtrace vzduchu.

2355.

Retrospektivní, monocentrická analýza výskytu nežádoucích účinků v souvislosti s celotělovým ozářením u dospělých

Špačková J., Zítková M., Mužík J., Malúšková D. (*Interní hematologická a onkologická klinika LF MU a FN, Brno; Institut biostatistiky a analýz MU, Brno*)

Úvod: Celotělové ozáření (TBI) je standardní léčebnou metodou v rámci multidisciplinárního přístupu při allogenní transplantaci krevetvorných buněk. Pacienti, kteří celotělové ozáření podstoupí, mají zvýšené riziko vzniku akutních nežádoucích účinků (NÚ). Metody: Do této studie byli zahrnuti pacienti léčení TBI v režimu jednorázového ozáření v dávce 4 Gy v letech 2008 až 2012. Veškeré údaje o léčbě byly shromážděny retrospektivně ze zdravotnické dokumentace pacientů jednoho pracoviště. Data byla zpracována frekvenční analýzou v případě kategoriálních parametrů a odhadem průměru, mediánu a rozsahu hodnot u spojitých parametrů. Asociace kategoriálních parametrů byla testována pomocí Fisherova exaktního testu, Ke statistickému zpracování dat byl zvolen Fisherův exaktní test, (hladina významnosti $p \leq 0,05$, $\alpha=0,05$). Výsledky: Analýza akutních nežádoucích účinků byla provedena celkem u 100 pacientů ≥ 20 let, u kterých bylo v rámci přípravného režimu provedeno TBI. V souboru bylo 54 mužů a 46 žen ve věku 20 - 63 let. Ve většině případů se jednalo o nemocné s diagnózou leukemie (AML 51 %, CLL 13 %, CML 3 % a ALL 2 %). Akutní NÚ byly zjištěny u 85 pacientů, průměrný věk 47 (20; 63) let. Kumulativní incidence (CI) do dne 30 po TBI byla zjištěna v 62 % průjem, 39 % kožní toxicita, 29 % nechutenství, 18 % zvracení, 13 % oropharyngeální mukozitida, 12 % nevolnost, 12 % únava, 12 % venookluzivní choroba jater, 8 % bolest, 2 % psychické změny. Při podrobnější analýze kožních NÚ bylo zjištěno jejich trvání v průměrné délce 5,3 (1; 18) dní s nástupem v průměru 2,9 (0; 11) dny od TBI (TBI = den 0). Kožní změny byly zaznamenány u 39 % nemocných, nejčastějším kombinovaným postižením byly oblasti dlaně, plosky a genitálu (9 % všech pacientů, 23,1 % pacientů s kožními změnami). Průjem se nejčastěji vyskytl 1 den po TBI, s mediánem trvání 4 (1; 18) dny. Při statistickém zpracování byl zjištěn statisticky významný rozdíl ($p = 0,002$) v CI průjmů u žen (78,3 %) a u mužů (48,1 %). Rovněž nechutenství u nemocných ve věku 50 a více let se vyskytlo statisticky významně častěji než u nemocných ve věkové kategorii mladších 50 let (p menší 0,001). Závěr: V rámci našeho retrospektivního sledování jsme zaznamenali významný výskyt nežádoucích účinků. Zjištěné nežádoucí účinky mohou být způsobeny nejen vlastním TBI, ale kombinací mnoha faktorů, ke kterým lze zařadit přípravný režim, převod krevetvorných buněk, komorbiditu a další, kterým se v budoucnu chceme podrobněji věnovat.

2353.

Ovlivnění nevolnosti a zvracení pomocí antiemetika palonosetron (Aloxi) při autologní transplantaci krevetvorných buněk po přípravě s Alkeranem

Hartl P., Brandejsová R., Kolerusová P., Bystřická E., Vokurka S. (*Hematologicko-onkologické odd.-AUTO JIP, FN, Plzeň*)

Úvod: Dávkovaná chemoterapie s Alkeranem a následnou autologní transplantací krevetvorných buněk je doprovázena nevolností a zvracením. Palonosetron (Aloxi) je moderní antiemetikum s protrahovaným efektem účinku. Cíl: Ověřit efekt palonosetronu (Aloxi) v případě aplikace v den infuze vysokodávkovaného Alkeranu. Metodika: Prospektivní sledování, monitorovací karta, sledování výskytu nevolnosti a/nebo zvracení v intervalu do 24,48,72,96 a 120 hodin, nutnost doplnění jiného antiemetika, nežádoucí účinky, spokojenost pacienta a zdravotníků. Palonosetron (Aloxi) 1 amp. i.v. aplikována v den -1 (ráno) před aplikací Alkeranu. Výsledky: Počet pacientů 9 (muži 6, ženy 3), dg. mnohočetný myelom, autologní transplantace v 1-2/2013. Nevolnost při chemoterapii v minulosti 7/9 (77%), obava z rozvoje nevolnosti 3/9 (33%), rozvoj nevolnosti do 120h (do dne +3)u 6/9 (66%) pacientů, zvracení do 120h u 4/9 (44%), potřeba doplnění antiemetik u 5/9 (55%), pozorované nežádoucí účinky žádné, spokojenost pacientů: velmi spokojen 56%, spokojen 22%, nespokojen 22%,

spokojenost ošetřujících: velmi 44%, spokojen 33%, nespokojen 22%. Závěry: U prvních 9 pacientů jsme ověřili efekt palonosetronu na ovlivnění nevolnosti a zvracení po emetogenním vysokodávkovaném Alkeranu. Po dobu 5 dní sledování nedošlo k rozvoji zvracení u poloviny pacientů. Nevolnost pocítily dvě třetiny pacientů. Při selhání léčby bylo doplněno další antiemetikum (většinou Degan i.v.). Celkově spokojenost s kontrolou nevolnosti/zvracení vyjádřilo 78% pacientů. Palonosetron prokázal efekt bez vedlejších účinků.

2332.

Faktory ovlivňující používání periferních žilních katetrů

Kouřilová P., Zítková M. (*Interní hematologická a onkologická klinika FN, Brno*)

Úvod: Předpokladem úspěšné onkologické léčby je mimo jiné zajištění kvalitního žilního přístupu. V našich podmínkách představuje periferní žilní katetrizace (dále PŽK) jednu z nejčastěji využívaných možností pro nitrožilní aplikaci léčiv. Výkon katetrizace včetně délky bezpečného zavedení je metodicky upraven standardním ošetřovatelským postupem, vycházejícím z doporučení CDC, dále se řídí pokyny výrobce a klinickými projevy. Metoda: V období 4-5/2012 byla na našem pracovišti realizována prospektivní monitorovací studie 500 případů zavedených PŽK. Cílem výzkumu bylo zmapovat aspekty uplatňující se v souvislosti s používáním těchto katetrů. Získaná data byla zpracována frekvenční analýzou v případě kategoriálních parametrů a odhadem průměru, mediánu a rozsahu hodnot u spojitých parametrů. Asociace kategoriálních parametrů byla testována pomocí Fischerova exaktního testu. Výsledky: Soubor tvořilo 64,2 % případů zavedených PŽK u nemocných s hematologickou diagnózou, 20,4 % s onkologickou dg. a v 15,4 % případů nemocných s ostatními diagnózami. Průměrná délka použití katétru byla 4,2 dny (medián 4 dny). Důvodem ukončení katetrizace byla v 56,6 % nepotřebnost, 27,4 % nefunkčnost systému, v 7 % byla realizována pravidelná výměna PŽK, v 5,6 % případů byla paravenózní aplikace léčiv a v 3,4 % byla infekce. Při hodnocení tíže flebitis dle Maddonovy škály byl v 83,4 % zjištěn stupeň 0, st. 1 v 8 %, st. 2 u 5 % PŽK a st. 3 u 3,6 %. Byl zjištěn statisticky významný rozdíl v délce trvání katetrizace a tím se stal reálným důvodem k ukončení. Výskyt komplikací při podávání protizánětlivých léků byl statisticky významně vyšší ($p < 0,001$), než u nemocných, kteří protizánětlivé léky nedostávali. Při hodnocení Maddonovy škály tíže flebitis při ukončení byl výskyt stupně 0 statisticky významně vyšší ($p < 0,001$) u pacientů, kterým byla aplikována chemoterapie, než u nemocných, kteří chemoterapii neměli. Při srovnání výskytu různých stupňů Maddonovy škály tíže flebitis se ukázalo, že na vzniku stupně 2 a 3 mají významný podíl přípravky s nižším pH než 5 a s vyšším než 9. Závěr: V rámci našeho výzkumu byly zjištěny zajímavé a přínosné informace, se kterými je třeba dále pracovat, např. rozpracovat vliv samotného pacienta na délku trvání katetrizace a možné komplikace s ní spojené. V praxi je nutné vnímat rizika i omezení, kterými je PŽK doprovázena, včetně snížení kvality života pacientů a vlivu na periferní žilní fond nemocného.

KONFERENCE OŠETŘOVATELSTVÍ A ZDRAVOTNÍCH LABORANTŮ - OŠETŘOVATELSTVÍ 2

2301.

Mýty a realita pracovních hodnot všeobecných sester

Ivanová K., Vévoda J., Juričková L., Tučková D. (*Ústav sociálního lékařství a zdravotní politiky, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc*)

Zaměstnavatelé ve zdravotnictví jsou nuceni hledat nové nemonetární cesty k pracovní motivaci zdravotních sester. K tomu je nezbytné znát nejen současné pracovní hodnoty zdravotních sester, ale zejména ty pracovní hodnoty, které mají stabilitu v čase, byly pro sestry důležité v minulosti, jsou pro ně důležité v současnosti a umožňují predikovat způsob motivace i do budoucnosti. Jak ukazují výzkumy v zahraničí (Adams, 2000, Sveinsdóttir et. al., 2006, De Cooman et. al., 2008) a opakované výzkumy v ČR (Juričková 1999 a 2004, Vévoda, Ivanová 2004, 2006, 2011) pracovní spokojenost sester je založena zejména na jejich schopnosti dostát požadavkům své profese. Nejvyšší pracovní prioritou je pro ně profesionální role zdravotní sestry. K tomu, aby mohly dobře dělat svoji práci, potřebují mít podporu zaměstnavatele se zájmem o zvyšování kvality ošetrovatelské péče. Je možno tedy konstatovat, že tradiční podstata a obsah práce sester (tj. práce samotná) byla a je pro ně stále motivační i v současnosti. Jednání ve prospěch druhých lidí a péče o pacienty jsou stále nejvyššími motivátory pro profesionály v ošetrovatelství, a lze předpokládat jejich význam i v budoucnosti. Zdravotní sestry jsou specifickou sociální skupinou, stejně jako lékaři, která je ovlivněna posláním zdravotnictví, pečujícím povoláním, které překračuje bariéru lidského soukromí i lidského těla, statutem a rolí zdravotnických pracovníků, která je včetně celoživotního vzdělávání dána zákonem. Kontinuální vzdělávání sester je nejen požadavkem ale i povinností založenou na kreditním systému, jenž je kontrolován v rámci vydávání osvědčení k výkonu povolání bez odborného dohledu. Cílem příspěvku je doložit, že práce samotná je pro zdravotní sestry motivující bez ohledu na aktuální socioekonomické poměry. Tyto pracovní hodnoty vycházejí z evropské kultury, založené na humanismu a křesťanském milosrdenství. Projekt Podpora lidských zdrojů ve VaV nelékařských zdravotnických oborů Fakulty zdravotnických věd UP Olomouc. Registrační číslo: CZ.1.07/2.3.00/20.0163.

2294.

Využití radiofrekvenční identifikace (RFID) při přípravě a aplikaci chemoterapie

Vykoukalová E., Kocourková J., Ciprová T. (*Masarykův onkologický ústav, Brno*)

V roce 2011 byla v Masarykově onkologickém ústavu Brno (MOÚ) ukončena realizace unikátního projektu - zavedení technologií RFID do procesu přípravy a podávání chemoterapie za podpory Ministerstva mládeže, školství a tělovýchovy v rámci Národního programu výzkumu II. NPV č. 2C06024. Došlo tak k zautomatizování a zpřesnění dílčích operací při přípravě chemoterapie a při její aplikaci pacientovi. V kterýkoliv čas je možné zjistit, kdo, kdy a jak s léčivem nakládal. Podařilo se zefektivnit monitorování pohybu osob v kontrolovaném pásmu a získat podklady k vyhodnocení profesní zátěže zaměstnanců v kontrolovaném pásmu. Díky realizaci projektu se odstranila kritická místa v celém procesu přípravy a podávání chemoterapie. Nemůže dojít ke zdvojení dávky opakovaným přidáním léčiva do infuzního vaku nebo k záměně léčiv v rámci přípravy pro jednoho pacienta ani k aplikaci připraveného léčiva nesprávnému pacientovi. Při přípravě a aplikaci chemoterapie se v MOÚ pracuje se třemi informačními systémy. Nemocniční informační systém (NIS) eviduje informace o pacientech a probíhá v něm správa chemoterapeutických režimů a předepisování terapie. Lékařský informační systém (LIS) je standardním informačním systémem běžně používaným v lékárnách, jen je v tomto případě vybaven dalšími funkcionalitami umožňujícími aktivní podporu přípravy, evidenci osob, apod. Informační systém pro aplikaci terapie (AIS) slouží sestrám na stacionářích při aplikaci chemoterapie a byl vyvinut speciálně pro projekt. Všechny tři informační systémy jsou navzájem propojeny, navzájem si předávají informace, ukládají je a umožňují jejich prohlížení. Po vtištění protokolu lze přesně zjistit, která osoba v jaký čas s léčivem u konkrétního pacienta pracovala. Dále jaký zdravotnický přístroj byl použit, jaký žilní vstupem byla chemoterapie aplikována, zda před, při a po aplikaci byly detekovány a řešeny subjektivní nebo objektivní potížemi pacienta. RFID technologie se v MOÚ po ukončení projektu již běžně používá při aplikaci chemoterapie v am-

bulantní části a byla rozšířena i pro aplikaci ostatních podpůrných léčiv. V tomto roce se plánuje postupné zavádění a využití RFID technologie při aplikaci chemoterapie u hospitalizovaných pacientů.

2278.

Edukační stáž v Maastrichtu

Krpatová J. (*Klinika nemocí kožních a pohlavních, FN, Hradec Králové*)

Nadace prof. Zdeňka Zadáka mi umožnila absolvovat edukační stáž v AZM Maastricht, byla jsem vybrána spolu s dalšími 6-ti kolegyněmi z ČR. Stáž se uskutečnila v termínu 28.10. - 2.11.2012. Po celou dobu stáže v AZM se nám věnoval manžer pro systém vzdělávání pan Dewalq. Nejprve nás seznámil s historií nemocnice, s cíli nemocnice, se systémem vzdělávání a po té nás provedl celou nemocnicí. Navštívili jsme také nově dokončenou budovu Oční kliniky, která byla velice vkusně barevně řešená. Tým jednotlivých klinik a oddělení má možnost ovlivnit barevnost prostředí ve kterém pracují. Vedení nemocnice má kladný vztah k umění a celá nemocnice je velice vkusně zařízena a nechybí zde nádherné obrazy, plastiky a fotografie. Celá naše skupina byla nadšená z pojezdů vozíků pro pacienty, které byly k dispozici u vchodu do nemocnice, na parkovišti před nemocnicí tak, jako u nás „košíky“ v supermarketu. Během dalších dnů jsme postupně navštívili oddělení kardiologie, pohotovost, dialýzu, dostatek času byl věnován onkologickému stacionáři, jednodenní chirurgii a měli jsme možnost shlédnout i lůžkové oddělení pro dospělé pacienty. Na odděleních je veškerá medikace chystána centrálně, na daného pacienta s vlastním čárovým kódem totožným na identifikačním náramku pacienta a sestra do počítače scanuje kód, je tedy jasně dáno kdo lék podal a v kolik hodin, nedochází tedy ke ztrátám a záměně léků. Veškeré záznamy se provádějí přímo do pojezdného počítače. V současné době vedení nemocnice uvažuje o zakoupení iPadů pro personál k zaznamenávání do dokumentace pacientů. Co mne velice zaujalo byla kompletní čistotka a sušička na lůžka a noční stolky, dokonce na pohotovosti měli vlastní myčku a sušičku na dlouhé vozíky. Lůžka a stolky se tak na oddělení dostávala čistá a povlečená. Dále mne zaujal systém výdeje personálního prádla pomocí čipové karty. Každý zaměstnanec má nárok na dvě čisté uniformy denně, prádlo je čipované a zaměstnanec si uniformu vyzvedává centrálně v automatu na čipovou kartu, dle své profese i velikosti dostane tu správnou uniformu. Také je sledováno jak často si zaměstnanec uniformu mění a z jakého pracoviště ji posílá. Nedochází tak ke ztrátám a záměně personálního prádla. Celá stáž byla velice zajímavá a poučná.

2362.

Primární systémová AL-amyloidóza

Gregorová M. (*III. interní klinika FN, Olomouc*)

Primární systémová AL-amyloidóza – popis případu Náplní práce je kasuistické sdělení popisující průběh onemocnění u pacienta s AL amyloidózou. Primární AL-amyloidóza je vzácné systémové onemocnění charakterizované nadměrnou tvorbou nerozpustných fibrilárních bílkovin. Tyto bílkoviny jsou tvořeny monoklonálními lehkými řetězci imunoglobulinu ve formě AL-amyloidu, který se následně ukládá v řadě orgánů a tkání a může způsobit jejich poruchy nebo až selhání. U nemocných se obvykle AL amyloidóza manifestuje nespecifickými příznaky spojenými s poklesem krevního tlaku (synkopální stavy, slabost) v rámci projevů postižení srdce, paresteziemi končetin při postižení periferních nervů, nefrotickým syndromem až ledvinným selháním při ukládání amyloidu v ledvinách, případně zažívacími potížemi (průjem, zácpa, malabsorpce, makroglosie) při postižení zažívacího traktu. Diagnóza se opírá o stanovení hladiny volných lehkých řetězců imunoglobulinu v séru, nezbytnou součástí je ale histologické ověření přítomnosti amyloidu ve vzorku postižené tkáně (jazyk, podkožní tuk, kostní dřeň, myokard) pomocí speciálního barvení konžskou červení. Léčba onemocnění bývá je složitá a vyžaduje mnohaměsíční podávání chemoterapie, v současnosti i chemo-imunoterapii. Prognóza onemocnění závisí na rozsahu postižení, nejčastější limitací bývá postižení myokardu.

2315.

Plazmaferéza- rozšíření variability separátoru Trima Accel

Hlávková E., Chmelová S., Entrová A., Galuszková D. (*Transfúzní oddělení, FN, Olomouc*)

Úvod: V loňském roce byla činnost TO FN Olomouc rozšířena o aferetický odběr plazmy na přístroji Trima Accel. Nový Plasma - Only Collection (Multiplasma) set umožňuje samostatný odběr 1–4 jednotek plazmy. Výhodou je uzavřený systém setu. Plazma je odebírána do 4 sběrných vaků, které jsou plněny rovnoměrně po celou dobu procedury. Po ukončení separace není nutná další manipulace s vaky. Metodika: V březnu 2012 byl na našem pracovišti zahájen zkušební provoz nového setu. Odběry jsme provedli na třech přístrojích Trima Accel V 6.0. V rámci zkušebního provozu byla hodnocena vlastní procedura, kvalita produktu a možnost začlenění nové procedury do provozu našeho pracoviště. Výsledky: Po nastavení konfigurace nové procedury a parametrů pro separaci plazmy následovalo zaškolení personálu. Zkušební provoz proběhl na třech separátorech Trima Accel V 6.0. V rámci zkušebního provozu bylo provedeno 36 separací (3x12 odběrů), odebírány 4 jednotky plazmy, dárce muži s průměrnou hmotností 90kg (70 - 105kg) a hematokritem 0,44 (0,40–0,49). Průměrná doba odběru byla 45 minut (38 - 68 minut), průměrný objem jedné jednotky plazmy činil 210 ml. Všechny produkty splňovaly jakostní požadavky na karanténní plazmu. Závěr: Nový Plasma Only Collection (Multiplasma) set zvyšuje možnosti využití separátoru Trima Accel. Separátory Trima Accel jsou na našem pracovišti přednostně využívány pro multikomponentní odběry trombocytů. Nový set vhodně doplňuje nabídku procedur, maximalizuje využití přístrojů během celé pracovní doby a optimalizuje chod aferetického pracoviště. Stejná základní konfigurace odběrového setu neklade zvýšené nároky na zaškolení personálu. Nabízí možnost navýšení produkce karanténní plazmy z aferézy a efektivnější uvolňování této plazmy z karantény. Odběr 4 jednotek plazmy bez nutnosti dalších nákladů a následné manipulace s vaky, snižuje riziko kontaminace produktu a kompenzuje vyšší ekonomickou náročnost setu.

2361.

Edukační program na HOK

Hrabčíková Z., Vítková J., Labudíková M., Fišarová S. (HOK FN, Olomouc; ONP FN, Olomouc)

V roce 2010 byl ve FN Olomouc zahájen edukační program, který vede ke sjednocení a posílení iniciativ vedoucích k informování pacientů, příbuzných i veřejnosti v oblasti edukace a prevence proti nemoci. Hematoonkologická onemocnění a léčba chemoterapií event. transplantací periferních kmenových buněk vyvolávají nejistotu, strach a obavy z budoucnosti. Proto je důležité, aby pacienti měli dostatek adekvátních informací, které jim pomohou lépe zvládnout problémy související s jejich onemocněním a náročnou léčbou. Z tohoto důvodu se edukace pacienta stává neoddelitelnou součástí léčebného procesu a je zaměřená na rozšíření vědomostí v souvislosti s onemocněním a jeho léčbou. Do edukačního programu HOK Olomouc byla zařazena tato témata: chemoterapie, invazivní vstupy, výživa při chemoterapii, transplantace periferních kmenových buněk, psychosociální a spirituální péče, internet pro pacienty. V roce 2012 bylo celkem edukováno 221 pacientů v 356-ti tématech. Z toho bylo o chemoterapii v tomto roce edukováno 81 pacientů, o invazivních vstupech 35 pacientů, o výživě při chemoterapii 104 pacientů, o transplantaci periferních kmenových buněk 105 pacientů a o psychosociálních a spirituálních možnostech a internetu pro pacienty bylo edukováno 31 pacientů. V roce 2011 bylo celkem edukováno 38 pacientů v 87-ti tématech. V roce 2011 se edukační program teprve rozjížděl, vypracovávali jsme edukační materiály-brožury k jednotlivým tématům, které jsou součástí vlastních edukací, proto je počet provedených edukací v tomto roce tak nízký. Na naší klinice zajišťují edukace 2 edukační sestry. Jedna je určena pro transplantační jednotku a jedna pro JIP a standardní oddělení, na kterém není objem edukací tak velký vzhledem ke spektru diagnóz hospitalizovaných pacientů. Edukační sestra na transplantační jednotce provádí edukace před plánovaným přijetím a opakovaně první den hospitalizace. Edukace o výživě u transplantovaných pacientů následuje po přípravném režimu chemoterapií. Význam edukace pacientů není zanedbatelný. Dostatečně a správně informovaný pacient může předejít možným komplikacím v průběhu léčby a zkrátit si tak pobyt v nemocnici na dobu nezbytně nutnou.

KONFERENCE OŠETŘOVATELSTVÍ A ZDRAVOTNÍCH LABORANTŮ - ZDRAVOTNÍ LABORANTI 1,

2366.

Diferenciální diagnostika lymfocytóz na morfologické laboratoři

Mikulenková D., Šimečková R., Campr V. (ÚHKT, Praha; Ústav patologie a molekulární medicíny při 2. LF, Praha)

Lymfocytóza je přítomnost zvýšeného množství lymfocytů v hodnotách krevního obrazu (KO), a/ nebo v nátěru periferní krve (PK), které je nad normu danou věkem a event. i pohlavím. Příčin je mnoho (virová onemocnění, některé bakteriální infekce, některé přechodné reaktivní stavy, autoimunitní stavy), se zmnožením lymfocytů či přesněji lymfoidních buněk se setkáváme i u hematoonkologických onemocnění, které mohou mít akutní či chronický charakter. Morfologie patologických lymfocytů je pro některé nozologické jednotky typická (např. pro vlasatobuněčnou či chronickou lymfocytární leukemii), avšak u většiny onemocnění je diagnostická váha položena na klonální patologický imunofenotyp a suspekci na diagnózu potvrdí laboratoř průtokové cytometrie (FCM). Vstupní vyšetření nátěru PK či aspirátu kostní dřeně (KD) ale může významně napomoci v rozhodnutí, jaké markery na laboratoři FCM vyšetřit, či může upozornit na přítomnost lymfoproliferativního onemocnění. Morfologické hodnocení nátěru PK a KD tedy stále zůstává základní vyšetřovací metodou i v době rozmachu subcelulárních vyšetřovacích metod.

2290.

Myelodysplastický syndrom – diagnostický atlas

Plicka L., Vodičková E., Hochová I. (Oddělení Klinické Hematologie, FN Motol, Praha)

Myelodysplastický syndrom (MDS) je závažné onemocnění, které představuje významnou kapitolu onkohematologie. Onemocnění je závažné nejen prognózou ale často i diagnostickými rozpaky. Přitom rychlé a správné určení diagnózy a stanovení prognózy je základem volby optimální léčebné strategie. Morfologie zůstává v popředí diagnostických vyšetřovacích metod. Správné zhodnocení dřevňového nálezu a rozpoznání typických morfologických abnormalit jsou pro určení diagnózy MDS nezastupitelné. Autoři se rozhodli znovu, tentokrát v internetové podobě, vydat morfologický atlas MDS. Využili všech výhod, které internetové aplikace poskytují.

2345.

Morfologie megakaryopoezy a její typické rysy u některých hematologických onemocnění

Šimečková R., Mikulenková D., Campr V. (Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha)

Morfologie megakaryopoezy a její typické rysy u některých hematologických onemocnění. R. Šimečková, D. Mikulenková, V. Campr Morfologicko – cytochemická laboratoř, ÚHKT, Praha Megakaryocyty jsou největší buňky kostní dřeně. Základním vývojovým elementem megakaryopoezy je pluripotentní kmenová buňka, která se přes myeloidní unipotentní kmenovou buňku, megakaryoblast a promegakaryocyt diferencuje ve zralý megakaryocyt, z jehož granulární cytoplazmy se odštěpují destičky. Pro některá hematologická onemocnění je morfologie megakaryocytů typická a její správné zhodnocení v kontextu s nálezem v krevním obraze (KO) může přispět ke správnému stanovení diagnózy. Patologická morfologie megakaryocytů je typická pro některá myeloproliferativní onemocnění. „Typický“ atypické menší hypolobulizované formy v bohatě zastoupené celé řadě nacházíme u chronické myeloidní leukémie (CML) v chronické fázi. Pro polycytemické stádium polycytemia vera (PV) je typická bohatě zastoupená megakaryocytární řada s přítomností malých hypolobulizovaných forem až po elementy obrovské s hyperlobulizovanými jádry. U primární myelofibrózy (PM) v prefibrotickém stádiu jsou megakaryocyty velké až gigantické s více lobulizovaným jádrem, často jsou přítomna i holá jádra a může být patrný i výraznější clumping chromatinu. V pokročilém fibrotickém stádiu PM můžeme v hypocelulárním aspirátu kostní dřeně (KD) i v nátěru periferní krve (PK) nacházet holá jádra megakaryocytů, jejich mikrofony i mladší vývojové elementy. Bohatě zastoupená řada se shluky destiček a s velkými hyperlobulizovanými megakaryocyty s prostornou cytoplazmou je typická pro diagnózu esenciální trombocytémie (ET), často může být přítomna

i emperipoléza. Dysplastické rysy jader megakaryocytů (hypolobulizace, monolobulární formy, početnější separovaná jádra, mikroformy) nacházíme u myelodysplastického syndromu (MDS), myelodysplasticko/myeloproliferativních onemocnění (MDS/MPS), ojediněle i u akutních myeloidních leukemií (AML). U imunitně podmíněných trombocytopenií je v megakaryopoeze patrná porucha odštěpování destiček z cytoplazmy při bohatě zastoupené celé řadě. Zhodnocení megakaryopoezy je součástí cytologického vyšetření aspirátu kostní dřeně a orientačně může přispět v diagnostické rozvaze, k definitivnímu stanovení diagnózy je nutné histologické a též subcelulární vyšetření (cytogenetika, molekulární genetika).

2326.

Možnosti monitorování protideštičkové terapie

Dytrychová V., Fátorová I., Smolej L. (IV. interní hematologická klinika, FN, Hradec Králové)

Antiagregační léčba je zaměřena na omezení shlukovací schopnosti krevních destiček. V současnosti dostupné protideštičkové léky interferují s různými kroky aktivačních procesů, včetně adheze, uvolňovací reakce nebo agregace a snižují riziko arteriální trombózy, ale mohou zvýšit riziko krvácení při jejich předávkování. Nedostatečná laboratorní odpověď na protideštičkovou léčbu je průkazem neschopnosti protideštičkového léku inhibovat cíl svého působení. Jde tedy o neschopnost léku zablokovat receptor, na který je tento lék specificky cílen. Mechanismy antiagregační léčby zahrnují: a) blokaci cyklooxygenázy-1 (COX – 1, účinek kyseliny acetylsalicylové), b) blokaci destičkového receptoru P2Y12 (účinek klopogrelu, prasugrelu), c) blokaci receptoru glykoproteinu IIb/IIIa (monoklonální protilátka abciximab). Pro sledování antiagregační léčby lze využívat různé principy měření: jako je optická agregometrie (APACT 4004), impedanční agregometrie (Multiplate), systém PFA – 100 či měření adheze krevních destiček (Impact – R). Cílem této prezentace je poskytnout informace o možnostech monitorování protideštičkové terapie. Práce byla podpořena výzkumným záměrem MZO 00179906 MZ ČR.

2327.

Laboratorní diagnostika protilátek typu lupus antikoagulans

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

Antifosfolipidový syndrom je autoimunitní onemocnění způsobené tzv. antifosfolipidovými protilátkami (nazývanými také lupus antikoagulans), namířenými proti negativně nabitým fosfolipidovým povrchům či proteinům vázajícím fosfolipidy. Přítomnost těchto protilátek je spojená s tendencí k žilním a tepenným trombózám, často v neobvyklých lokalizacích, u žen dochází ke spontánním potratům, vzácně ke krvácení. Různorodost klinických příznaků pramení z obrovské heterogenity antifosfolipidových protilátek, které působí na hemostázu v různých místech, zejména na úrovni endotelu, systému proteinu C či v rámci primární hemostázy. Pro diagnózu antifosfolipidového syndromu je nutný současný výskyt alespoň jednoho klinického a jednoho laboratorního kritéria (Myiakis et al., J Thromb Haemost 2006). V laboratorní diagnostice lupus antikoagulans se využívá schopnosti antifosfolipidových protilátek in vitro prodloužovat testy závislé na fosfolipidech. Laboratorní diagnostika je problematická, především z důvodu, že neexistuje 100 % citlivý screeningový test, v případě prodloužení testů je nutné vyloučit jiné možné příčiny. Velkým problémem a snad nejdůležitějším krokem laboratorní diagnostiky lupus antikoagulans je správné zpracování vyšetřované plazmy. K vyšetření je potřeba použít prakticky bezdestičkovou plazmu, na jejíž kvalitě závisí výsledek celé diagnostiky. Při špatném zpracování vzorků často vzniká riziko falešně negativních výsledků. Cílem tohoto sdělení je seznámit posluchače s postupy a principy laboratorní diagnostiky lupus antikoagulans prováděnými v hematologické laboratoři II. interní kliniky, oddělení klinické hematologie FN a LF UK Hradec Králové.

KONFERENCE OŠETŘOVATELSTVÍ A ZDRAVOTNÍCH LABORANTŮ - ZDRAVOTNÍ LABORANTI 2,

2425.

Sledování buněčného chimerismu po alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk

Lipert J., Navrátilová J., Katrincskáková B., Orviská M., Divoká M., Koláčková M., Novosadová A., Raida L., Indrák K. (Hemato-onkologická klinika FN a LF UP, Olomouc)

Sledování buněčného chimerismu po alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk Lipert Jiří, Navrátilová Jana, Katrincskáková Beáta, Orviská Monika, Divoká Martina, Koláčková Monika, Novosadová Alena, Raida Luděk, Indrák Karel Hemato-onkologická klinika FN a LF UP Olomouc Úvod: Alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk (alloHSCT) je léčebný přístup, který má pevné místo v léčbě maligních i nemaligních hematologických onemocnění. Pacienti se po alloHSCT stávají hematopoetickými chimérami nesoucími dárčkovskou DNA. Cílem molekulárních metod je odhalení podílu dárčkovské (zdravé) a vlastní (vesměs nádorové) krevetvorby u příjemce. Podle tohoto poměru i s ohledem na čas od transplantace je hodnocena úspěšnost transplantace a je rozhodováno o dalších léčebných postupech, které mají za cíl zvýšit podíl dárčkovského chimerismu v případě, že u nemocného stále přetrvává nádorová krevetvorba. Cíle: Naše sdělení si klade za cíl informovat o molekulárně genetickém přístupu, který na Hemato-onkologické klinice FN a LF UP v Olomouci využíváme pro detekci buněčného chimerismu u nemocných po alloHSCT. Metodika: V molekulárně genetické laboratoři sledujeme buněčný chimerismus pomocí jednokolové PCR s následnou detekcí fluorescenčně značených PCR produktů na kapilární elektroforéze. Celý přístup začíná před transplantací vyšetřením, jehož hlavním cílem je určit informativní STR lokusy nemocného i dárce. STR neboli mikrosatelity jsou krátké repetitivní úseky s délkou repetice 2-6 nukleotidů, které se v daném lokusu mnohonásobně opakují. Velkou výhodou mikrosatelitů je vysoká variabilita v rámci populace. V naší laboratoři využíváme panel 16 specifických STR lokusů, na základě jejichž polymorfismu jsme schopni rozlišit DNA pacienta a dárce. Pravidelné monitorování umožňuje sledovat stav štěpu u pacienta, dovoluje zachytit nárůst i pokles dárčkovské populace buněk a tím sledovat komplikace spojených s odmítnutím štěpu, relapsem nemoci či reakcí štěpu proti hostiteli (graft versus host disease). Na typických příkladech analýz nemocných s hematologickými malignitami ukážeme konkrétní výsledky tohoto důležitého vyšetření. Práce je podporována studentským grantem LF_UP_2013_004.

2291.

Porovnání dvou komerčních kitů na imunomagnetickou izolaci lymfocytárních subpopulací pro vyšetřování buněčného chimerismu

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

Alogenní transplantace hematopoetických buněk je efektivní léčebnou modalitou u hemato-onkologických pacientů. Jednou z důležitých laboratorních metod využívaných v potransplantační monitoraci je sledování buněčného chimerismu, který slouží ke stanovení poměrných zastoupení buněk dárce a příjemce. Metoda umožňuje odlišit kompletní chimerismus (přítomna jen krevetvorba dárce) a smíšený chimerismus (přítomna dárceva ale i původní recipientní krevetvorba). Pro sledování chimerismu se využívají různé molekulárně genetické metody, jako např. polymorfismus typu VNTR (variable number tandem repeats). Vyšetřování VNTR se provádí jak z plné kostní dřeně (KD) či periferní krve (PK), tak z jednotlivých leukocytárních subpopulací (CD3+ a CD19+ lymfocyty, CD15+ granulocyty). Subpopulace se připravují metodou imunomagnetické separace. Žádoucí buňky jsou označeny protilátkou konjugovanou s magnetickou nanočásticí a pomocí magnetu jsou odděleny ze vzorku KD či PK. Cílem této práce bylo porovnat dvě techniky izolace subpopulací pro účely vyšetření VNTR. Byly použity dva komerční kity – MACS® firmy Miltenyi a Dynabeads® firmy Life Technologies. Postupy imunomagnetické separace byly prováděny dle pokynů výrobců. V rámci porovnání metod byla pomocí hematologického analyzátoru a průtokové cytometrie sledována čistota selekce (zastoupení izolovaných buněk) a výtěžnost selekce (koncentrace lymfocytů). Dále byla ze všech vzorků izolována DNA a na přístroji NanoDrop změřena její koncentrace. Průměrná koncent-

race lymfocytů získaná z 1 ml vstupního materiálu dosahovala u kitu Dynabeads 0,09 x10⁶/μl, což byla hodnota řádově nižší oproti kitu MACS (průměrně 1,3 x10⁶/μl). Izolované buňky vykazovaly také výrazně nižší čistotu. Zastoupení cílové populace se u kitu Dynabeads pohybovalo okolo 50%, zatímco u postupu firmy Miltenyi okolo 90%. Naměřené koncentrace DNA se mezi oběmi metodami nelišily. Lze však předpokládat, že DNA izolovaná z populací vzniklých po separaci metodou Dynabeads byla pravděpodobně znečištěna DNA z ostatních buněk. Provedené porovnání dvou uvedených postupů imunomagnetických separací lymfocytárních subpopulací prokázalo výrazné rozdíly v kvalitě obou metod. Izolace využívající kit firmy Miltenyi dosahuje vyšší čistoty izolovaných subpopulací a tudíž je i kvalitnějším výchozím materiálem pro sledování potransplantačních chimérismů.

2304.

Mindray BC6800 pohledem zdravotní laborantky

Rolencová E., Lidmilová H., Tenorová D. (*HTO Svitavská nemocnice a.s., Svitavy*)

Vyšetření krevního obrazu je jedním ze základních pilířů práce hematologické laboratoře. Ve své prezentaci vám přiblížím práci úseku zpracování krevních obrazů a morfologie v naší nemocnici. Před více než rokem jsme byly postaveny před úkol zavést do provozu prototyp nového analyzátoru krevních obrazů. Chtěla bych se s vámi podělit o některé momenty, které nás při plnění tohoto nestandardního úkolu potkaly, a o výsledek naší práce.

2319.

Potransfuzní reakce jako podklad k bezpečnější hemoterapii

Andrýsková A., Häutlerová T., Holusková I., Trhlíková P. (*Transfuzní oddělení FN, Olomouc*)

Hemoterapie představuje léčbu transfuzními přípravky. I přes maximální snahu o bezpečnost hemoterapie přináší aplikace transfuzních přípravků určitá rizika. Mezi nejčastější rizika řadíme imunologické a infekční riziko a také případnou bakteriální kontaminaci přípravků. Mezi potransfuzní reakce (PR) řadíme všechny nežádoucí účinky související s aplikací transfuzního přípravku. Aby byla hemoterapie co nejbezpečnější je zaveden systém hemovigilance, což je soubor systematických postupů pro dohled nad transfuzními přípravky a surovinami z krve a jejích složek pro další výrobu. Naším cílem je tyto komplikace sledovat a vyhodnocovat. Předkládáme analýzu PR ve Fakultní nemocnici Olomouc za období 2010-2012. V roce 2010 bylo přešetřeno 27 PR z celkového počtu 21 776 vydaných T.U. Ve 4 případech se o PR nejednalo. V tomto roce jsme 1x uzavřeli PR na erytrocytární transfuzní přípravek (TP) jako hemolytickou. Nejčastější byla alergická PR a to ve 12 případech (8x na plazmu, 4x na erytrocytární TP). Druhou nejčastější byla v tomto roce febrilní nehemolytická potransfuzní reakce (FNHTR) a to v 10 případech (1x na plazmu, 8x na erytrocytární TP, 1x na trombocytární TP). V roce 2011 bylo přešetřeno 25 PR z celkového počtu 21 378 vydaných T.U. Nejčastější byla lehká alergická a to v 18 případech (11x na plazmu, 4x na erytrocytární TP, 3x na trombocytární TP). FNHTR byla 6x na erytrocytární TP. V jednom případě byla PR na trombocytární TP uzavřena jako neurčená (zimnice, třesavka). V roce 2012 bylo přešetřeno 20 PR z celkového počtu 21 572 vydaných T.U. Nejčastější byla FNHTR a to v 9 případech (8x na erytrocytární TP a 1x na plazmu), dále to byla alergická PR v 8 případech (3x na erytrocytární TP, 3x na plazmu a 2x na trombocytární TP). Ve 3 případech (na erytrocytární TP) se o PR nejednalo. I když počty potransfuzních reakcí vzhledem k množství vydaných TP nejsou vysoké, je nutné se potransfuzními reakcemi stále zabývat. V ČR chybí jednotný postup v případě výskytu nežádoucí reakce. Mělo by být vypracováno celostátní doporučení v postupu hlášení a přešetřování nežádoucích reakcí. Bylo by vhodné hlásit nejen závažné nežádoucí reakce, ale i reakce středně těžké a také pozdní reakce po transfuzi, na které se často zapomíná. Získané údaje a výstupy by mohly být podkladem k bezpečnější hemoterapii.

2343.

Verifikace laboratorních metod jako součást přípravy laboratoří na akreditaci dle normy ČSN EN ISO 15189:2007

Šrámková B., Závadná Z., Sláviková M., Vodičková M., Galuszková D. (*Transfuzní oddělení FN, Olomouc*)

Úvod: Verifikací se ověřují základní funkční charakteristiky laboratorní metody realizované v konkrétních podmínkách laboratoře na konkrétním analytickém měřicím systému. Při ověřování je posuzována shoda zjištěných výsledků. Verifikace laboratorních metod byla na Transfuzním oddělení FNOL provedena poprvé v roce 2011 v souvislosti s přípravou na akreditaci imunohematologických laboratoří dle normy ČSN EN ISO 15189:2007. Ověřeny byly automatizované metody na analyzátoru TECHNO TwinStation: krevní skupina, screening nepravidelných antierytrocytárních protilátek a test slučitelnosti. Metoda: Ověření ABO systému a RhD antigenu při aglutinační metodě na mikrotitračních plotnách: potvrzení správnosti bylo provedeno ze 33 vzorků se známou krevní skupinou v ABO systému a RhD antigen byl verifikován ze 20 vzorků se známým RhD antigenem. Pro potvrzení reprodukovatelnosti v ABO RhD bylo použito 6 vzorků (3x RhD pozitivní a 3x RhD negativní) opakovaných ve 2 různých dnech. Pro potvrzení v návaznosti (referenční vzorky) byly použity 3 vzorky v ABO systému, a 4 vzorky pro RhD antigen. Ověření screeningu nepravidelných antierytrocytárních protilátek metodou sloupcové aglutinace na kartách ID-Neutral/LISS bylo provedeno z 10 vzorků se známým výsledkem. Ve dvou různých dnech jsme v 6 vzorcích ověřili reprodukovatelnost, pro návaznost byly použity 3 referenční vzorky pozitivní a 3 negativní. Test slučitelnosti metodou sloupcové aglutinace na kartách ID-LISS byl ověřen u 15 sad (erytrocyty + plasma). Pro potvrzení reprodukovatelnosti byly použity 2 vzorky pozitivní a 1 negativní, opakovaně ve 2 různých dnech. Návaznost se neověřuje. Výsledky: U verifikovaných metod byla dosažena po vyhodnocení 100 % úspěšnost, taktéž v externí kontrole kvality. Závěr: Proces verifikace metod představuje ve spojení s akreditací dle normy ČSN EN ISO 15189 zkvalitnění úrovně poskytovaných služeb pro žadatele laboratorních vyšetření. Z ekonomického hlediska verifikace metod vede k nárůstu nákladů laboratoře a klade větší nároky na personál z hlediska edukace a přípravy. Problémem může být i zajištění potřebných vzorků k samotné verifikaci - dle množství a zastoupení, zejména u vzácně se vyskytujících variant krevních skupin v populaci (RhD weak III a RhD varianta VII).

2293.

Trendy v transplantácii krvotvorných buniek v SR

Mistrík M., Horáková J., Hudeček J., Lakota J., Markuljak I., Palašthy S., Štecová N.
(*Klinika hematol. a transf. LF UK a UN, Bratislava – SK; TC DFNSP, Bratislava – SK; KHaT MUN a JLF UK, Martin – SK; NOU, Bratislava – SK; HO FNSP F.D.R., Bánská Bystrica – SK; HO FNSP J.A.Reimana, Prešov – SK; KH a OH UN, Košice – SK*)

Úvod: Transplantácia krvotvorných kmeňových buniek sa na Slovensku začala robiť od roku 1989 v období už dobre etablovanej a medzinárodne štandardizovanej terapeutickú metódy. Postupne pribúdali jednotlivé transplantáčne pracoviská, ktorých zástupcovia v roku 1994 dospeli k rozhodnutiu spoločne evidovať ročné počty transplantovaných chorých na Slovensku podľa typu transplantácie krvotvorných buniek (TKB). Metódy: V rokoch 1994 - 1997 sa evidoval ročný počet transplantovaných pacientov podľa typu transplantácie. Od roku 1998 sa používajú na zbieranie základných informácií o transplantáčnej aktivite na jednotlivých pracoviskách v SR údaje z aktuálnej verzie štandardného formuláru Európskej skupiny pre transplantáciu krvotvorných buniek (EBMT). Výsledky: Doteraz (1989 – 2013) bolo v SR transplantovaných spolu 2654 pacientov, z toho v rokoch 1998 až 2012 sa uskutočnilo 2342 TKB (561 alogénnych a 1781 autológnych TKB). Zdrojom štepov pre alogénne TKB bola prevážne periférna krv (438 x), 118 x kostná dreň a 5 x pupočníková krv. Pri autoTKB sa dominantne použili krvotvorné bunky z periférnej krvi (1759x) a zriedkavo z kostnej drene (17x), 5x spolu z oboch zdrojov. Neuskutočnila sa žiadna transplantácia autológnej pupočníkovej krvi. Spomedzi 2342 chorých lymfóm malo 806 (autoTKB 752; aloTKB 54), mnohopočetný myelóm 644 (639; 5), akútnu leukémiu 507 (171; 336), solídny nádor 207 (191; 16), chronickú myelocytovú leukémiu 93 (23; 70), aplastickú anémiu 50 (0; 50) a vzácne indikácie pre TKB 35 pacientov (5; 30). V roku 2012 ročný počet alogénnych TKB od nepríbuzného darcu (36) prekročil počet TKB od súrodenca (31), a urobilo sa viac autotransplantácií pre mnohopočetný myelóm (71) ako pre lymfoproliferatívne choroby (64). Záver: 15 ročné podrobnejšie sledovanie poskytuje informácie o vývoji a stave transplantáčného programu krvotvorných buniek v SR. Odráža rozhodovanie lekárov, transplantáčnych tímov a prístup riadiacich pracovníkov zdravotníckych zariadení a zdravotných poisťovní. Hlavné zmeny sú v type darcov a indikáciách TKB, čo koreluje s trendom v zahraničí.

2303.

Alogenní transplantace krvetvorných buněk po redukováné přípravě fludarabinem a melfalanem u AML mimo kompletní remisi - 10 leté zkušenosti jednoho centra

Karas M., Steinerová K., Svoboda T., Lysák D., Vokurka S., Vozobulová V., Schützová M., Jindra P. (*Hematologicko-onkologické dělení FN, Plzeň*)

Background: according to published data reduced-intensity transplantation (RIT) in patients (pts) with AML beyond complete remission (CR) is associated with lower progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) due to high risk of relapse. But elderly pts or pts with comorbidities can rarely benefit from myeloablative conditioning due to high risk of transplant-related mortality (TRM). To evaluate the potential role of RIT for pts with AML beyond CR we retrospectively analysed the outcome of such pts undergoing RIT in our centre in last 10 years. Patients and methods: since 2002 39 pts with median of age 58 years (range, 22-66 years) with AML beyond CR underwent RIT (19 pts were in the 1st or 2nd untreated relaps, 9 pts had chemotherapy-resistant disease, 11 pts had untreated secondary AML following an antecedent hematologic disorder). All pts had more than 5% blasts in the bone marrow (BM) with the median of BM blast 20% (range, 6-75%), 28% of pts had blasts in peripheral blood and 5% of pts had extramedullary manifestation of AML. Donors were in 33% HLA identical related, 58% HLA matched unrelated and 9% HLA mismatched unrelated. The source of stem cells was peripheral blood with the median of infused CD 34+ cells $6,3 \times 10^6$ /kg (range, $1,8-13,8 \times 10^6$ /kg). The conditioning regimen consisted of fludarabine (30 mg/m² for 4 days) and melphalan (140mg/m² for 1 day). CsA and methotrexate (10mg/m² at day +1, +3, +6) were used as GVHD prophylaxis. After day +30 in pts without GVHD, CsA was tapered over a pe-

riod of 4 weeks. Results: all pts except one patient engrafted and achieved CR at day +30. Among 38 evaluable pts 19 (50%) of them developed acute GVHD (18% grade III-IV). Among 34 evaluable pts 19 (56%) of them developed chronic GVHD (26% extensive). With median follow-up 52 months (range, 12-126 months) 15 pts (38%) are alive (13 pts in continuing CR), 12 pts (31%) relapsed and 10 of them died. 2 relapsed pts achieved subsequent CR lasting 28 and 68 months. 14 pts (36%) died due to TRM, 5 (13%) of them till day +100. The probabilities of 5-years PFS and OS are 35% and 40%. Conclusion: despite smaller number of evaluated pts and retrospective type of analysis our data suggest that fludarabine and melphalan conditioning shows excellent early disease control and in association with early withdrawal of immunosuppression can achieve continuing long-term CR with acceptable TRM and GVHD incidence in pts with AML beyond CR not eligible for myeloablative conditioning.

2383.

Alogenní transplantace krvetvorných buněk po přípravném režimu Flu+Mel (+/-TG) u nemocných s AML a MDS.

Raida L., Rusiňáková Z., Faber E., Indrák K. (*Hemato-onkologická klinika FN, Olomouc*)

Úvod: Kombinace fludarabinu (Flu - 150 mg/m²), melfalanu (Mel - 140 mg/m²) a event. thymoglobulinu (TG - 6 mg/m²) představuje jednu z alternativ přípravných režimů s redukovanou intenzitou (RIC) aplikovaných u nemocných podstupujících alogenní transplantaci krvetvorných buněk (SCT). Nezdopovězenou otázkou zůstává, zda může být tento přístup dostatečně efektivní u myeloproliferativních onemocnění. Soubor nemocných a metody: 18 nemocných s věkovým mediánem 53 (24–61) let transplantováno po přípravném režimu Flu+Mel, u 12 (67%) doplněném o TG. 13 (72%) pacientů podstoupilo SCT pro AML, 5 (28%) pro MDS. Bezprostředně před SCT bylo pouze 8 nemocných (44%) v kompletní remisi (CR) choroby. V 9 případech (50%) byl dárce krvetvorných buněk HLA-identický sourozenec, 6 nemocných (33%) bylo transplantováno od HLA-identického a 3 (17%) od HLA-inkompatibilního (1 neshoda) nepřibuzného dárce. Zdrojem krvetvorných buněk byla 17x (94%) periferní krev a 1x (6%) kostní dřev. Jako profylaxe GvHD byl u 15 nemocných (83%) aplikován pouze cyklosporin (CSP) a u 3 pacientů (17%) transplantovaných od HLA-inkompatibilního dárce jeho kombinace mykofenolát mofetilem (MMF). Medián potransplantačního sledování souboru byl 14 (2 - 49) měsíců. Výsledky: Přijetí šlepu dosáhlo všech 18 nemocných, s mediánem vzestupu neutrofilních granulocytů $\geq 0,5 \times 10^9$ /l 14 (9 - 24) a trombocytů $\geq 20 \times 10^9$ /l 12 (10–48) dní. V den +30 po SCT byl 100% dárce chimérismus potvrzen u 17 pacientů (94%). K rozvoji akutní GvHD stupně II-IV došlo v 8 případech (44%). Chronická GvHD byla zaznamenána u 6 z 15 (40%) hodnotitelných pacientů. U 17 nemocných (94%) byla po transplantaci potvrzena CR choroby, v jednom případě (6%) došlo k její progresi. Relaps onemocnění byl diagnostikován u 4 nemocných (24%). Úmrtí v remisi onemocnění (NRM) bylo zaznamenáno v jediném případě (6%). Relaps a progresi základního onemocnění byly příčinou úmrtí u 4 pacientů (22%). Pravděpodobnost tříletého přežití nemocných je při uvedené délce sledování 70%. Závěr: Režim Flu+Mel+/-TG může být alternativou pro nemocné s rizikovými maligními myeloproliferacemi, u nichž pro vyšší věk nebo komorbiditu nelze použít standardní transplantační přístupy. Podpořeno grantem IGA UP LF-2013-004

2492.

Retrospektivní analýza některých prognostických faktorů u 1518 AML diagnostikovaných a léčených v posledních 17 letech ve 3 centrech intenzivní hemato-onkologické péče v ČR.

Indrák K., Voglová J., Jindra P., Mužík J., Szotkowski T., Žák P., Karas M., Jarošová M., Katrincská B., Sičová K., Dušek V. (*HOK FN, Olomouc; IV. Interní klinika hematologická FN a LF UK, Hradec Králové; Oddělení Hemato-onkologie FN, Plzeň; Institut biostatistiky a analýz MU, Brno*)

Akutní myeloidní leukémie (AML) stále patří k prognosticky nepříznivým formám leukémie. Na rozdíl od chronických leukemií a dětských akutních leukemií (AL) jsme pro nemocné s AL dospělého věku, s výjimkou promyelocytární leukémie (PML), dosud nenašli léčbu, která by byla obecně účinná a efektivní, především ve vyšším věku, kde je však incidence tohoto onemocnění nejvyšší. Proto se snažíme identifikovat významné prognostické faktory a pomoci nich rozhodovat o léčebných přístupech „šitých na míru“ nemocného. K objektivnímu posouzení prognózy je nezbytná analýza dostatečně robustního souboru prognostických dat, opírající se o retrospektivní data z registru ne-

mocných. Zde předkládáme analýzu výsledků některých prognostických faktorů u 1518 nemocných s AML diagnostikovaných a léčených ve 3 centrech intenzivní hematologické péče v ČR v letech 1996–2011. Průměrná doba sledování celého souboru byla 67 měsíců s mediánem 58 měsíců. Poměr mužů a žen byl vyrovnaný. Průměrný věk nemocných při diagnóze byl 58 roků, medián 61 let (hranice 18–89 roků). 543 (35,8 %) nemocných bylo mladších 55 let a 975 nemocných (64,2 %) mělo 55 a více roků. 978 nemocných (64,4 %) mělo de-novo AML, 268 (17,7 %) sekundární AML a u 272 nemocných (17,9 %) nebylo původ leukemie udán. S kurativním záměrem bylo léčeno 1092 nemocných (71,9 %), z nich 304 (27,8 %) podstoupilo i alogenní transplantaci krvetvorných buněk. Cytoredukční či podpůrnou péčí bylo léčeno 426 nemocných (28,1%). Po indukční léčbě dosáhlo kompletní hematologické remise (KR) 747 (68,4 %) nemocných léčených s kurativním záměrem a procento dosažených KR bylo signifikantně vyšší u nemocných s de-novo AML (73,5 % vs. 40,2 % u sekundární AML) a u nemocných mladších 55 let (82,0 % vs. 56,5 % u starších než 55 let). Kurativně léčení nemocní měli medián přežívání 14,6 měsíců (< 55 let 29,5 měsíců a ≥55 let 9,2 měsíců). Nemocní, kteří byli kvůli věku či vysoké komorbiditě léčení jen cytoredukční a podpůrnou léčbou měli medián přežití jen 1,4 měsíce. V době analýzy (31. 12. 2012) žilo 440 nemocných (29 %). Podrobnější hodnocení prognostických dat včetně cytogenetiky a molekulárně genetických nálezů bude součástí sdělení. Podpořeno grantem IGA UP LF-2013-004

2379.

Léčba dospělých pacientů s akutní lymfoblastickou leukemií protokolem GMALL 07/2003 – zkušenosti jednoho pracoviště

Horáček J. M., Cermanová M., Zavřelová A., Lánská M., Jebavý L., Žák P. (*Katedra válečného vnitřního lékařství, Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, Hradec Králové; 4. interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové*)

Cíl: Prezentace zkušeností s léčbou akutní lymfoblastické leukemie (ALL) dospělých protokolem GMALL 07/2003 ve Fakultní nemocnici Hradec Králové. Soubor a metodika: Od roku 2006 do února 2013 jsme na našem pracovišti léčili tímto protokolem celkem 28 pacientů s ALL, medián věku 42 let (18 – 63 let), 19 mužů a 9 žen. Dle imunofenotypu bylo 18 (64 %) B-ALL a 10 (36 %) T-ALL. Dle rizika GMALL bylo 5 (18 %) pacientů standardního rizika (SR), 13 (46 %) pacientů vysokého rizika (HR) a 10 (36 %) pacientů velmi vysokého rizika (VHR), tj. BCR/ABL+. Hodnotili jsme dosažení kompletní remise (CR), výskyt relapsu a stav pacientů na konci sledovaného období. Byl sledován výskyt nežádoucích účinků terapie a příčiny úmrtí. Výsledky: Indukční léčbou dle protokolu GMALL bylo dosaženo CR u 23 (82 %) pacientů (do 26. dne indukce u 21 pacientů). U 4 (14 %) pacientů byla pro nedostatečný efekt již v průběhu 1. fáze indukce GMALL intenzifikována léčba (chemoterapie FIAG-Ida nebo HD-MTX/Ara-C) s následným dosažením CR. 20 (71 %) pacientů (HR a VHR) podstoupilo alogenní transplantaci krvetvorných buněk (nepříbuzný dárce u 80 %, ablativní přípravný režim u 75 %), u 1 VHR pacienta bez vhodného dárce byla provedena autologní transplantace krvetvorných buněk. K relapsu onemocnění došlo celkem u 9 (32 %) pacientů, z toho u 5 pacientů po alogenní transplantaci. Na konci období sledování s mediánem 21 měsíců (rozmezí 0,6 – 78 měsíců) žije 19 (68 %) pacientů v CR (14 v CR1, 3 v CR2, 2 v CR3). K úmrtí došlo u 9 (32 %) pacientů (6 VHR, 3 HR). Příčinou úmrtí byla v 6 případech toxicita léčby a u 3 pacientů relaps či progresse onemocnění. Mortalita v souvislosti s alogenní transplantací (TRM) byla 25 %. Nejčastějšími nežádoucími účinky léčby byly infekční komplikace, mukositida a koagulopatie po asparagináze. Závěr: Naše zkušenosti s protokolem GMALL 07/2003 jsou pozitivní, zejména u pacientů standardního rizika. Léčba je proveditelná, dosavadní výsledky jsou dobré a toxicita přijatelná. Podle našich zkušeností je u pacientů s nedostatečným efektem 1. fáze indukce GMALL indikována časná intenzifikace léčby.

2314.

Výsledky alogénních transplantací krvetvorných buněk pacientů s ALL na HOK FN Olomouc

Rusiňáková Z., Raida L., Faber E., Indrák K. (*Hemato-onkologická klinika FN, Olomouc*)

Úvod: Vzhledem k neuspokojivým výsledkům konvenční léčby ALL představuje alogénní transplantace krvetvorných buněk (aloTKB) pro velkou skupinu pacientů jediný potenciálně kurabilný postup. Naším cílem je retrospektivně zhodnotení výsledků aloTKB u pacientů s ALL léčených v na-

šom centre. Metóda: V letech 2000–2012 29 pacientů (18 mužů a 11 žen) s mediánem věku 32 (19–60) roků podstoupilo aloTKB. Před transplantací bylo 24 pacientů (83%) v kompletní remisi (CR). 18 pacientů (62%) podstoupilo transplantaci po standardní myeloablativní přípravě, 11 pacientů (38%) po režimech s redukcí toxicity. Jako zdroj krvetvorných buněk byla 2x použita kostní dřeň a 27x periferní kmeňové bunky, v 18 případech (62%) od nepříbuzného dárce (3x s jednou HLA nezhodnou a 3x s dvěma nezhodami) a v 11 případech (38%) od zhodného příbuzného dárce. Výsledky: U všech hodnotených pacientů došlo k přijetí štepů. Vzrost neutrofilů nad $0,5 \times 10^9/l$ byl dosažen v mediánu 14 dní (11–22 dní), vzrost trombocytů nad $20 \times 10^9/l$ v mediánu 11 (8–21) dní. Akutní GvHD II–IVst. byla diagnostikována u 9 (33%) pacientů. TRM do dne +100 byla 14%. Extenzivní chronická GvHD se vyskytla u 7 z 24 hodnotených pacientů (29%). Celková TRM byla 38%. 26 pacientů (96%) dosáhlo CR po TKB, u 1 pacienta choroba progredovala a u 2 pacientů nebola léčba odpověď na skoré úmrtí hodnocená. U 6 pacientů (23%) došlo k relapsu choroby, z nich 2 podstoupili 2. TKB. S mediánem sledování 15 měsíců žije 15 pacientů (52%), všichni v remisi choroby. Pravděpodobnost 3-ročného přežití (OS) je 55%. Pravděpodobnost 3-ročného přežití bez známek choroby (DFS) je 53%. Závěr: Alogénní TKB u pacientů s ALL je spojená s dobrou efektivitou léčby. Při relativně nízkém zastúpení relapsu/progresie choroby (26%), navíc u většiny případů priaznivo ovplyvnených ďalšou imunomodulačnou liečbou, zostávajú hlavným negatívnym faktorom zhoršujúcim prežitie chorých po transplantácii komplikácie.

CLL 1

2420.

Role transplantace v léčbě CLLKaras M., Jindra P. (*Hematologicko-onkologické oddělení FN, Plzeň*)

2466.

Sekundární nádory u nemocných s CLLObrtlíková P. (*I. interní klinika VFN a 1. LFUK, Praha*)

2375.

Imunocytologický profil souboru 217 případů B-CLL

Starostka D., Mikula P., Adamová D., Janek D., Vaculová J., Farbiaková V., Rytíková N., Novosadová L. (*Oddělení klinické hematologie, Nemocnice s poliklinikou, Havířov; Hematologicko-transfúzní oddělení, Slezská nemocnice, Opava; Hematologicko-transfúzní oddělení, Nemocnice s poliklinikou, Karviná; Hematologicko-transfúzní oddělení, Nemocnice, Frýdek-Místek; Hematologicko-transfúzní oddělení, Nemocnice, Třinec; Centrální laboratoř, Hematologická ambulance, Sdružené zdravotnické zařízení, Krnov*)

Charakteristika souboru: 217 případů nově diagnostikovaných nebo dispenzarizovaných B-CLL (muži 130, ženy 87), vzorky periferní krve (187), kostní dřeně (27), lymfatické uzliny (1), pleurálního punktátu (1) a podkožní excize (1). Metodika vyšetření: Cytologické hodnocení v nátěrech periferní krve, kostní dřeně, imrintu lymfatické uzliny a podkožní excize a v cytospinu pleurálního punktátu po klasickém panoptickém barvení se stanovením prolymfocytové komponenty a poměrného zastoupení atypických lymfocytů. Flowcytometrická imunofenotypizace (přístroj FACS Canto II výrobce Becton-Dickinson) po přípravných procedurách (event. mechanická dezintegrace, filtrace, korekce celularity) a automatické lyze, promytí a fixaci (zařízení LyseWash Assistant výrobce Becton-Dickinson). Multiparametrická analýza povrchové exprese diagnostických markerů (klinický software FACS Diva, pozitivita a intenzita exprese) na B-lymfocytech ve zkumavkách: CD19-PerCP-Cy5.5+ kappa-FITC+lambda-PE, CD19-PerCP-Cy5.5+CD23-PE+FM7-FITC/CD79b-APC/CD5-PE-Cy7, CD20-PerCP-Cy5.5+CD22-PE+CD103-FITC/CD25-PE-Cy7/CD10-APC (protilátky výrobce Becton-Dickinson). Výsledky (výskyt v %): Klasická B-CLL 75%, B-CLL/PL 10%, pleomorfní B-CLL 15%. CD5+ 99%, CD19+ 100% (slabá exprese 100%), CD20+ 100% (silná exprese 10%), CD22+ 84% (silná exprese 7%), CD23+ 84%, CD25+ 59%, CD79b+ 34% (silná exprese 2%), FM7+ 3% (slabá exprese 3%), CD10+ 0%, CD103+ 0.5%, kappa+ 50% (slabá exprese 90%), lambda+ 44% (slabá exprese 63%), kappa-lambda- 6%. CLL skóre dle Matutes: skóre 5 – 78%, skóre 4 – 19%, skóre 3–2%, skóre 2–1%. Exprese uvedených markerů byla porovnána se soubory 20 jiných CD5+ B-lymfoproliferací a 83 jiných CD5- B-lymfoproliferací. Závěr: Stanovení imunocytologického profilu je základem diagnostiky B-CLL. Použitý imunofenotypizační panel je vhodný pro diagnostiku drtivé většiny případů B-CLL. Klíčovými diferenciálně diagnostickými prvky při odlišení B-CLL od jiných B-lymfoproliferací jsou: cytomorfolgie, povrchová exprese (pozitivita/negativita) CD5, CD23, CD79b, FM7; intenzita povrchové exprese CD19, CD20, CD22, CD79b, FM7 a lehkých řetězců Ig. Grant IGA UP LF-2013-004

2364.

T-lymfocyty nemocných s chronickou lymfocytární leukémií vykazují vyšší expresi znaků funkční inaktivity ve srovnání se zdravými probandyNovák M., Procházková V., Pikalová Z., Papajík T. (*HOK FN/LF, Olomouc*)

Úvod: Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je asociovaná s defektem T-lymfocytárních funkcí, které souvisejí se selháním protinádorové imunity pacienta a ke zvýšené vnímavosti vůči infekcím. Dlouhodobá stimulace ligandy nádorových buněk, v tomto případě interakce receptoru PD-1 (Programmed Death-1) s ligandem PD-L, způsobuje chronickou aktivaci signální dráhy PD-1L/2L, což inhibuje fyziologickou aktivitu CD8+ (snížení cytotoxicity) i CD4+ (snížení produkce cytokinů). Výsledkem je stav označovaný jako „vyčerpání“ efektorových T-lymfocytů. Cíl: Pilotní stanovení exprese markeru „funkční inaktivity“ (PD-1) na subpopulacích T-lymfocytů nemocných s CLL a po-

rovnání se zdravými probandy. Metoda: Analýza imunokompetentních subpopulací z periferní krve byla provedena metodou multiparametrické průtokové cytometrie na přístroji FACS Calibur (BD) za využití analytického software Cell Quest Pro (BD), pomocí protilátek: anti CD3 FITC, anti PD-1 PE (CD279), anti CD4 APC, anti CD8 Per CP. Populace PD-1 (CD279) byly gatovány z CD3+ / CD4+ a CD3+/CD8+ T-lymfocytů s akvizicí minimálně 10 000 cílových buněk v gat. Výsledky: Bylo vyšetřeno 12 zdravých probandů (dárců krve) – 6 mužů a 6 žen, a 14 pacientů s CLL (3 ženy, 11 mužů, medián věku při vyšetření 66 let, 9 vyšetřeno před zahájením terapie, 4 v relapsu, 1 v CR). Absolutní počet CD4+/PD-1+ buněk z gat CD3+/CD4+ lymfocytů byl dvojnásobně vyšší u CLL (0,63) než u dárců (0,35), $p=0,026$, stejně tak bylo vyšší i procentuální zastoupení: CLL 17,90 %, dárce 12,93 % ($p=0,050$). Absolutní počet CD8+/PD-1+ buněk z gat CD3+/CD8+ lymfocytů byl dvojnásobný u CLL (0,453) než u dárců (0,227), $p=0,064$, procentuální zastoupení CD8+/PD-1+ buněk bylo rovněž vyšší u CLL (11,79 % versus 8,83 %), ale rozdíl nedosáhl statistické významnosti ($p=0,28$). Závěr: Analýza pilotních dat prokázala významně vyšší expresi receptoru PD-1 jak na CD3+/CD4+ tak na CD3+/CD8+ T-lymfocytech pacientů s CLL, což je v souladu s hypotézou inhibice efektorových T-lymfocytů cestou dráhy PD-1. V další fázi výzkumu hodláme rozšířit kohortu probandů a podrobně ji rozdělit dle fáze onemocnění, prognostických faktorů a podobně. Podpořeno grantem LF-2013-004.

2356.

Expres mRNA pro angiopoetin-2, endoglin a fibroblastový růstový faktor-2 u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií

Vrbáček F., Nekvindová J., Jiruchová Z., Šimkovič M., Řezáčová V., Malá M., Šarounová K., Žák P., Smolej L. (*IV. interní hematologická klinika, FN a UK v Praze, LF, Hradec Králové; Ústav klinické biochemie a diagnostiky, FN, Hradec Králové; Ústav klinické imunologie a alergologie, FN, Hradec Králové*)

Angiogeneze hraje významnou roli v rozvoji chronické lymfocytární leukémie (CLL). Přestože byla u pacientů s touto chorobou prokázána zvýšená koncentrace cirkulujících angiogenních cytokinů, jsou informace ohledně jejich exprese maligními lymfocyty stále omezené. V naší studii jsme proto změřili expresi mRNA genů pro angiopoetin-2 (Ang-2), endoglin (CD105) a fibroblastový růstový faktor-2 (FGF-2) v separovaných CD19+ buňkách 70 neléčených pacientů s CLL (45 mužů a 25 žen, medián věku 63 let, nízké/střední/vysoké riziko dle Raije ve 24/47/29 procentech) a porovnali ji s prognostickými faktory a klinickým průběhem onemocnění. Exprese Ang-2 byla statisticky významně vyšší u pacientů s nemutovaným těžkým řetězcem imunoglobulinu (IgVH) ($n=55$, $p=0,003$). mRNA pro endoglin byl významně více exprimována u pacientů s nemutovaným IgVH ($n=55$, $p<0,001$), vysokou expresí CD38 ($n=66$, $p=0,022$) a ZAP-70 ($n=66$, $p=0,010$), stádiem dle Raije I-IV ($n=70$, $p<0,001$), progresí onemocnění ($n=70$, $p=0,001$) a kratší dobou do zahájení léčby ($n=70$; $p<0,001$). Závislost mezi expresí FGF-2 a sledovanými znaky nebyla prokázána. Naše výsledky ukazují, že exprese mRNA pro CD105 a Ang-2 je zvýšená u pacientů s nepříznivou prognózou CLL a může tedy hrát roli v biologii a progresi tohoto onemocnění. Exprese mRNA pro FGF-2 se u pacientů s různou prognózou či průběhem CLL významně nelišila. Tato práce byla podpořena grantem IGA NT/13412 Ministerstva zdravotnictví České republiky, projektem koncepčního rozvoje výzkumné organizace 00179906 Ministerstva zdravotnictví České republiky a programem PRVOUK P37/01 Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze.

CLL 2

2486.

Imunitní komplikace u nemocných s CLL

Kozák T. (FNKV, Praha)

2418.

Aktualizovaná doporučení pro diagnostiku a léčbu chronické lymfocytární leukémie České CLL skupiny

Smolej L., Doubek M., Špaček M., Obrtlíková P., Lysák D., Urbanová R., Pospíšilová Š., Jarošová M., Schwarz J., Peková S., Kozák T. (IV. interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové; Interní hematologická a onkologická klinika, Fakultní nemocnice, Brno; I. interní klinika, Všeobecná fakultní nemocnice, Praha; Hematologicko-onkologické oddělení, Fakultní nemocnice, Plzeň; Hemato-onkologická klinika, Fakultní nemocnice, Olomouc; Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha; Laboratoře CHAMBON, a.s., Praha; Interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, Praha)

2348.

Účinnost a bezpečnost rituximabu v kombinaci s vysokodávkovaným dexametazonem (R-dex) u pacientů s relabující/refrakterní chronickou lymfocytární leukémií

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

Úvod: Pacienti s refrakterní chronickou lymfocytární leukémií (CLL) mají velmi nepříznivou prognózu, kdy celkové přežití často nedosahuje ani 12 měsíců. Kombinace monoklonální anti-CD20 protilátky rituximabu s vysokodávkovaným metylprednisolonem je účinná v léčbě relabující/refrakterní CLL, avšak limitujícím faktorem je vysoký výskyt závažné infekční toxicity. Nedávno publikovaná pilotní data naznačují, že vysokodávkovaný dexametazon by mohl mít srovnatelnou účinnost a vyšší bezpečnost. Cíle projektu: Posouzení účinnosti a bezpečnosti rituximabu v kombinaci s vysokodávkovaným dexametazonem (R-dex) u nemocných s relabující/refrakterní chronickou lymfocytární leukémií. Nemocní a metody: Retrospektivní analýza byla provedena u 52 pacientů léčených na IV. interní hematologické klinice, Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové od září 2008 do října 2012 (38 mužů [73 %], věkový medián 66 let [rozmezí 37-86], stádium dle Raije III/IV 61 %). Medián počtu předchozích léčebných linií byl 2 (rozmezí 1-6). Režim R-dex byl podáván ve složení: rituximab, 500 mg/m² i.v. den 1 (375 mg/m² v 1. cyklu), dexametazon 40 mg p.o. ve dnech 1-4 a 10-13, cykly byly opakovány každé 3 týdny do maximálního počtu 8 cyklů. Všem nemocným byla podávána protinfekční profylaxe ve složení sulfametoxazol/trimetoprim a aciklovir. Medián počtu cyklů R-dex byl 5 (rozmezí 1-8). Režim R-dex byl použit k debulkingu před alogenní transplantací krevetvorných buněk u 7 (13 %) pacientů. Výsledky: Celková léčebná odpověď (ORR)/kompletní remise (CR) byla dosažena u 70/4 % nemocných. Závažné infekční komplikace (stupeň III/IV dle CTCAE) se vyskytly u 29 % pacientů. U 19 % nemocných došlo k rozvoji steroidního diabetu, který si vyžádal přechodnou léčbu inzulinem. Při mediánu sledování 12,1 měsíců byl medián období do progresu 6,7 měsíců a celkové přežití 19 měsíců. Medián období do další léčby byl 20,3 měsíců. Závěry: Naše data ukazují, že R-Dex je efektivní léčba pro nemocné s relabující/refrakterní CLL. Limitujícím faktorem je relativně častý výskyt závažné infekční toxicity přes kombinované protinfekční zajištění. Dlouhodobá kontrola CLL je dosažena pouze u malé části pacientů. U mladších nemocných lze režim R-dex využít jako součást přípravy před alogenní transplantací krevetvorných buněk. Budou prezentována aktualizovaná data.

2318.

Nízkodávkovaný FCR v léčbě nemocných starších či komorbidních nemocných s chronickou lymfocytární leukémií/lymfomem z malých lymfocytů (CLL/SLL): Aktualizované výsledky projektu Q-lite České CLL skupiny.

Smolej L., Brychtová Y., Cmunt E., Doubek M., Špaček M., Belada D., Motyčková M., Zygulová I., Adamová D., Procházková V., Klásková K., Kozák T. (IV. interní hematologická klinika, FN a LF UK,

Hradec Králové; Interní hematologická a onkologická klinika, FN, Brno; I. interní klinika, Všeobecná fakultní nemocnice, Praha; Hematologicko-transfúzní oddělení, Slezská nemocnice, Opava; Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc; Interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, Praha)

Úvod: Kombinace fludarabinu, cyklofosfamidu a rituximabu (FCR) je nyní považována za léčbu volby v 1. linii i relapsu chronické lymfocytární leukémie (CLL), avšak pouze u nemocných v dobrém celkovém stavu bez závažných přidružených onemocnění. Cílem projektu Q-lite České CLL skupiny (ČSCLL) bylo hodnocení účinnosti a bezpečnosti nízkodávkovaného režimu FCR u nemocných s CLL/SLL ve vyšším věku a/nebo se závažnými přidruženými onemocněními. Nemocní a metodiky: Od března 2009 do července 2012 bylo na 17 pracovištích spolupracujících v rámci ČSCLL do projektu Q-lite zařazeno celkem 207 nemocných s aktivní chorobou vyžadující léčbu dle NCI-WG kritérií (CLL, n=196, SLL, n=11); data týkající se účinnosti a bezpečnosti jsou aktuálně dostupná u 199 nemocných, základní charakteristiky jsou uvedeny v tabulce 1. V porovnání se standardním režimem FCR byly sníženy dávky fludarabinu na 50 % a cyklofosfamidu na 60 % (fludarabin 12 mg/m² i.v. nebo 20 mg/m² p.o. D1-3, cyklofosfamid 150 mg/m² i.v. nebo p.o. D1-3); dávka rituximabu byla obvyklá pro CLL (375 mg/m² D1, v 1. cyklu, 500 mg/m² od 2. cyklu). Léčba byla opakována po 4 týdnech; byla doporučena protinfekční profylaxe (sulfametoxazol/trimetoprim a aciklovir). Výsledky: Na základě intention-to-treat principu byla celková léčebná odpověď/kompletní remise (ORR/CR, včetně klinické CR [bez vyšetření kostní dřeně] a CR s nekompletní obnovou krevního obrazu) 79/37 % v 1. linii a 64/29 % u relapsu/refrakterní CLL. Těžká (CTCAE stupeň III/IV) neutropenie se vyskytla u 57 a 49 % nemocných, trombocytopenie a anémie byly méně časté. Závažné infekce se rozvinuly u 14 a 18 % nemocných. Nejčastějšími příčinami úmrtí byly progresse CLL a infekce. Při krátkém mediánu sledování (19 měsíců) je medián očekávaného období bez progresu (PFS) v 1. linii a relapsu/refrakterní choroby 20 a 15 měsíců. Očekávaný medián celkového přežití (OS) pro 1. linii nebyl dosažen (80 % ve 2 letech) a u relapsu/refrakterní CLL činí 31 měsíců. Závěr: Aktualizované výsledky projektu Q-lite ukazují, že léčba starších či komorbidních nemocných s CLL/SLL nízkodávkovaným protokolem FCR je účinná; hematologická i infekční toxicita jsou přijatelné a data týkající PFS i OS slibná, vyžadující však delší sledování.

2469.

Mutace genu ATM narušují aktivaci p53 dráhy po poškození DNA doxorubicinem u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií: využití pro funkční test

Navrkalová V., Zemanová J., Šebejová L., Kmínková J., Kubešová B., Doubek M., Brychtová Y., Mayer J., Pospíšilová Š., Trbušek M. (Středoevropský technologický institut (CEITEC) Brno; Fakultní nemocnice, Brno)

Defekty genu ATM představují významný prognostický faktor u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (CLL). Vzhledem ke klíčové roli proteinu ATM v odpovědi na poškození DNA mohou mít i potenciálně značný prediktivní význam. Vyčlenění pacientů s inaktivní ATM je však komplikované: (a) samotná heterozygotní delece 11q (11q-) nenarušuje funkci tohoto proteinu (b) inaktivace je zprostředkována bíalelickými defektem, tj. 11q-/mutace nebo mutace obou alel (c) mutační analýza je složitá kvůli extrémní velikosti genu a nejasnému dopadu většiny mutací. Cílem práce bylo zavést efektivní detekci ATM mutací včetně určení jejich funkčního dopadu. Byly použity následující metody: (a) funkčně neutrální resekvenční čip detekující 1-nt substituce (b) western blot (WB) pro stanovení hladiny proteinu ATM (c) funkční test pro predikci ATM mutací založený na sledování indukce genu p21 (Q-RT-PCR) po paralelním ošetření CLL buněk fludarabinem a doxorubicinem; v případě inaktivace ATM jsme předpokládali narušenou indukci po doxorubicinu, zatímco u TP53 defektů jsme očekávali narušení odpovědi na oba léky. Pomocí resekvenčního čipu (n=107 pacientů) bylo identifikováno a přímým sekvenováním potvrzeno 16 mutací u 13 pacientů, nicméně čip vykazuje 30% falešnou pozitivitu a 11% falešnou negativitu. Všichni pacienti s mutací měli jasné inaktivní protein ATM – dle funkčního testu a/nebo WB. Funkční testování u vzorků bez mutace pak indikovalo ATM dysfunkci u dalších 7 pacientů a v pěti případech byla mutace (nezachycená čipem) skutečně nalezena. Finální verifikace funkčního testu na nezávislé kohortě 33 pacientů odhalila další 4 pacienty s mutací a potvrdila jeho celkově vysokou senzitivitu (80%) i specifitu (97%). Celkově jsme identifikovali ATM mutaci u 16% (22/140) pacientů, vždy s jasným funkčním dopa-

dem na protein. Ztráta funkce ATM byla prokázána také skrze defektní odpověď příslušných vzorků na ionizující záření – byla jasně narušená indukce genů p21, PUMA a GADD45 a ATM protein vykazoval neschopnost autofosforylace (Ser1981) i fosforylace p53 (Ser15) vedoucí k jeho stabilizaci. Diskriminace mezi ATM a TP53 defekty se dle očekávání v našem testu rovněž prokázala. Navržený funkční test pro predikci ATM mutací vykazuje velmi dobrou efektivitu a je technicky přijatelný pro většinu laboratoří. Pacienti s mutovaným proteinem ATM by mohli mít zásadní problém při odpovědi na léčbu poškozující DNA. Práce byla podpořena granty SuPreMMe (CZ.1.07/2.3.00/20.0045) a MUNI/A/0723/2012.

PODPŮRNÁ PÉČE A AITP

2481.

Indikace antimykotik - teorie a praxe.

Haber J., Forstrová K., Čemusová B. (1. Interní klinika - klinika hematologie, VFN a 1. LF UK, Praha)

Podle současných doporučených postupů je empirická antimykotická terapie suspektního (možného) invazivního mykotického onemocnění (IFD) standardním léčebným postupem u neutropenických nemocných s hematologickou malignitou, u nichž přetrvává horečka i přes adekvátní léčbu širokospektrými antibiotiky. Empiricky zahajujeme léčbu u rizikového pacienta, u něhož nedochází k ústupu projevů infekce (horečka, klinický stav..) i přes kvalitní léčbu antibiotiky, a proto u něho mykotickou infekci (jen) předpokládáme. Empirický postup se tak řídí klinickým stavem pacienta (clinically driven) a v současné době je léčeno 50–70 % nemocných s horečkou, z nichž pouze 5–15 % má pravděpodobně invazivní mykózu, a tak je značné procento léčeno zbytečně („overtreated“). Jedním z možných způsobů jak zabránit „zbytečné léčbě“ je nahradit empirický přístup preemptivním. Preemptivně antimykotickou léčbu zahajujeme u predisponovaných nemocných, u nichž nejen klinické projevy, ale zejména nálezy laboratorních a zobrazovacích vyšetření vzbuzují naléhavé podezření na IFD. Jde o léčbu založenou na diagnostice (diagnostic driven), která využívá zejména CT, vyšetření komponent buněčné stěny hub (aspergilový antigen – galaktomannan, GM) ve vzorcích séra, z BAL, ev. likvoru a metody molekulární biologie. Léčbu v tomto případě zahajujeme při nepřímých (laboratorních) známkách „pravděpodobné“ mykotické infekce. Literární i naše zkušenosti ukazují, že preemptivní přístup není možný bez kvalitního a rychle dostupného diagnostického zázemí. Pokud pracoviště tyto podmínky nemá, pak je nutné zahájit léčbu suspektního mykotického onemocnění empiricky. Na našem pracovišti jsme zhodnotili indikační kritéria nasazení antimykotické terapie za období 2010–2012 a v souladu s literárními údaji byly empirické indikace v naprosté většině případů.

2443.

Monitorování hladin azolů u dětí v průběhu profylaxe invazivních mykóz

Král L., Chrenková V., Klapková E., Sedláček P., Starý J., Šrámková L. (Klinika dětské hematologie a onkologie UK 2.LF a FN Motol, Praha; Ústav lékařské mikrobiologie, UK 2.LF a FN Motol, Praha; Ústav klinické biochemie a patobiochemie, UK 2.LF a FN Motol, Praha)

Invazivní mykózy (IFI) jsou život ohrožující komplikací u hematologických pacientů. Azoly jsou antimykotika dostupná v perorální formě a proto vhodná pro dlouhodobou profylaxi pacientů v riziku IFI. Pomocí chromatografie (HPLC) lze stanovit koncentraci azolů v plazmě pacientů. Terapeutické hladiny jsou známy z farmakokinetických studií provedených na dospělých pacientech – 1–4 ug/ml pro vorikonazol a 1,25–2,5 ug/ml pro posakonazol. V období 06/2010-08/2011 jsme v našem centru vyšetřili hladiny azolů u 91 pacientů (542 vzorků). U 41 pacientů byla vyšetřena hladina vorikonazolu (225 vzorků) a u 63 posakonazolu (317 vzorků). Terapeutické hladiny vorikonazolu byly detekovány u 67%, suboptimální u 24% a toxické u 9% vzorků. Terapeutické hladiny vorikonazolu nebylo dosaženo u 8/41 pacientů (17,4%). Terapeutické hladiny posakonazolu byly detekovány u 55%, suboptimální u 28% a toxické u 17% vzorků. Terapeutické hladiny posakonazolu nebylo dosaženo u 17/63 pacientů (26,98%). Ve sledovaném období bylo v našem centru diagnostikováno 5 IFI – 1 aspergilóza, 3 mukormykózy a 1 kombinovaná IFI (Aspergillus+Rhizopus). Všechny mukormykózy a kombinovaná IFI byly prokázány, aspergilóza byla pravděpodobná dle CT nálezu na plicích. Pouze 1 pacient byl před diagnózou IFI profylakticky zajištěn azoly, ostatní pacienti nebyli k profylaktickému podávání indikováni. Terapeutických hladin azolů se nepodařilo dosáhnout u podstatné části pacientů, a to i přes opakovanou úpravu dávek. Výskyt IFI a přežití pacientů s IFI, na našem malém souboru pacientů, nekoreluje s hladinami azolů v plazmě. Podpořeno projektem (Ministerstva zdravotnictví) koncepčního rozvoje výzkumné organizace 00064203 (FN MOTOL).

2502.

Výskyt enterobakterií s produkcí širokospektrých beta-laktamáz v GIT pacientů s hemato-onkologickým onemocněním

Kolář M., Htoutou Sedláková M., Novosad J., Szotkowská R., Szotkowski T., Raida L., Indrák J. (Ústav mikrobiologie LF UP a FN, Olomouc; Hemato-onkologická klinika LF UP a FN, Olomouc)

Úvod: K významným tématům současné medicíny patří bakteriální infekce, jejichž frekvence i závažnost, vzhledem ke stoupajícímu počtu rezistentních bakterií, neustále narůstá. Mezi nejdůležitější mechanismy rezistence patří produkce širokospektrých beta-laktamáz, které jsou stále častěji dokumentovány nejen u bakteriálních patogenů, ale i u bakterií tvořících normální mikroflóru lidského těla. Cílem předložené studie bylo stanovení prevalence multirezistentních ESBL- a AmpC-pozitivních enterobakterií v gastrointestinálním traktu (GIT) pacientů s hemato-onkologickým onemocněním a jejich analýza. Materiál a metodika: V období 3 měsíců (1.11.2012–31.1.2013) byly z rektálních výtěrů pacientů, hospitalizovaných na Hemato-onkologické klinice Fakultní nemocnice Olomouc, izolovány pomocí vyhledávacích chromogenních půd enterobakterie s produkcí širokospektrých beta-laktamáz. Každý izolát byl identifikován standardními biochemickými testy a systémem MALDI-TOF. Produkce širokospektrých beta-laktamáz byla stanovena fenotypovými testy mDDST a mAmpC. Výsledky byly potvrzovány detekcí genů kódujících beta-laktamázy typu ESBL a AmpC. Od každého pacienta byl do souboru kmenů zařazen vždy jen jeden izolát. Výsledky: Ve sledovaném období bylo izolováno 18 enterobakterií od 71 pacientů. Nejčastěji se jednalo o kmeny *Klebsiella pneumoniae* (50%), *Citrobacter freundii* (22%) a *Escherichia coli* (17%). Prevalence nosičství ESBL- a AmpC-pozitivních enterobakterií v GIT pacientů s hemato-onkologickým onemocněním byla stanovena na 25%, přičemž v 72% se jednalo o ESBL a 28% enzymů bylo identifikováno jako AmpC typy. Závěr: Aktivní surveillance bakteriální rezistence je základním předpokladem racionální a adekvátní antibiotické terapie. U hemato-onkologicky nemocných je velmi vhodné nejen pravidelné sledování prevalence patogenních multirezistentních bakterií, ale i potencionálně-patogenních kmenů patřících do normální mikroflóry. Na základě výsledků studie bylo prokázáno nosičství uvedených kmenů v GIT traktu vyšetřovaných pacientů a tuto skutečnost je nutné vzít v úvahu v případné antibiotické léčbě. Podpořeno grantem UP č. LF_2013_012.

2398.

Autoimunitná trombocytopenia (AITP) a splenektómia – imunologické aspekty

Lipšic T., Železníková T. (*Hematologické a transfúziologické oddelenie ULVM, OÚSA a SZU, Bratislava - SK*)

Patofyziologické sekvencie pri AITP sú kombináciou pôsobenia B a T-lymfocytov na celú vývojovú líniu Tr s výsledným zvýšením deštrukcie a znížením produkcie s následnou trombocytopeniou (TP). Deštrukcia Tr prebieha po línii humorálnej a celulárnej ktorých kombinácia, miesto pôsobenia a intenzita sú rôzne medzi jedincami aj v čase. Slezina je orgánom a miestom "koncentrácie" zložiek imunitného systému – T a B lymfocytov a makrofágov - miestom ich produkcie ale pravdepodobne aj riadi/reguluje ich distribúciu. Splenektómia (SE) znamená odstránenie 1/3 imunitného systému – jeho troch na TP sa podieľajúcich zložiek (B-Ly, T-Ly, makrofágov) a tiež najvhodnejšieho prostredia pre deštrukciu Tr. Za účelom zistenia zmien v spektre lymfocytov pri AITP po SE a ich možných korelácií s jej efektom a ďalším priebehom ochorenia sme monitorovali subpopulácie lymfocytov. Detegovali sme aj na hodnoty T-regulačných lymfocytov (TREG). TREG sú kritické pre udržanie imunitnej tolerancie, preto pri autoimunitných ochoreniach je vhodné poznanie ich funkcie a stavu. Vyšetřili sme skupinu 27 pacientov s AITP po SE v rámci ich dlhodobého klinického sledovania. Ani jeden z pacientov nemal všetky hodnoty subpopulácií lymfocytov v limite referenčných hodnôt: zvýšené hodnoty T-Ly (Th) malo 7/27, znížené 11/27p; zvýšené hodnoty B-lymfocytov boli u 12/27, znížené 10/27p; zvýšené hodnoty NK-Ly malo 10/27p a znížené 8/27p. Hodnotenie zastúpenia TREG je problematické pre nedostatok údajov o ich referenčných hodnotách (RH) - v súbore sú hodnoty znížené aj zvýšené. Kompletnú dhodobú kompletnú remisiu malo 20/28p, parciálnu 5/27p, bez remisie boli 2/27p. Korelácie kvantitatívnych zmien subpopulácií a efektu splenektómie - vo zmysle kvality remisie neboli jednoznačné, ale vyššie hodnoty T-Ly (Th) resp. znížené TREG boli častejšie u pacientov bez remisie, alebo len z parciálnou remisiou (zvýšené T-Ly a parciálna resp. žiadna remisia 5p resp. 2p. Nižšie hodnoty T-Ly (Th) a vyššie B-Ly a TREG boli u 12/20 pacientov s kompletnou remisiou. Pri hodnotení významu zastúpenia subpopulácií Ly je potrebné zvažovať nasledujúce potenciálne modifikujúce faktory: subpopulačné spektrum pred splenektómiou, individuálne imunitné spektrum a dynamiku ochorenia, nedostatočnú špecifickosť hodnotenia anti-Tr protilátok, chýbanie relevantných referenčných hodnôt pre TREG a v neposlednom rade aj chýbanie RH pre pacientov s AITP bez SE a kontrolnej skupiny SE u pacientov bez autoimunitného ochorenia.

2324.

Efektivita podání romiplostimu u primární imunitní trombocytopenie analýza dospělých pacientů z reálné hematologické praxe

Červinek L., Čermák J., Čaniga M., Černá O., Konířová E., Gumulec J., Schutzová M., Hluší A., Hochová I., Obernauerová J., Brejcha M., Vonke I., Walterová L., Dušek L., Mužík J., Burger M., Kozák T. (*IHK FN, Brno; Praha, Ostrava, Plzeň, Olomouc, Mladá Boleslav, Nový Jičín, České Budějovice, Liberec*)

Úvod: Přinášíme data z reálné klinické praxe týkající se léčby pacientů s chronickou imunitní trombocytopenií agonistou TPO receptoru- Nplate® (romiplostim). Do analýzy bylo k lednu 2013 zahrnuto celkem 69 pacientů z 12 specializovaných hematologických center v České republice. Ze souboru 69 pacientů je 23 pacientů po splenektomii, 46 pacientů splenektomii dosud nepodstoupilo, 28 pacientů jsou muži, 41 pacientů tvoří ženy. Nplate (romiplostim) byl v průměru indikován ve 4. linii léčby ITP u pacientů po splenektomii a ve 3. linii léčby u pacientů bez splenektomie. Doba od stanovení diagnózy ITP k zahájení léčby romiplostimem byla v průměru 20 let u splenektomovaných a 7 let u nesplenektomovaných pacientů. Medián hladiny trombocytů před zahájením léčby romiplostimem byl 12 x 10⁹/l u splenektomovaných a 15 x 10⁹/l u nesplenektomovaných pacientů. Před zahájením léčby romiplostimem mělo krvácivé projevy 41% pacientů, přičemž 8,6 % pacientů mělo závažné krvácení Grade 3-4. Průměrná dávka romiplostimu byla v registru 3,6 µg/kg/týden u splenektomovaných a 3,0 µg/kg/týden u nesplenektomovaných pacientů. Průměrná týdenní dávka zůstala po dobu sledování relativně stabilní. Celkově 38% pacientů užilo za dobu sledování konkomitantní terapii. Medián délky léčby pacientů sledovaných v registru byl 11,2 měsíce. Průměr hladiny trombocytů u pacientů na léčbě byl 53x10⁹/l u pacientů po splenektomii a 92x10⁹/l u pacientů bez splenektomie. Co se týká nežádoucích účinků tyto byly v ITP registru zaznamenány u 26,1% pacientů. Poněkud vyšší byla frekvence reportovaných nežádoucích účinků v oblasti pohybového ústrojí. Pokud budeme hodnotit dosaženou léčebnou odpověď u pacientů s ITP na terapii romiplostimem v registru pacientů u 52 % bylo dosaženo kompletní remise ITP, u 15,8 % pacientů parciální remise ITP a u 8,7% nebyla zaznamenána léčebná odpověď

CML A PH- MPN, SÁL MADRID

2298.

Nové lieky v liečbe CML po zlyhaní tyrozínkináza inhibítorov

Tóthová E., Kafková A. (*Ústav lekárskej a klinickej biofyziky LF UPJŠ, Košice – SK; Klinika hematológie a onkohematológie UN L.Pasteura, Košice – SK*)

Úvod: Chronická myelocytová leukémia (CML) s dôkazom cytogenetickej abnormality -Philadelphia chromozómu je modelovým príkladom toho, ako významne zasiahli objavy v nádorovej genetike do ďalšieho osudu pacientov. Boli to práve pokroky v molekulovej biológii, ktoré umožnili identifikovať fúzny gén (BCR-ABL), chimerický proteín a napokon vytvoriť malú molekulu, ktorá dokáže zmenený gén inhibovať. Tak ako sa menili názory na príčinu a biologickú podstatu CML, dochádzalo aj k zmenám v pohľade na liečbu. Hlavnú skupinu liekov, ktorými sa liečia chorí s CML v súčasnosti predstavujú inhibítory tyrozínovej kinázy (TKI) a je predpoklad, že táto skupina liekov bude mať významné postavenie v primoterapii CML aj naďalej. Aj napriek excelentným výsledkom dosiahnutým štandardnými dávkami TKI 1. a 2. generácie, približne u jednej tretiny pacientov nedosiahneme žiaducu odpoveď. Najčastejšou príčinou zlyhania liečby je získaná rezistencia, a preto v snahe jej predchádzať sa sústreďuje pozornosť aj na ďalšie nové lieky a molekuly ev. ich kombinácie. Ciele: Práca je prehľadom nových liekov, predovšetkým aktívnych TKI 3.generácie, inhibítorov farnesyl-transferázy a aurora kináz, non- ATP kompetitívnych inhibítorov, vrátane Heat Shock protein 90 inhibítorov, histone- deacetyláza inhibítorov, látok blokujúcich DNA-methyltransferázu ako aj ďalších perspektívnych molekúl, z ktorých mnohé samotné, alebo v kombináciách sa budú môcť v blízkej budúcnosti uplatniť ako súčasť štandardnej liečby CML. Závery: Aj keď dosiaľ bolo cieľom liečby tzv.“operational cure“, t.j dosiahnutie vymiznutia všetkých známk ochorenia a zabránenia možnosti transformácie do blastovej transformácie, v budúcnosti sa liečba CML zamerá na tzv.“ absolute cure“, t.j. eradikáciu alebo vyčerpanie aj poslednej leukemickej bunky z tela pacienta - liečbu zacielenú na odstránenie patologickej kmeňovej bunky.

2385.

Úspešná liečba CML v dobe tehotenstvá a po porodu.

Klamová H., Srbová D., Šišková M., Březinová J., Machová Poláková K., Cetkovský P., Šťastná Marková M. (*Ústav hematologie a krevní transfúzie, Praha; 1.interní klinika VFN a LF UK, Praha*)

Úvod: Incidence chronické myeloidní leukémie (CML) a tehotenství je odhadována na 1:75000. Možnosti léčby CML u těhotných žen jsou však limitované rizikem poškození plodu, neléčená nemoc znamená ohrožení nemocné z progresu choroby. Léčba těhotné ženy s leukémií proto představuje nelehkou výzvu jak pro pacientku, tak také pro lékaře. Referujeme vlastní zkušenosti s léčbou CML při současně probíhajícím těhotenství. Cíl: Zhodnotit možnost účinné léčby CML po dobu probíhajícího těhotenství bez ohrožení zdárného vývoje plodu a následné dosažení kvalitní léčebné odpovědi v období po porodu. Metodika: Celkem 12 těhotenství potvrzeno u 11 nemocných žen a 9 těhotenství proběhlo u 8 partnerek mužů s CML v letech 2001-2012. Čtyři pacientky požádaly o přerušení těhotenství, 8 těhotenství u 7 žen proběhlo do plánovaného termínu porodu. Kromě jedné pacientky, u které těhotenství zjištěno ve 20.týdnu ostatní zjištěna v období 1.trimestru. 5 těhotenství potvrzeno současně s diagnostikovanou dosud neléčenou CML, jedno při léčbě imatinibem (IM) a 1krát na terapii interferonem (INF). V pořadí druhé, plánované těhotenství u 1 pacientky proběhlo po přerušení léčby dasatinibem (DA) v dosažené velké molekulární remisi (MMoR). Po dobu 1.trimestru léčba pokud indikována leukodeplecí, ve 2. a 3.trimestru leukodeplece a/nebo INF. Sedm mužů léčeno v době fertilizace 8-101 měsíců imatinibem, 1 pacient dasatinibem. Výsledky: Všechna 8 těhotenství (u 7 žen) ukončeno porodem zdravých dětí, které nyní ve věku 1 měsíc až 12 let. Po porodu u 5 pacientek zahájena léčba IM, u 4 z nich následně DA, jedna pokračovala v INF, v trvající molekulární odpovědi (MR). 6 nemocných (85%) docílilo v mediánu 18 měsíců kompletní cytogenetické remise (CCyR), 5 z nich také MMoR. Odpověď 1 pacientky nezhodnocena, dosud krátce po porodu. Pacientka s plánovaným přerušením léčby DA po celou dobu těhotenství bez léčby, kdy sice ztratila MR, po jeho opětovném nasazení však do 3 měsíců MMoR opět dosáhla. Těhotenství partnerke mužů s CML proběhla bez komplikací, ukončena porodem zdravých dětí. Závěr: Realizovaný léčebný postup u žen s CML, které se rozhodly v těhotenství pokračovat vývoj plodu negativně neovlivnil a časné

po porodu zahájená léčba inhibitory tyrozínových kináz umožnila dosažení kvalitní cytogenetické a molekulární odpovědi. Léčba CML při současně probíhajícím těhotenství je tedy možná, vyžaduje však pečlivé monitorování ženy a plodu a také zodpovědný přístup pacientky. Podporováno CELL.

2489.

K heterogenitě heterochromatinu v centrální oblasti buněčného jádra v granulocytech CML

Smetana K., Mikulenkova D., Klamová H. (*ÚHKT, Praha*)

Jak je obecně známo, v centrální „na geny bohaté“ (gene rich) oblasti buněčného jádra heterochromatin je sídlem spících genů díky kondenzaci DNA. Z hlediska diagnostické cytologie pak heterochromatin je důležitým markerem pro posuzování diferenciace a maturace buněk. Na druhé straně stav kondenzace DNA a heterochromatinu uniká pozornosti i když bylo předpokládáno, že má vztah ke inaktivaci - „mlčení“ - genové exprese. Obrazová optická denzitometrie (OOD) je pak vhodná kvantitativní metoda pro hodnocení stavu kondenzace DNA a chromatinu in situ v jednotlivých buňkách po vizualizaci cytochemickými metodami. Zde je nezbytná zmínka, že i v hematologii panoptické barvení je možno pokládat za cytochemickou metodu vhodnou pro vizualizaci chromatinu. Z výsledku vyplývá, že u pacientů s CML neléčených cytostatiky v době odběru kostní dřeně je kondenzace heterochromatinu v centrální oblasti jádra heterogenní a to jak v myeloblastech, tak ve zralých segmentovaných granulocytech. Maximální kondenzace heterochromatinu by tedy mohla odpovídat „genovému mlčení“, zatím co minimální kondenzace by mohla označovat místa s potenciální možností genové aktivace v granulocytových progenitorech i zralých granulocytech. Exprese genové aktivity se totiž odehrává na okraji takových míst a odpovídají euchromatinovým zónám. Při této příležitosti je však nezbytná zmínka o zvýšených hodnotách stavu kondenzace heterochromatinu centrální oblasti buněčného jádra ve zralých buňkách. Výsledky také otevřely otázku genových inaktivací ve vztahu ke zvyšování kondenzace heterochromatinu a snižování velikosti jádra během diferenciace a maturace krevních buněk Studie byla provedena částečně s podporou Min.zdrav. ČR.

2440.

Špecifiká diagnostiky a léčby mladých pacientů (< 40 rokov) s Ph negativnou myeloproliferativnou neopláziou

Hatalová A., Jankovičová D., Mistrík M. (*Klinika hematologie a transfuziologie, LF U K, SZU, UN, Bratislava – SK*)

Úvod: Ph negativne myeloproliferatívne neoplázie (MPN), klasické podtypy esenciálna trombocytémia (ET), polycytémia vera (PV) a primárna myelofibróza (PMF) sú v poslednom desaťročí intenzívne rozoberané. Diagnostické algoritmy, liečebné odporúčania v duchu medicíny založenej na dôkazoch (angl. Evidence-based Medicine – EBM) majú aj napriek vysokému stupňu prepracovanosti sporné body, napr. leukemogenicitu hydroxyurey (HU) a jej použitie. Výber liečebnej modality je často problémom najvýpuklejším práve v skupine mladých pacientov. Metody: Cieľom práce je posúdenie priebehu a liečby MPN v súbore mladých pacientov (n=23) s vekom od 19 do 40 rokov (medián 29,5), diagnostikovaných a liečených od roku 2006. Súbor pozostával zo 17 žien a 6 mužov. Zastúpenie jednotlivých podtypov MPN: PV (9/23), ET (4/23), PMF (10/23). Somatická mutácia JAK 2, potvrdená u 16/23 (69%) pacientov. Vaskulárne komplikácie popisujeme u 7/23 (30%) pacientov (4 PMF, 3 PV). V jednom prípade (PV) sme zaznamenali arteriálnu trombózu. V 4/23 venózna trombóza postihovala splanchnickú oblasť. V súbore našich pacientov sa nevyskytli žiadne hemoragické komplikácie. Použitá liečba: traja pacienti s dg ET a jeden pacient s dg PV (prepolycytemická fáza PV) sú na liečbe anagrelidom, 10/23 pacientov na liečbe interferónom (IFN). 1/23 pacientka s dg PV vo veku 19 rokov je na antiagregačnej liečbe a venepunkciách. Osobitne posudzujeme liečbu s IFN a obhajujeme tzv.časné nasadenie IFN v manažmente PMF, ako prevencie progresie ochorenia. V liečbe našich pacientov absentuje použitie HU. Je použitá iba v jednom prípade ako tzv. premostujúca liečba v príprave pred chirurgickým výkonom. Podrobnejšie analyzujeme už spomínané vaskulárne komplikácie v splanchnickej oblasti u 3 žien (2 PMF, 1 PV) s pozitívnu somatickou mutáciou JAK 2. V dvoch prípadoch atypickej MPN závažná vaskulárna komplikácia predchádzala diagnostike MPN. Záver: Mladý pacient (vek pod 40 rokov) s diagnózou MPN predstavuje v hematologickej praxi medicínsky, psychologický a sociálny problém. Táto skupina pacientov sa často lieči na základe skúseností jednotlivých pracovísk a liečebných protokolov bez prihladenia na špecifiká

pacientovho veku. V liečbe mladých pacientov jednoznačne preferujeme IFN a jeho včasné nasadenie. V používaní HU sme v našom manažmente v rozpore s medzinárodnými odporúčaniami. Pre potenciálnu leukemogenicitu jej použitie rezervujeme pre limitované situácie.

2349.

Zkušenosť s liečbou Eculizumabem u nemocných s Paroxysmálnou nočnou hemoglobinúriou

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

Chybné inhibítorů aktivované C5 a C8 složky komplementu je základním patogenetickým mechanismem uplatňujícím se v rozvoji hemolýzy u paroxysmální noční hemoglobinurie (PNH). Eculizumab je humanizovaná myší monoklonální protilátka proti C5 složce komplementu. Podávání eculizumabu (Soliris®, Alexion, USA) nemocným s PNH vede k vymizení hemolýzy, výraznému snížení závislosti na transfuzích a incidence trombotických komplikací a k významnému zlepšení funkce ledvin poškozených opakovanými hemolytickými epizodami. Eculizumab je podáván 5 našim nemocným s těžkou formou PNH s opakovanými epizodami těžké hemolýzy, s nutností opakovaného podávání transfuzí erytrocytů, u 2 nemocných byly před léčbou přítomny trombotické komplikace a 2 nemocní měli známky chronické renální insuficience. Dávkování přípravku se řídí obvyklým schématem (600mg i.v. 1x týdně 5 týdnů a poté 900mg i.v. 1 x za 2 týdny trvale jako udržovací léčba). U všech nemocných došlo již během indukční léčby k ústupu hemolýzy dokumentované výrazným snížením hodnoty LD (z 39 μ kat/l na 8,5 μ kat/l), k normalizaci koagulačního nálezu a snížení počtu podaných transfuzí. Průměrný počet transfuzí před zahájením léčby činil 3,6 TU/měsíc, po skončení indukční léčby pak 0,4 TU/měsíc. Nebyly pozorovány žádné vedlejší účinky léčby ani nové trombotické komplikace, k reparaci poškození funkce ledvin však dochází velmi pomalu. Eculizumab představuje efektivní léčbu zejména pro nemocné s PNH s opakovanými epizodami těžké hemolýzy a s přítomností komplikací (trombozy, poškození ledvin). Nevýhodou jeho podávání je kromě vysoké ceny zejména nutnost trvalého podávání udržovací léčby, což může mít určitý vliv na kvalitu života nemocných.

2352.

Výpočet prahových hladin pro vysoce citlivou detekci mutací v kinázové doméně BCR-ABL pomocí sekvenování nové generace: zaměřeno na hlubokou detekci mutací u CML v chronické fázi

Broučková A., Kulvait V., Soverini S., Kohlmann A., Jarušková M., Linhartová J., Klamová H., Trněný M., Haferlach T., Baccarani M., Martinelli G., Machová Poláková K. (*Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha – CZ; 1. lékařská fakulta a Centrum experimentální hematologie, UK, Praha – CZ; Department of Experimental, Diagnostic and Specialty Medicine, University of Bologna, Bologna – Italy; MLL Munich Leukemia Laboratory, Mnichov – Germany*)

Sangerovo sekvenování (SS) je nejrozšířenější metodou pro detekci mutací v kinázové doméně (KD) BCR-ABL s citlivostí 15-20%. Sekvenování nové generace (NGS) technologie 454 (Roche Applied Science) má díky své klonální povaze výrazně vyšší rozlišovací schopnost a umožňuje hlubokou sekvenaci (DS) cílových genů. Je však zapotřebí mít k dispozici nástroje umožňující odlišovat chyby vznikající v průběhu přípravy vzorků od signifikantních mutací. 1) Vyvinuli jsme model pro korigování chyb a pro odhad prahových hladin pro detekci mutací v KD BCR-ABL s použitím DS. 2) Vypočítané prahové hladiny jsme aplikovali pro retrospektivní DS analýzu BCR-ABL mutací asociovaných s rezistencí na léčbu TKI u CML pacientů v chronické fázi. BCR-ABL mutace byly pomocí DS vyšetřeny ve 129 vzorcích 15-ti pacientů, kteří byli léčeni TKI ve 2-3 liniích. Použitá BCR-ABL plata vyvinutá v rámci studie IRON-II (ELN) obsahují fúzní primery generující 4 částečně se překrývající amplikony, jenž pokrývají celou kódující oblast KD. Pro odhad frekvence chyb jednobodových nukleotidových záměn (SNS) jsme použili 8 vzorků zdravých jedinců. Frekvence chyb byla odhadována pomocí Lea Coulson distribuce. Distribuční parametr byl odhadován pomocí metody maximální věrohodnosti dle Foster (2006, DNA Repair). Je-li pravděpodobnost, že stejný nebo vyšší počet SNS čtení každé báze se vyskytuje v chybové distribuci, menší než 1%, pak takovou SNS považujeme za významnou mutaci. Na hladině 1% byly stanoveny prahové hladiny pro každou SNS. 1) Odhadované frekvence SNS chyb byly výrazně vyšší pro nukleotidové tranzice vs. transverze (př. průměr 2,2 T/C záměn vs. 0,1 T/A na 3000 čtení). Obdobné prahové hladiny byly vyšší pro tranzice (př.

2,6% pro detekci SNS způsobující mutaci T315I) než pro transverze (př. 0,3% V299L). 2) S využitím prahových hladin jsme se zaměřili na to, zda DS překonává SS v časnější detekci BCR-ABL mutací. DS detekovalo 5 mutací o 3 měsíce dříve, 4 o 4 měsíce a 2 o 17 měsíců dříve než SS během léčby imatinibem. Navíc byly DS odhaleny minoritní mutované populace (G250R, L387F, L364I, Y253H) u 4 pacientů. U 3 pacientů DS detekovalo minoritní populace s F317L, Y253H a T315I před změnou léčby, které expandovaly v průběhu zvoleného druholiniového TKI. Porovnávali jsme hladinu vstupních mutací detekovanou DS a SS po změně TKI. Vstupní mutace byly stále detekovatelné DS u 2 pacientů, přestože v době analýzy dosáhli MMR. Podpořeno IGA NT11555 a NT13899

LYMFOMY 1

2483.

Folikulární lymfom – průběh relapsů v závislosti na úvodní léčbě.

Trněný M., Janíková A., Belada D., Procházka V., Mociková H., Pírnos J., Kubáčková K., Matuška M., Lysý M., Baršová L., Benešová K., Campr V. (1. LF UK a VFN, Praha; FN, Brno; FN, Hradec Králové; HOK FN, Olomouc; Nemocnice, České Budějovice; FNKV, Praha; FN Motol, Praha; FN, Ostrava; Masarykova nemocnice, Ústí n. Labem; Nemocnice, Liberec)

Zavedení rituximabu do léčby nemocných s folikulárním lymfomem signifikantně zlepšilo jak dobu do progresu (PFS) tak celkové přežití (OS). Z historických dat vyplývá, že každý následující relaps, resp odpověď je spojena s kratším PFS resp. trváním odpovědi. Existuje jen velmi málo dat, která by vycházela z období imunochemoterapie. Metodika: Naše analýza byla provedena na neselektované skupině 1314 nemocných s diagnózou FL od 1999 do 2010. PFS byl kalkulován od doby diagnózy do doby progresu/relapsu nebo úmrtí, následný PFS byl kalkulován od doby progresu do doby další progresu/relapsu nebo úmrtí. Výsledky: Soubor 1314 nem. tvořilo 59% žen, medián věku při dg 57 let (18-93), FLIPI riziko při dg dobré u 34%, střední 28% and vysoké u 35% nemocných (2% neznámo). Většina pacientů byla léčena chemoterapií (87%), nejčastější režim byl CHOP (65%), rituximab (R) in v 1.linii byl použit u 63% léčených nemocných a R maintenance byla použita u 23% nem. Celková odpověď byla 93% s 73% CR(u). S mediánem sledování 3,9 roku bylo zaznamenáno 478 progresí a 232 úmrtí. Medián PFS byl 5,6 r. a OS v 5 letech byl 82,9%. Ze 478 nemocných s 1. progresí u dalších 137 nem byla zaznamenána 2. progres, u 43 nem. 3. progres a u 13 nem. 4. progres. Medián 2.PFS byl 3,0 roky, 3. PFS 2,3 roku a 4. PFS 2,0 roky ($p < 0.001$). Medián následných PFS u nemocných léčených jen chemoterapií byl 3,3 roku pro 1. PFS, 3,3 roku pro 2. PFS, 2,6 roku pro 3. PFS a 2,1 roku pro 4.PFS (p ns). U nemocných léčených v indukci rituximabem byly výsledky odlišné: 1.PFS 7,9 roku, 2. PFS 2,4 roku, 3. PFS 1,4 roku. Souhrn: U nemocných léčených samotnou chemoterapií v indukci není trvání následných PFS odlišné od prvé, je to dáno použitím rituximabu v dalších liniích. Rozdíl je u nemocných léčených rituximabem v 1. linii, ti mají signifikantně delší 1.PFS proti následným. Následné PFS se signifikantně neliší mezi nemocnými léčenými v indukci jen chemoterapií či rituximabem. Dedikace: IGA NT12193-5/2011.

2478.

Intenzivní úvodní terapie u rizikových nemocných s folikulárním lymfomem: má smysl v éře R-CHOP?

Procházka V., Papajík T., Trněný M., Belada D., Janíková A. (Hemato-onkologická klinika FN, Olomouc; 1. interní klinika, VFN, Praha; Oddělení klinické hematologie, FN, Hradec Králové; Interní hematologická a onkologická klinika, Brno)

Úvod: Folikulární lymfom (FL) představuje onemocnění s heterogenním klinickým průběhem. V éře imunoterapie se považuje za optimální režim úvodní léčby rituximab-cyklofosfamid- doxorubicin-vinkristin- prednison s následnou udržovací terapií rituximabem (R-CHOP-MR). Pacienti s vysokým rizikem dle indexu FLIPI dosahují mediánu doby do progresu pod 5 let. Přínos intenzivní terapie u rizikových mladších nemocných s FL je nejasný. Cíl: Zhodnotit léčebné výsledky rizikových pacientů s FL léčených intenzivní úvodní terapií s nebo bez autologní transplantace (ASCT) a srovnat je s nemocnými identického rizika léčených režimem R-CHOP-MR. Metoda: Na našem pracovišti jsme identifikovali 48 nemocných středního a vysokého rizika dle FLIPI, kteří byli na základě riziku uzpůsobené strategie léčení dle sekvenčního protokolu s rituximabem (SQ), bez (46 %) nebo s (54 %) konsolidací pomocí ASCT. 24 nemocných (50 %) bylo následně léčeno imunoterapií interferonem ($n=2$) nebo rituximabem ($n=22$). Kontrolní kohortu tvořil soubor 110 nemocných z registru Kooperativní lymfomové skupiny s FL grade I-IIIa, středního-vysokého rizika dle FLIPI, kteří byli při dg. mladší 65 let a byli léčeni R-CHOP-MR. Medián věku dosáhl ve skupině SQ 48,5 let, ve skupině R-CHOP 55 let ($p < 0,01$), nemocní se naopak nelišili co do zastoupení pokročilého stadia III/IV dle Ann Arbor (98 % vs 98 %, $p=0,32$) a vysokého rizika dle FLIPI 47,7 % (R-CHOP) vs 56,3 % (SQ), $p=0,32$. Výsledky: Procento kompletních remisí bylo významně vyšší ve skupině SQ (93,8 %) než R-CHOP-MR (67,6 %), $p < 0,01$. Při mediánu sledování 6,1 roku (SQ), respektive 4,5 roku (R-CHOP-MR, $p < 0,01$) došlo k progresi/relapsu u 10 (21 %) nemocných v rameni SQ a 44 (40,0 %) v rameni

R-CHOP-MR. Interval do progresu v 5 letech (PFS) u R-CHOP-MR 53,8 % (95% CI 0,42-0,65) u SQ 78,5 % (95% CI 0,66-0,91), $p < 0,01$. Celkové přežití (OS) v 5 letech u R-CHOP-MR 92,6 % (95% CI 0,86-0,99) u SQ 100 % (95% CI 0,85-1,00), $p=0,23$. Subanalýza skupiny SQ s udržovací terapií ($n=24$) prokázala vyšší 5-leté PFS (88,4 %) oproti skupině SQ bez udržovací terapie (69,1 %), $p=0,22$. Byl naznačen trend delšího OS ve skupině SQ s udržovací terapií oproti kohortě R-CHOP-P+MR (0 vs 7 událostí, $p=0,16$). Závěr: Intenzivní úvodní terapie navozuje v éře imunochemoterapie vyšší procento kompletních remisí a delší PFS oproti standardní terapii R-CHOP-MR. V případě nemocných skupiny SQ s udržovací terapií by pozorován i trend pro delší OS. Dedikace: LF-2013-004, IGA NT12193-5/2011.

2299.

Přidání rituximabu nezlepšuje prognózu u pacientů s primárním CNS lymfomem

Mociková H., Pytlík R., Sýkorová A., Janíková A., Procházka V., Vokurka S., Berková A., Trněný M. (Interní hematologická klinika, FNKV, 3. LF UK, Praha; 1. interní klinika – klinika hematologie, VFN a 1. LF UK, Praha; 4. Interní klinika hematologie, Fakultní nemocnice, Hradec Králové; Interní hematologická a onkologická klinika, FN, Brno; Lékařská fakulta Masarykovy Univerzity, Brno; Hemato-onkologická klinika, FN, LF UP, Olomouc; Hematologicko-onkologické oddělení, FN, Plzeň)

Úvod. Rituximab se úspěšně používá v léčbě B ne Hodgkinských lymfomů, ale jeho význam u primárních CNS lymfomů (PCNSL) je nejasný vzhledem k jeho obtížné dostupnosti přes hematoencefalickou bariéru. V této retrospektivní studii jsme hodnotili, zda přidání rituximabu ke standardní léčbě zlepšuje prognózu u pacientů s PCNSL. Pacienti a Metody. Analyzovali jsme 164 pacientů s PCNSL, kteří byli léčeni sekvenční léčbou: metotrexát, radioterapie a cytarabin (DeAngelis et al., 2002). U 49 ze 164 (29,9%) pacientů byl přidán k této léčbě i Rituximab (Shah et al., 2007). Přežití pacientů bylo vyhodnoceno pomocí Kaplan-Meierovy metody a rozdíly v přežití mezi podskupinami pomocí log-rank testu. Výsledky. Medián věku pacientů byl 63 let (rozsah 31-79). Medián IELSG skóre byl 2,5 a medián Karnofského skóre 60%. Expres BCL-6 byla vyšetřena u 74 pacientů (45%), z nich bylo 51 pozitivních. Pouze 51 pacientů (20 s rituximabem) dokončilo plánovanou léčbu a 113 pacientů předčasně ukončilo léčbu pro progresi, toxicitu nebo v důsledku vynechání radioterapie v rámci prevence neurotoxicity. Medián sledování celého souboru byl 13,8 měsíců. Celková dosažená odpověď (ORR) u všech pacientů byla 64,6% (51,8% kompletních remisí a 12,8% parciálních remisí), 12,9% pacientů nebylo z hlediska odpovědi na léčbu hodnotitelných. Ve srovnání skupin s rituximabem a bez rituximabu nebyl zjištěn statistický rozdíl v ORR ($p=0,772$). 2-leté přežití bez progresu (PFS) a celkové přežití (OS) celého souboru pacientů bylo 36%, respektive 42,8%. Rituximab ve srovnání s podskupinou bez rituximabu nezlepšil signifikantně ani PFS ani OS ($p=0,455$ respektive $p=0,726$). Věk ≥ 60 let byl identifikován jako nezávislý nepříznivý prognostický faktor pro PFS i OS ($p=0,025$ respektive $p=0,001$). BCL-6 pozitivita vykazovala trend nepříznivého prognostického faktoru pro PFS a OS (oba $p=0,052$). IELSG skóre 4 a 5 nedosáhlo statistické významnosti pro PFS a OS ($p=0,06$ respektive $p=0,079$). Závěry. Na základě našich výsledků přidání rituximabu nezlepšilo prognózu pacientů s PCNSL. Jejich prognóza je zejména u starších pacientů a pacientů s pozitivní expresí BCL-6 nadále nepříznivá i navzdory úsilí o zlepšení léčby. Podpořeno granty IGA MZ CR NT 13072-4 and MSMT PRVOUK P 27/2012 LF3 a P27/LF1/1.

2305.

Význam časného 18F-FDG PET/CT u pacientů s maligními lymfomy léčených imunochemoterapií – zkušenosti jednoho centra.

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

18F-FDG PET/CT umožňuje vysoce přesné zhodnocení léčebného výsledku po ukončení terapie většiny typů non-Hodgkinských lymfomů (NHL). Indikace vyšetření časně v průběhu terapie, může být cenným ukazatelem citlivosti nádoru na podávanou léčbu a významným prognostickým faktorem. Prediktivní síla časného PET/CT (ePET) vyšetření u pacientů s B-buněčnými CD20+ NHL léčenými imunochemoterapií (ICHT) není ještě zcela přesně ověřena a názory na jeho význam se různí. Cílem naší práce bylo zhodnocení výsledku ePET u rizikových nemocných s pokročilým CD20+ NHL léčenými pomocí rituximabu a intenzivní ICHT (CHOEP-like režim, doplněn o intenzivní

chemoterapii s podáním vyšších dávek metotrexátu a cytosin-arabinosidu). Do našeho souboru bylo zařazeno 77 pacientů s věkovým mediánem 49 let, kteří byli pomocí PET/CT vyšetřeni před zahájením terapie a následně po 2 nebo 3 cyklech chemoterapie (ePET). PET/CT bylo hodnoceno a pomocí $\Delta\text{SUV}_{\text{max}}$. 37 pacientů (48%) bylo ePET negativní, přičemž všichni po ukončení léčby dosáhli CR. 40 pacientů (52%) bylo ePET pozitivní, z nich 26 pacientů (65%) po ukončení terapie dosáhlo CR. 28 ePET pozitivních pacientů podstoupilo v rámci léčby autologní transplantaci periferních kmenových buněk. 3 leté PFS bylo 84% u ePET negativních versus 69% u ePET pozitivních pacientů ($p=0,062$). 3 leté OS bylo při vizuálním hodnocení 91% u ePET negativních versus 77% u ePET pozitivních pacientů ($p=0,213$). V případě hodnocení odpovědi pomocí $\Delta\text{SUV}_{\text{max}}$ bylo 3 leté PFS 83% u pacientů s $\Delta\text{SUV}_{\text{max}} > 66\%$ vs 47% u pacientů s $\Delta\text{SUV}_{\text{max}} \leq 66\%$ ($p=0,0063$). 3 leté OS bylo 92% u pacientů s $\Delta\text{SUV}_{\text{max}} > 66\%$ vs 59% u pacientů s $\Delta\text{SUV}_{\text{max}} \leq 66\%$ ($p=0,0063$). Pacienti, kteří dosáhli redukce SUVmax mezi vstupním a časným PET $\leq 66\%$ jsou vysoce rizikováni z nedosažení CR, progresu či následného relapsu onemocnění. ePET hodnocené pomocí $\Delta\text{SUV}_{\text{max}}$ se zdá být silným prognostickým ukazatelem pro PFS i OS. Práce podpořena grantem LF-2013-004

2306.

Castlemanova choroba: zkušenosti jednoho centra s diagnostikou a léčbou 10 pacientů

Szturz P., Adam Z., Michalka J., Šmarďová L., Janíková A., Šálek D., Řehák Z., Koukalová R., Mayer J. (Interní hematologická a onkologická klinika LF MU a FN, Brno; Oddělení nukleární medicíny, PET Centrum Masarykova onkologického ústavu, Brno)

Úvod: Castlemanova choroba (CD) je charakterizována 2 klinickými (unicentrická, multicentrická) a 4 histomorfologickými (hyalinně-vaskulární, plazmocelulární, smíšená, plazmablastická) formami, které se mohou navzájem různě kombinovat. Ačkoliv toto vzácné lymfoproliferativní onemocnění nemá klonální charakter, bývá se zvýšenou četností doprovázeno neoplastickými projevy (Kaposiho sarkom, non-hodgkinské lymfomy) anebo se přímo může maligně transformovat. V naší práci analyzujeme dosud největší popsany soubor pacientů v České republice se zaměřením na diagnostiku a léčbu. Pacienti a metody: Do retrospektivní studie (1998-2013) bylo zařazeno 10 pacientů, 6 mužů a 4 ženy, s věkem v době diagnózy 27-66 let [$52,4 \pm 13,5$ ($n=10$)]. Vstupní rozměr největšího ložiska byl 30-95 mm [$55,7 \pm 22,0$ ($n=10$)] s metabolickou aktivitou vyjádřenou semikvantitativně jako SUVmax (Maximum Standardized Uptake Value) $2,20-8,98$ [$4,98 \pm 1,80$ ($n=9$)] dle PET/CT vyšetření (pozitronová emisní tomografie/výpočetní tomografie). Pacienti s unicentrickou formou (3) podstoupili chirurgickou sanaci. Pacienti s multicentrickou formou (7) byli jen sledováni (2) nebo byla provedena exstirpace největší masy (1) nebo podána systémová léčba (4), která sestávala z kombinačních režimů (cytostatika, rituximab, glukokortikoidy), dále zahrnovala monoterapie tocilizumabem, thalidomidem a lenalidomidem. V jednom případě (asociovaný POEMS syndrom = polyneuropatie, organomegalie, endokrinopatie, monoklonální gamapatie, kožní změny) byla provedena autologní transplantace periferních kmenových buněk. Výsledky: Bylo dosaženo 50% remisí (3 pacienti s unicentrickou formou s remisí 51, 8 a 9 měsíců; 2 s multicentrickou formou s remisí 3 měsíce při léčbě s thalidomidem a 12 měsíců po léčbě lenalidomidem). Ve 40% případů bylo onemocnění stabilní (multicentrické formy; 2 zcela bez léčby, sledování 171 a 24 měsíců; 1 po systémové léčbě, sledování 23 měsíců; 1 po dvou exstirpacích se stabilním rozsahem lymfadenopatie 15 let, přičemž od první operace uplynulo 27 let). U jedné pacientky (10%) došlo k rychlé progresi POEMS syndromu s úmrtím (sledována 4 měsíce). Závěr: CD je součástí diferenciální diagnostiky lymfadenopatie, anémie a B-symptomů (horečky, hubnutí, noční poty). Na rozdíl od unicentrické formy vyléčitelné excizí bývá multicentrický typ refrakterní k léčbě. S ohledem na vysokou nákladovou efektivitu a dobrou snášenlivost upřednostňujeme na našem pracovišti v těchto případech thalidomid ze skupiny imunomodulancií.

LYMFOMY 2

2504.

Novinky v léčbě Hodgkinova lymfomu a systémového anaplastického velkobuněčného T lymfomu

Mociková H. (Interní hematologická klinika, FNKV, 3. LF UK, Praha)

U pacientů s relapsem Hodgkinova lymfomu (HL) podání polychemoterapie s autologní transplantací kmenových buněk zlepšuje celkové přežití, ale pokud pacienti relabují i po transplantaci nebo jsou refrakterní na chemoterapii, je jejich další léčba obtížná. U systémového anaplastického velkobuněčného T lymfomu (ALCL) dosavadní neuspokojivá léčba relapsu představuje velkou výzvu pro nové účinnější léky než je samotná chemoterapie. Nádorové buňky Hodgkinova lymfomu (HL) a anaplastického velkobuněčného T lymfomu (ALCL) exprimují antigen CD30, který je vhodným cílem pro léčbu těchto onemocnění. Brentuximab vedotin (SGN-35) je konjugát protilátky anti CD30 s kovalentně navázaným monometyl auristatinem. Protilátka anti CD30 umožní navázání na antigen CD30 na nádorových buňkách a monometyl auristatin způsobí narušení mikrotubulů v nádorových buňkách a následně zastavení buněčného cyklu. Cílená léčba s brentuximab vedotinem ve studiích fáze 1 a 2 vedla k vysokému počtu celkových odpovědí na léčbu (75% u HL a 86% u ALCL) a k prodloužení přežití bez progresu u relabovaných nebo refrakterních HL a systémových ALCL. Toxicita léčby byla přijatelná. Z nových léků inhibitor mTOR (mammalian target of rapamycin) everolimus dosáhl celkovou odpověď pouze 38-47% u relabovaných nebo refrakterních HL po transplantaci nebo u pacientů nevhodných k transplantaci. Inhibitory histondeacetylázy (panobinostat a mocetinostat) nedosahují významnou celkovou odpověď (27%) a stejné indikaci jako everolimus a způsobují navíc výraznou hematologickou toxicitu. Význam antifolátu pralatrexátu a inhibitoru histondeacetylázy romidepsinu je u relabovaných ALCL nejasný vzhledem k nízkému počtu pacientů, kterým byl ve studiích aplikován. Aktuálně probíhají studie s brentuximab vedotinem a ostatními novými léky samostatně nebo v kombinaci s chemoterapií, které umožní určit optimální strategii v léčbě HL a systémového ALCL.

2455.

Opodstatnenosť stagingovej biopsie kostnej drene pri klasických Hodgkinových lymfómoch

Balhák T., Marcinek J., Szépe P., Kapitánová K., Kapustová L., Plank L. (Ústav patologickej anatomie JLF UK a UNM, Martin - SK)

Stagingová biopsia kostnej drene (KD) je štandardnou súčasťou klinického manažmentu pacientov pri väčšine malígnych lymfómov. Služi na posúdenie prítomnosti základného ochorenia a zhodnotenie stavu rezervnej krvotvorby. Je známe, že klasické Hodgkinove lymfómy (CHL) infiltrujú KD veľmi zriedkavo, čo pochopiteľne otvára diskusiu o opodstatnenosti stagingovej biopsie KD, navyše ak je dostupné PET-CT. Ak je KD pri CHL infiltrovaná, ide o nepriaznivý faktor vedúci k zvýšeniu klinického štádia na IV. Pri retrospektívnej analýze nálezov v našom registri z rokov 2004-2013 sme z celkového počtu 704 CHL identifikovali nádorové postihnutie KD len v 37 prípadoch (5,3%). V 31 prípadoch (4,4%) bola prítomná lymfohistiocytová proliferácia s disperznými CD30+, zriedkavejšie aj CD15+ bunkami, čo zodpovedalo alebo bolo sugestívne z infiltrácie základného ochorenia typu CHL. Rozsah infiltrácie sa v týchto prípadoch pohyboval od 5% do 100%. V zostávajúcich 6 prípadoch (0,9%) bola KD infiltrovaná bunkami chronickej lymfocytovej leukémie (CLL) bez prítomnosti CHL, nakoľko tu išlo o prípady CLL kolidujúcej alebo transformovanej do sekundárneho CHL potvrdeného v biopsii lymfatických uzlín (LU). Z uvedených 31 prípadov bolo 5 CHL infiltrujúcich KD exkluzívne diagnostikovaných primárne v KD, čo je považované za raritný nález. Väčšina (71%) pacientov s CHL infiltrujúcimi KD bola staršia ako 50 rokov, pomer mužov a žien bol 3:2. Prekvapujúco, až 14 prípadov (45%) CHL infiltrujúcich KD vykazovalo v primárnej biopsii LU výraznú aktiváciu epitelioidných buniek. 14 prípadov (45%) CHL infiltrujúcich KD bolo v primárnej biopsii LU klasifikovaných ako nodulárna skleróza (NS), 9 prípadov (29%) ako zmiešaná bunkovosť (MC) a 8 prípadov (26%) nebolo možné jednoznačne typizovať alebo ich diagnostika bola problematická, niektoré boli CD15 negatívne. Z hľadiska primárneho miesta vzniku nevykazovali CHL infiltrujúce KD žiadne rozdiely oproti ostatným CHL. Najčastejšie išlo o postihnutie cervikálnych (12), axilárnych (6) a inguinálnych (5) LU, len v 2 prípadoch išlo o tumor mediastína. Na základe uvedeného možno konštatovať, že

vzhľadom k veľmi nízkemu podielu CHL infiltrujúcich KD sa paušálne vykonávanie trepanobiopsie javí ako neopodstatnené. Indikované by malo byť asi len pri cytopéniách alebo iných komplikáciách. Na druhej strane sa zdá, že CHL infiltrujúce KD môžu vykazovať určité unikátne črty a ich diagnostika býva častokrát problematická. Podporené Grantami VEGA 1/0378/12 a VEGA 1/0209/13.

2300.

Význam rituximabu v prvej a druhej línii liečby u Hodgkinova lymfomu s lymfocytárnou predomínou

Mociková H., Pytlík R., Štěpánková P., Michalka J., Raida L., Marková J., Kořen J., Král Z., Kozák T. (*Interní hematologická klinika, FNKV, 3. LF UK, Praha; I. interní klinika – klinika hematologie, VFN a 1. LF UK, Praha; 4. Interní klinika hematologie, FN, Hradec Králové; Interní hematologická a onkologická klinika, FN a LF MU, Brno; Hemato-onkologická klinika, FN a LF UP, Olomouc*)

Úvod: Silná exprese CD20 u Hodgkinova lymfomu s lymfocytárnou predomínou (LPHL) umožňuje použitie rituximabu v liečbe tejto nemoci. Rituximab je v tejto indikácii vysoce účinný a málo toxický, ale není zjavné, či časné použitie rituximabu u týchto pacientov zlepšuje prognózu. Cieľom tejto štúdie bolo porovnať dobu od diagnózy do druhého relapsu u pacientov liečených rituximabom v prvej a druhej línii liečby. Pacienti a metódy. Celkom bolo hodnotených 23 pacientov s LPHL (13 liečených rituximabom v 1. línii a 10 liečených rituximabom vo 2. línii liečby). Medián veku pacientov bol 33,2 let. Charakteristika pacientov (pohlaví, klinické stadium, B symptómy, rizikové faktory a podiel pacientov liečených kombináciou rituximabu s chemoterapiou a/alebo radioterapiou) sa významne nelíšila medzi oboma podskupinami. Prežitie bolo hodnotené pomocou Kaplan-Meierovej metódy a rozdiely v prežití medzi podskupinami pomocou log-rank testu. Výsledky. Medián sledovania celej skupiny bol 51,3 mesiacov (u rituximabu v 1. línii 32,1 mesiacov a u rituximabu vo 2. línii 86,9 mesiacov, rozdiel bol štatisticky významný, $p=0,004$). Medián sledovania od doby prvého relapsu u pacientov liečených rituximabom vo 2. línii bol 19,8 mesiacov. 5leté celkové prežitie celej skupiny bolo 100%. Nikto z pacientov liečených rituximabom v 1. línii nezrelaboval a len 1 pacient zrelaboval po liečbe s rituximabom vo 2. línii. Nebol pozorovaný štatisticky významný rozdiel v dobe od diagnózy do 2. relapsu medzi oboma skupinami ($p=1,0$). U žiadneho pacienta nedošlo k histologickej transformácii do difúzneho veľkobunčného B lymfomu. Závery. Doba od diagnózy do 2. relapsu sa nelíšila u pacientov liečených rituximabom v prvej alebo druhej línii liečby. Prognóza pacientov s LPHL je výborná a je možné očakávať s nasadením rituximabu do druhej či ďalšej línii liečby. Podporované výskumným projektom P 27/2012 Univerzity Karlovy, 3. Lékařské fakulty v Praze.

2359.

Diferenciálne diagnostické spektrum blastických CD20+/CD5+ B-NHL s koexpresiou cyklínu D1 : komplexný algoritmickej prístup s použitím morfolologickej, imunohistochemickej a FISH analýzy

Farkašová A., Balhárek T., Kviatková Z., Plank L. (*Ústav patologickéj anatómie, Jesseniova LF Univerzity Komenského a Univerzitná nemocnica, Martin – SK; Martinské biopické centrum, s. r. o., Martin – SK*)

Úvod: Blastoidný variant lymfómu z plášťových buniek (bMCL), difúzny veľkobunkový B-lymfóm (DLBCL), aj tzv. atypický Burkittov lymfóm (aBL), môžu zdieľať spoločné morfologické a aj niektoré fenotypové znaky vrátane imunohistochemickej exprese (IHC) CD5 a cyklínu D1. Preto je ich diferenciálna diagnostika v biopickéj praxi výzvou, ktorá vyžaduje kooperáciu medzi histologickou, IHC a fluorescenčnou in situ hybridizačnou (FISH) analýzou a ktorá je nevyhnutná z prognostického a terapeutického hľadiska. Metódy: Parafrínové rezy z 21 prípadov CD20+/CD5+ blastického B-NHL sa o. i. štandardne vyšetrovali na dôkaz exprese cyklínu D1, CD10, bcl2, bcl 6 a MUM1. Zároveň boli analyzované metódou FISH s cieľom detekcie prítomnosti prestavby génu CCND1 a/alebo translokácie IGH/CCND1. V prípade ich absencie boli prípady analyzované aj na dôkaz prestavby génu MYC, BCL2 a BCL6. Konečná diagnóza bola stanovená podľa kritérií WHO klasifikácie (2008). Výsledky: a) 15/21 prípadov, v ktorých sa dokázala pozitívna cyklínu D1 a prestavba génu CCND1, bolo diagnostikovaných ako bMCL. Ostatné analyzované IHC markery boli okrem exprese bcl2 a MUM1 negatívne. 10/15 prípadov bolo tri- alebo tetraploidných. b) V 5/21 prípadov nebola prestavba génu CCND1 prítomná. Tieto prípady, vrátane jedného s expresiou cyklínu D1 v časti

nádorových buniek, boli diagnostikované ako CD5+ DLBCL. Vykazovali rôznu expresiu CD10, bcl 6, resp. MUM1, čo umožnilo identifikáciu GCB, resp. non-GCB fenotypu. V 1 z nich bola identifikovaná prestavba BCL2 a v ďalšom prestavba BCL6 génu. c) V poslednom prípade s morfológiou na rozhraní DLBCL a aBL a s fenotypom CD5+/cyklínD1+ v časti buniek bol dôkaz prestavby génu CCND1 a BCL2 negatívny. Prípady boli po dôkaze prestavby MYC génu v zmysle identifikácie molekulovej signatúry BL klasifikované ako tzv. aBL. Záver: Koexpresia CD5 antigénu nie je výlučným nálezhom pre MCL (príp. CLL). Podobne, zrejme v dôsledku zmien na transkripčnej a posttranskripčnej úrovni, sa IHC pozitívna cyklínu D1 môže objaviť aj pri iných lymfómoch, než len pri nádoroch s prestavbou génu CCND1 z kategórie MCL. Pri prekryvajúcich sa parametroch morfológie a fenotypu predstavuje FISH analýza tu uvedených génu účinný a nevyhnutný nástroj na zvýšenie diagnostickej presnosti a prognostickej výpovede pre blastické ML s fenotypom CD20+/CD5+, príp. cyklín D1+. 1 Podporované grantom VEGA č. 1/0378/12 a projektmi CEPVII (ITMS: 26220120036) a MBRKM (ITMS: 26220220113) spolufinancovanými zo zdrojov EÚ.

2479.

Myši modely ľudského lymfomu z plášťových buniek (MCL) za použitia primárných MCL buniek a ustálených MCL línii

Klánová M., Soukup T., Jakša R., Molinský J., Latečková L., Maswabi B., Březinová J., Michalová K., Kulvait V., Živný J., Trněný M., Hernandez-Ilizaliturri F., Vokurka M., Klener P. (*Ústav patologické fyzologie 1. LF UK, Praha; Ústav histologie a embryologie, LF UK, Hradec Králové; Ústav patologie 1. LF UK, Praha; Ústav patologické fyzologie 1. LF UK, Praha; Ústav hematologie a krevní transfúze, Praha; I. Interní klinika - klinika hematologie VFN a 1. LF UK, Praha; Roswell Park Cancer Institute Buffalo – USA*)

Úvod: Lymfom z plášťových buniek (MCL) je agresívny typ B-nonhodgkinského lymfomu s nepriaznivou prognózou. Zavedli a charakterizovali sme myši modely MCL pomocou systémové (i.v.) xenotransplantácie (xt) primárných MCL buniek a MCL bunčných línii do imunodeficitných myši. Metódy: Pro xt sme používali primárne MCL bunky získané od pacientov s MCL a ustálené MCL bunčné línie (Jeko1, HBL2, Mino, Rec1, Granta519). Imunodeficitným myším sme do ocase žily aplikovali 5-50x106 primárných MCL buniek alebo 1-10x106 buniek MCL línie. Pred xt primárných MCL buniek boli myši subletálne (2.5Gy) ozárené. Infiltrácia myších tkaní MCL bunkami bola analyzovaná imunohistochemicky pomocou protilátok proti ľudskému cyklínu D1 a CD20 antigenu. Infiltrácia periférnej krvi MCL bunkami bola stanovená prútokovou cytometriou. Genová exprezie bola analyzovaná celogenomovými expresnými čipy. Výsledky: Engraftment nádorových buniek sme pozorovali u 7 z 13 primárných MCL vzorkov. Myši boli analyzované v rozmedzí 16-60 dní po xt. Hlavné miesto engraftmentu primárných MCL bola slezina. Ve väčšine prípadov sme detekovali infiltráciu MCL bunkami tak v kostnej dreni, jatrech a periférnej krvi. Engraftment s rozvojom diseminovaného ochorenia sme pozorovali u všetkých päť MCL bunčných línii. Průměrné přežití xenotransplantovaných myši se pohybovalo v rozmezí od 22 do 55 dnů v závislosti na MCL línii. Hlavní místo engraftmentu MCL línii byla kostní dřeň. Dalším konstantním znakem byla postupně narůstající infiltrace sleziny a jater. V závislosti na použité MCL línii jsme detekovali infiltraci ledvin, CNS, ovarii či formování podkožně rostoucích tumorů s nově tvořenou lymfatickou tkání. Zjistili jsme, že MCL buňky izolované ex vivo z kostní dřene či sleziny vykazují odlišnou genovou expresi, imunofenotyp a citlivost k cytotoxickým látkám ve srovnání s in vitro rostoucími MCL liniemi. K nejvíce deregulovaným skupinám genů (mezi ex vivo a in vitro MCL buňkami) patřily „Oxidativní fosorylace“ a „B-buněčná signalizace“. Monoterapie cytotatiky (cyklofosamid, gemcitabin, fludarabin), monoklonálními protilátkami (rituximab, bevacizumab) či cílenými léky (temsirolimus) významně prodloužila přežití myši s xenotransplantovanými lymfomy ve srovnání se skupinou neléčených myši. Závěr: Myši modely lidského MCL představují vhodné nástroje pro studium biologie onemocnění a pro preklinické testování experimentální terapie. Finanční podpora: IGA-MZ NT13201-4/2012, UNCE 204021, PRVOUK P24/LF1/3, PRVOUK 1-5101-280002 PVK

MNOHOČETNÝ MYELOM

2382.

Aktuální stav RMG a navazujících projektů České myelomové skupiny

Maisnar V., Klimeš D., Pelcová J., Jarkovský J., Hájek R. (IV. interní hematologická klinika, Hradec Králové; IBA MU, Brno; IHOK, FN, Brno; FN a LF, Ostrava)

Registr monoklonálních gamapatií – RMG a projekt časné diagnostiky mnohočetného myelomu – CRAB představují nadále dva hlavní projekty České myelomové skupiny. Důvodem pro vytvoření RMG byla snaha o zahájení prospektivního sběru dat nemocných s monoklonálními gamapatiemi z regionu střední a východní Evropy s cílem sledování jejich incidence, využívání a efektu jednotlivých léčebných modalit včetně výskytu nežádoucích příhod a toxicity. Sběr dat do registru byl zahájen v roce 2007 a dnes máme k dispozici rozsáhlou databázi, které snese srovnání i ve světovém měřítku (RMG patří v současnosti mezi 10 největších registrů svého druhu), a která nám začíná pomáhat plnit náš hlavní cíl a to další zlepšování péče o nemocné s monoklonálními gamapatiemi. Od roku 2010 byl systém sběru dat do RMG dále rozšířen o původní tzv. datové listy, které slouží ke sledování účinnosti „nových léků“ mnohočetného myelomu. Sdělení podává informaci o aktuálním stavu registru v roce 2013, tj. po 6 letech jeho existence. Aktuální stav databáze a počty nemocných zadaných jednotlivými spolupracujícími centry jsou dostupné na webových stránkách CMG – České myelomové skupiny (www.myeloma.cz). Celkový počet evidovaných nemocných již přesáhl 5000, z toho bylo k datu 15.3.2013 registrováno 1868 nemocných s MGUS a 3077 nemocných s mnohočetným myelomem. Na zadávání dat do registru se dnes podílí již 15 center v České republice a 2 centra ze Slovenské republiky. Nejdéle sledovanými nemocnými v základních skupinách je žena s MM sledovaná již 32 let a muž sledovaný pro MGUS dokonce již více než 35 let. RMG je vybudován na dvou základních principech: (1) každé centrum má trvale on-line k dispozici pouze svá data a současně i základní automatické analýzy včetně odpovídajících grafických zobrazení právě pro svoje centrum; (2) pro společné analýzy jsou slučována data pouze těch center, která vyjádřila souhlas se sdílením dat pro daný projekt. Pouze zástupci těchto center jsou následně spoluautory výstupu z provedené analýzy. Systém umožňuje kvalitní centrální management a správu dat jednotlivých center, přičemž jsou samozřejmě respektována jejich práva jako výhradních vlastníků klinických dat. Sdělení podává přehled dosavadních a současných společných projektů CMG realizovaných s využitím databáze RMG. Pravidelné analýzy databáze RMG jsou dnes využívány i v rámci argumentace při jednání se zdravotními pojišťovnami, farmaceutickými firmami, SÚKL i Ministerstvem zdravotnictví České republiky.

2308.

Dlouhodobé výsledky autologních transplantací u mnohočetného myelomu a prognostický význam kompletní remise v souboru 232 pacientů

Krejčí M., Adam Z., Pour L., Zahradová L., Sandecká V., Král Z., Mayer J. (Interní hematologická a onkologická klinika, FN, Brno)

Úvod: Autologní transplantace periferních hematopoetických buněk (ASCT) hraje důležitou roli v léčbě symptomatického mnohočetného myelomu (MM) a je indikována u pacientů do 65 let. Cílem sdělení je zhodnotit dlouhodobé výsledky ASCT v souboru 232 pacientů a analyzovat faktory významné pro prodloužení doby do progresu (TTP) a celkového přežití (OS). Metody: Bylo vyhodnoceno 232 pacientů se symptomatickým MM, kteří byli léčeni ASCT v rámci terapie první linie v letech 1995-2005, medián sledování od provedení ASCT byl 10,9 let (rozpětí 5,0-16,2 roku). Klinická stádia dle Durie-Salmona při zahájení léčby byla zastoupena takto: III – 73%, II – 17%, I – 10%; klinická stádia dle ISS: I – 45%, 2 – 41 %, 3 – 14%. Medián věku byl 55 let. Jako přípravný režim byl podán mefalan 200 mg/m² u 204 pac. (88%) a mefalan 100-140 mg/m² u 28 pac. (12%) s renální insuficiencí. K hodnocení léčebných odpovědí (kompletní remise -CR, velmi dobrá parciální remise -VGPR, parciální remise -PR, minimální odpověď -MR, stabilní onemocnění -SD, progresse -PD) byla použita standardní kritéria. Výsledky: Celková léčebná odpověď po ASCT byla 90% (202/232), 23% pac. dosáhlo CR, 45% VGPR, 22% PR, 10% MR nebo SD. Medián TTP od ASCT byl 30,8 měsíce, medián OS byl 71,9 měsíce. Přežití bez progresu/relapsu MM v 12 letech od ASCT bylo v různých kategoriích léčebných odpovědí následující: CR 41%, VGPR 11%, PR 10%. Celkové přežití v 12

letech od ASCT bylo následující: CR 51%, VGPR 28%, PR 17%. Dosažení CR je nejvýznamnější prognostický faktor pro TTP ($p < 0.001$) i OS ($p < 0.001$) po ASCT. Dle univariální analýzy jsou další faktory významné pro delší TTP tyto: jiný typ M-proteinu než IgA, věk při ASCT pod 60 let. Faktory významné pro delší OS jsou stádium ISS či DS jiné než III, věk při ASCT pod 60 let, nepřítomnost renální insuficience, nepřítomnost ztráty 1q21, terapie potransplantačního relapsu bortezomibem a lenalidomidem. Podle výsledků multivariální analýzy, faktory významné pro prodloužení celkového přežití jsou ISS stádium jiné než III ($p < 0.001$), věk pod 60 let v době ASCT ($p = 0.001$), léčba lenalidomidem v rámci potransplantačního relapsu ($p < 0.001$), dosažení CR po ASCT ($p < 0.001$). Závěr: ASCT je i nadále efektivní léčebná strategie u vhodných MM pacientů s vysokým počtem léčebných odpovědí (90%) a s mediány TTP a OS 31 měsíců a 72 měsíců. Dosažení a přetrvávání CR po ASCT je nejdůležitější prognostický faktor pro TTP i OS, pacienti v CR mají mediány TTP 61 měsíců a OS 153 měsíců.

2378.

Efficacy and Safety of 3 Lenalidomide-based Combinations in Elderly Newly Diagnosed Multiple Myeloma Patients: Participation of CMG on the EMN01 Trial (CMG 2010)

Hájek R., Pour L., Adamová D., Adam Z., Gregora E., Kessler P., Minařík J., Straub J., Ščudla V., Walterová L., Wróbel M., Maisnar V. (Česká myelomová skupina – Ostrava, Brno, Opava, Praha, Pelhřimov, Olomouc, Liberec, Nový Jičín, Hradec Králové)

Cyclophosphamide represents a valid alkylant alternative in combination with steroids and novel agents. No formal comparison between lenalidomide plus low-dose dexamethasone (Rd), melphalan-prednisone-lenalidomide (MPR) cyclophosphamide-prednisone-lenalidomide (CPR) combinations has been performed until now. Aims: To assess the efficacy and safety of the Rd vs MPR and CPR in MM not eligible to autologous transplantation. Methods: Pts with symptomatic MM were randomized (1:1:1) to Rd, MPR or CPR (Rd: lenalidomide 25 mg/day for 21 days; dexamethasone 40 mg on days 1, 8, 15 and 22 in pts 65-75 years old; MPR: lenalidomide 10 mg/day for 21 days; melphalan orally 0.18 mg/Kg for 4 days in pts 65-75 years old; prednisone 1.5 mg/Kg for 4 days; CPR: lenalidomide 25 mg/day for 21 days; cyclophosphamide orally 50 mg/day for 21 days in pts 65-75 years old; prednisone 25 mg eod). The primary endpoint was progression-free survival (PFS). Results: Between 10/2009 and 10/2012, 663 pts in two countries (39 from Czech Republic) were enrolled (Rd:222, MPR:218; CPR: 223). Pts. characteristics were well balanced; median age was 73 years in each arm; at data cut-off all pts had completed the 9 induction cycles. Median follow-up was 19 months. Partial response (PR) rate was similar in the 3 arms: 74%, 74% and 75% respectively in Rd, MPR and CPR group, including 35% very good partial response in Rd, 29% in MPR and 26% in CPR. A trend towards a higher complete response (CR) rate was noticed in the MPR group (12%), similar CR rate was reported in Rd (5%) and CPR (7%). The main hematological AE was neutropenia (Rd: 24%; MPR: 59%; CPR: 26%). At least 1 grade ≥ 3 non-hematological AE was observed in 25% of Rd pts, 29% of MPR pts and 22% of CPR pts. The most common grade ≥ 3 non-hematological AEs were infections (Rd: 6%, MPR: 9%, CPR:4%) and dermatological toxicities (Rd: 4%, MPR: 4%, CPR: 7%). Treatment discontinuations for toxicity were 7%, 12% and 12%. The main reason for treatment discontinuation was non-hematological toxicity in Rd (6%) and CPR (11%). Only 1% of pts stopped treatment for hematological AEs in Rd and CPR. In the MPR arm 7% of pts stopped treatment for hematological AEs and 5% for nonhematological AEs. Rate of toxic deaths was similar in the 3 arms (4% Rd, 4% MPR and 5% CPR). Conclusion: Rd, MPR and CPR produced similar RR. The main AEs were hematological, Non-hematological AEs were similar in the 3 groups

2381.

Výhody dlouhodobé léčby lenalidomidem u nemocných s relabujícím/refrakterním mnohočetným myelomem - výsledky analýzy dat z Registru monoklonálních gamapatií

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

Úvod: Ve dvou randomizovaných studiích fáze III (MM-009 a MM-010) byla prokázána významně delší doba do progresu a celkové přežití (OS) u pacientů s relabujícím/ refrakterním mnohočetným

u zdravých kontrol. Podobné výsledky byly získány u mononukleárních buněk kostní dřeně, mediány 3,2 u 5q- syndromu, 2,2 u nízkorizikových non5q- MDS a nejnížší 1,2 u zdravých kontrol. Rozdíly mezi všemi skupinami byly statisticky významné ($p < 0,05$; Mann-Whitney test). Analyzovali jsme hladiny CRBN mRNA před a v průběhu léčby MDS pacientů s 5q- syndromem. Vysoké hladiny CRBN mRNA před podáním lenalidomidu a v průběhu léčby odpovídaly vysoké účinnosti lenalidomidu a odpovědi na léčbu. U jedné MDS pacientky s 5q- syndromem, která se dostala do relapsu po přerušení úspěšné léčby, hladina CRBN mRNA prudce klesla. Tato pacientka neodpovídala na druhý běh léčby lenalidomidem a její onemocnění progrezovalo do RAEB II. Závěrem lze shrnout, že nízkorizikovi MDS pacienti s 5q- syndromem mají nejvyšší hladiny CRBN mRNA v porovnání s nízkorizikovými non5q- MDS a zdravými kontrolami. Vysoké hladiny CRBN mRNA jsou významným biomarkérem pro účinnost léčby lenalidomidem. Prudké snížení hladiny CRBN mRNA během léčby 5q- syndromu lenalidomidem je spojeno se ztrátou odpovědi pacientů na léčbu a s progresí nemoci. Podpořeno grantem IGA MZ ČR NT/13836-4/2012 a projektem MZ ČR na koncepční rozvoj vědecké organizace (ÚHKT Praha).

2350.

Effekt alogenní transplantace na dlouhodobé přežití u nemocných s Myelodysplastickým syndromem (MDS)

Čermák J., Vítek A., Lukášová M., Marková-Šťastná M., Cetkovský P. (*Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha*)

Analýza efektu alogenní transplantace (SCT) na dlouhodobé přežití byla provedena u 83 nemocných s MDS transplantovaných v letech 1987-2009. Výsledky byly porovnány s nálezy u 245 netransplantovaných nemocných. Analýza podskupiny nemocných s $\leq 5\%$ blastů ve dřeni neukázala významný rozdíl v průměrné délce přežití mezi skupinou 37 transplantovaných nemocných a 128 nemocnými léčenými pouze podpůrnou léčbou (SC) (84,2 v.s. 88,5 měsíce), nebyl přítomen ani rozdíl mezi pravděpodobností přežití 1 a 3 roky, statisticky významný rozdíl byl nalezen až v 5. letém a 10. letém přežití (51,4% pro SCT v.s. 25,8% pro SC). Příčinou je během let stoupající počet netransplantovaných nemocných umírajících na progresi choroby směrem k leukémii (28,9%) či na komorbiditě (19,8%), u transplantovaných nemocných nebyl pozorován relaps choroby. U nemocných s $> 10\%$ blastů ve dřeni byla průměrná doba přežití 27 transplantovaných nemocných 71,4 měsíce oproti 12,5 měsíce u 79 netransplantovaných ($p=0.002$), pouze 1,5% netransplantovaných nemocných přežívalo 10 let oproti 51,2% po SCT. Pravděpodobnost přežití 10 let byla u nemocných předléčených chemoterapií a transplantovaných s $< 10\%$ blastů ve dřeni 66,7% a incidence relapsů byla 22,0% oproti 33,3% relapsů u nemocných transplantovaných s $> 10\%$ blastů ve dřeni, kde 10 let přežívalo jen 22,2% nemocných. U nemocných s 6-10% blastů ve dřeni byla průměrná doba přežití po SCT jen 44,1 měsíce zejména díky vysoké peritransplantační mortalitě, nicméně SCT byla i u této skupiny nemocných jediným kurativním přístupem (pravděpodobnost přežití 10 let 26,7% u SCT v.s. 0% pro netransplantované). Dlouhodobá těžká komplexní porucha krvetvorby včetně alterace hemopoetického mikroprostředí je zřejmě příčinou neuspokojivých výsledků léčby u MDS s RAEB I. a je třeba hledat možné terapeutické využití nových léčiv (např. hypometylačních látek) u těchto nemocných.

2494.

Využitie 5-azacytidínu pred alogénnou trasnplantáciou krvotvorných kmeňových buniek u pacientov s MDS a CMML - prehľad.

Rohoň P., Faber E., Raida L., Jarošová M., Indrák K. (*HOK FN, Olomouc*)

2384.

Zkušenosti s terapií lenalidomidem u nemocných s Myelodysplastickým Syndromem a 5q- aberací

Jonášová A., Čermák J., Bělohávková P., Červíněk L., Černá O., Kačmářová K., Mužík J. (*I. interní klinika VFN, Praha; ÚHKT, Praha; FN, Hradec Králové; IHOK FN, Brno; FN Královské Vinohrady, Praha; Czech MDS group; IBA, Brno*)

Úvod. Prezентujeme naše první zkušenosti s lenalidomidem (Revlimid, Celgene) u nemocných s myelodysplastickým syndromem (MDS) s 5q- aberací. Lenalidomid je imunomodulačním prepa-

rátem, který má efekt antiangiogenní, antiapoptotický, inhibuje TNF-alfa, stimuluje T a NK buňky, produkci IL2, navíc zvyšuje senzitivitu erytroidních progenitorů k erytropoetinu a možný je též přímý cytotoxický efekt na buňky 5q- klonu. Použití lenalidomidu v terapii anemických nemocných s 5q- vede v cca 70% k erytrocytární odpovědi a transfuzní nezávislosti, kolem 40% nemocných dosáhne i cytogenetické kompletní remise. Pacienti a výsledky. V České Republice bylo od 2008 léčeno 20 nemocných s 5q-, 17 žen, 3 muži s mediánem věku 72 (51-80). Patnáct nemocných mělo diagnosu 5q- syndrom, 4 RCMD a 1 nemocná RAEB I. Co se týče cytogenetických změn, 19 nemocných mělo izolovanou 5q- aberaci, 1 5q-, t(2;11). Mutace P53 byla potvrzena u 5 z 10 testovaných. Medián doby od diagnózy k zahájení léčby byl 21 měsíců (3-180). 18 nemocných bylo závislých na transfuzích, 10 nemocných bylo refrakterních na erytropoetiny. Medián podaných cyklů byl 7 (1-36), medián sledování byl 18 měsíců (1-48). Všichni nemocní zahajovali terapii dávkou 10 mg 21 dní v 28 denním cyklu, dávky pak ale individuálně byly měněny podle odpovědi a výskytu vedlejších účinků. 19 nemocných bylo hodnoceno stran odpovědi (podle IWG kritérií 2006). Erytrocytární odpovědi bylo dosaženo u 18 pacientů (94%). Neodpověděl pouze nemocný s další chromozomální aberací. Jedna nemocná odpověděla až po přidání erytropoetinu. Zaznamenali jsme 3 kompletní cytogenetické remise (z 10 pacientů se známým výsledkem kontrolní dřeně). Medián k dosažení odpovědi byl 2 měsíce (1-6). Tři nemocní progredovali do MDS s vyšším rizikem/AML. Z nemocných s mutací P53 progredovali 2 do RAEB II (40%). Po 10 měsících terapie progredovala do AML také nemocná s RAEB 1. Nežádoucí účinky se vyskytly u 55,5% s převahou trombocytopenie, neutropenie, průjmů a kopřivky. Nikdo neukončil léčbu pro nežádoucí účinky. U 1 nemocné, u níž byla terapie ukončena po 7 cyklech (důvod byl přerušení hrzení léku VZP) trvá kompletní i cytogenetická odpověď 14 měsíců. Závěr. Lenalidomid je jistě velmi nadějným preparátem zvláště pro nemocné s 5q- izolovanou aberací. Naše výsledky byt malého vzorku dobře korelují s výsledky jiných studií, jak v potvrzení jeho největšího efektu u 5q- syndromu, nutnosti opatrnosti u nemocných s jinými aberacemi, blasty ve dřeni a mutací P53.

POSTEROVÁ ČÁST

NHL A CLL

P6/2307.

Akutní pankreatitida jako primomanifestace duodenálního MALT-lymfomu

Šimková I., Urbánek K., Procházka V., Konečný M., Gregar J., Geierová M., Táborský M. (*I.interní klinika -kardiologická, FN, Olomouc; Ústav farmakologie, FN a LF UP, Olomouc; II.interní klinika gastro-entereologická a hepatologická, FN, Olomouc; Ústav klinické a molekulární patologie, FN a LF UP, Olomouc*)

66-letá pacientka byla přijata na jednotku intenzivní péče pro známky akutní pankreatitidy. Vzestup jaterních testů s dominující anikterickou cholestázou vzbuzoval podezření na obstrukci žlučových cest. Elevace hladiny sérové amylázy a lipázy svědčila pro akutní afekci pankreatu. Abdominální ultrasonografií byla zobrazena dilatace intrahepatických žlučovodů, dilatace ductus pancreaticus na 4mm. Vzhledem k výše uvedeným nálezům bylo indikováno ERCP, které odhalilo exulcerovaný exofyt v místě Vaterovy papily, z něhož byla odebrána biopsie. Tumor infiltroval 2/3 obvodu duodena v oblasti D2 a vytvářel neprostopnou stenózu. V dalším diagnostickém algoritmu bylo doplněno CT břicha s kontrastem, potvrzující akutní pankreatitidu Balthazar B, CTSI 1. Vizualizovaný hlavní pankreatický vývod vzbuzoval podezření na maligní proces vycházející z hlavy pankreatu či maligní ampulom. K vyloučení obstrukce duodena pacientka podstoupila rentgenovou pasáž gastrointestinálním traktem. Malignita byla vysoce pravděpodobná, přestože ji výsledek histologického vyšetření neprokazoval. Z tohoto důvodu byla indikována gastroskopie s odběrem mnohočetných bioptických vzorků z D2 duodena. Histologické a imunohistochemické vyšetření odhalilo B-lymfom marginální zóny MALT-typu. V histologickém obraze byla evidentní infiltrace duodenální mukózy malými lymfoidními buňkami s patrnými lymfoepiteliálními lézemi. Maligní buňky vykazovaly CD 20 pozitivitu, zatímco CD3, CD5, CD 10, CD 23, CD 43 a cyklin D1 negativitu. Molekulárně biologické metody potvrdily klonalitu lymfomových buněk. K dostážování malignity bylo doplněno PET/CT. Značená glokóza byla při vyšetření akumulována nejen v zesílené stěně duodena, ale i ve zvětšené uzlině v oblasti jaterního hilu a jedné uzlině na mezenteriu. Byl stanoven mezinárodní prognostický index (IPI) 3. Při zvyklé terapii akutní pankreatitidy došlo po jedenácti dnech k odeznění klinické symptomatologie i úpravě laboratorních hodnot. Pacientka mohla být předána do péče hemato-onkologické kliniky, kde bylo provedeno podrobnější došetření včetně imunofenotypizace periferních a dřeňových lymfocytů a molekulárně biologických vyšetření. Vyšetření kostní dřeně vylučovalo lymfomovou infiltraci. Mikrobiologický screening vylučoval hepatitidu B, C, EBV, CMV. Antigen *Helicobacter pylori* ve stolici byl negativní. Po osmi měsících od stanovení diagnózy a absolvování kombinované imunochemoterapie podle protokolu R-CHOP bylo u pacientky dosaženo kompletní remise.

P12/2316.

Komplexní diagnostika pacientů s anaplastickým velkobuněčným lymfomem ALK pozitivním a sledování minimální reziduální nemoci

Kalinová M., Hliská I., Fejfarová J., Mrhalová M., Kodet R. (*Ústav patologie a molekulární medicíny, 2. LF UK a FN Motol; Praha*)

Anaplastický velkobuněčný lymfom (ALCL) patří do skupiny T lymfomů, kdy v případě ALK protein pozitivního ALCL dochází k patologické aktivaci onkogenu ALK, která je způsobena chromozomální translokací, při které vznikají fúzní geny s různými translokačními partnery. Nejčastěji nacházíme translokaci t(2;5), kdy dochází k fúzi s genem NPM. Cílem práce byla detekce nejčastějšího fúzního genu NPM/ALK. U pacientů bez prokázané fúze NPM/ALK bylo provedeno následné hledání translokačního partnera genu ALK pomocí metody 5' RACE. Zavedli jsme kvantitativní detekci exprese translokované části genu ALK, která sloužila nejen k diagnostice všech ALK pozitivních ALCL, ale také ke sledování minimální reziduální nemoci. Výsledky jsme porovnávali s výsledky imunohistochemického průkazu (IHC) exprese proteinu ALK a jeho lokalizace v buňce a dále s výsledky fluorescenční in situ hybridizace na interfázických jádrech (I-FISH). Celkem jsme vyšetřili 50 pacientů s ALCL (3-80 let; medián 18 let) s IHC prokázanou expresí proteinu ALK. U 47 pacientů bylo provedeno vyšetření zlomu chromozomu 2, oblasti 2p23 a ve všech případech byl detekován zlom. Ve 35/50 případech jsme detekovali fúzní gen NPM/ALK (70%), v 5 případech ATIC/ALK, ve dvou případech CLTC/ALK, 1x jsme detekovali TPM4/ALK, resp. TPM3/ALK, resp. ALO17/ALK. U 5 pacientů NPM/ALK negativních, ALK protein pozitivních jsme neměli dostatek materiálu (RNA)

pro následné vyšetření metodou 5' RACE. U všech vyšetřených pacientů (48) jsme detekovali vysokou hladinu exprese translokované části genu ALK IHC s mediánem 28326 kopií, kterou jsme u 21 pacientů ALK pozitivního ALCL využili ke sledování minimální reziduální nemoci (MRN) bez ohledu na přítomný fúzní gen v době diagnózy. Hladina MRN korelovala s klinickým průběhem onemocnění. Molekulární diagnostika umožňuje detekovat translokační partnery genu ALK u ALK pozitivního ALCL. Zavedení kvantitativní detekce exprese translokované části genu ALK slouží jak k diagnostice ALK pozitivních ALCL, tak převážně ke sledování minimální reziduální nemoci. Posouzení vlivu jednotlivých translokací na klinický průběh onemocnění vyžaduje klinickou studii, která by v rámci mezinárodní spolupráce přispěla k rozšíření souboru pacientů s vzácným onemocněním ALK pozitivního ALCL. Podpořeno projektem (Ministerstva zdravotnictví) koncepčního rozvoje výzkumné organizace 00064203 (FN MOTOL) a OPVK CZ.2.16/3.1.00/24022.

P16/2328.

Kombinácia bortezomibu s rituximabom v liečbe relabujúceho folikulového lymfómu (skúsenosti jedného pracoviska v rámci klinickej štúdie LYM-3001)

Wild A., Králiková E. (*Hematologické odd., FN sP F.D. Roosevelta, Banská Bystrica – SK*)

ÚVOD A METODIKA. Randomizovaná, multicentrická štúdia fázy 3 klinického skúšania LYM-3001 porovnávala kombináciu bortezomibu a rituximabu so sólo rituximabom v liečbe 676 pacientov s relapsom folikulového lymfómu. Liečba rituximab-bortezomib viedla k dlhšiemu prežívaniu bez progresie ako samotný rituximab. Schéma liečby: Rituximab-bortezomib: bortezomib 1,6 mg/m² v dňoch 1, 8, 15 a 22 každých 5 týždňov, 5 cyklov; rituximab 375 mg/m² v dňoch 1, 8, 15 a 22 v cykle 1, a len v 1. deň v cykloch 2-5. Rituximab sólo: rituximab 375 mg/m² v dňoch 1, 8, 15 a 22 v cykle 1 a v deň 1 v cykloch 2-5. **VÝSLEDKY:** Na našom pracovisku boli do klinickej štúdie LYM-3001 zaradení 4 pacienti, 2 ženy a 2 muži. 3 pacienti (2 ženy a 1 muž) vo veku 39 – 53 rokov boli randomizovaní do ramena rituximab-bortezomib. V tejto skupine pacientov bola len u 1 pacientky zaznamenaná toxicita v zmysle hnačiek, senzitivnej polyneuropatie (stupeň 2) a neutropénie (stupeň 4), u 1 pacienta herpes zoster. 1 pacientka stolerovala liečbu bez komplikácií. U všetkých troch bola dosiahnutá parciálna remisia ochorenia. Všetci prežívajú 5-6 rokov po ukončení liečby bez progresie, trvanie remisie je dlhšie ako po predchádzajúcich líniiach liečby. Jeden 70-ročný pacient bol randomizovaný do ramena so sólo rituximabom, u tohto pacienta bola pomerne rýchlo zaznamenaná progresia ochorenia s fatálnym priebehom. **ZÁVER:** Dostupnosť liečby rituximab - bortezomib mimo klinickej štúdie by zlepšila prežívanie minimálne časti pacientov s relapsujúcim folikulovým lymfómom.

P26/2357.

The Cell Cycle Deregulation and Mantle Cell Lymphoma

Flodr P., Látalová P., Tichý M., Jarošová M. (*ÚKMP, LF UP a FN, Olomouc; HOK, FN a LF UP, Olomouc*)

Introduction: Mantle-cell lymphoma (MCL) is a subtype of clinical indolent or aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma (B-NHL) also with variable architectonic and cytological features. MCL accounts for app. 6% of all lymphoid neoplasms with a median survival of 3 to 4 years. Characteristic genetic hallmark of MCL is the chromosomal translocation t(11;14)(q13;q32) with the dysregulation of cyclin D1. Additional genetic alterations can occur in a subset of MCL - cyclin D1 upregulation, genomic amplification of the cyclin-dependent kinase (CDK) -4, deletions of the CDK inhibitor p16(INK4a) and overexpression of BMI-1 that are associated with dysregulation of the cell cycle mechanism in MCL and reveal the biological heterogeneity of MCL. **Material and Methods:** Formaline-fixed and paraffin-embedded tissues have been processed in routine tissue sections (app. 5µm) and placed on plus-slides. After the antigen retrieval with the use of the enzymatic process or microwave oven process, indirect immunohistochemistry with commercial available primary antibodies for particular detected protein in optimised dilution has been processed – cyclin D1, D2, D3 and SOX11. For the visualisation secondary antibody with standard avidin-biotin (ABC) method has been applied. **Results:** In the recent pilot MCL's study (n=8) we evaluate the expression of cyclin D1, D2, D3 and SOX11 with nuclear positivity of cyclin D1 (n=3), D2 (n=7), D3 (n=0) and SOX11 (n=0). **Conclusions:** Currently extended file (n=20) is being sorted according the same design and we expect at least the analogous expression heterogeneity of cyclin D family in MCL's

cases. SOX11 is considered to be highly sensitive marker for MCL (up to 93% cMCL, up to 100% cyclin D1-neg. MCL) but at present we haven't detected (n=8) any positivity even in cyclin D1 low expressing MCL (n=5). To confirm the sensitivity of SOX11 expression in MCL we set an extension of MCL's file (n=20). **Acknowledgements:** MSM 6198959205, IGA NT11103 and Leukemia and Lymphoma Research Fund.

P38/2374.

DA EPOCH R u pacientů s primárním mediastinálním velkobuněčným B lymfomem

Paličková M., Mociková H., Gahérová L., Jankovská M., Kozák T. (*Interní hematologická klinika, FN Královské Vinohrady a 3.LF UK, Praha*)

Úvod: Primární mediastinální velkobuněčný B-lymfom (PMBL) se odlišuje od difúzního velkobuněčného B-lymfomu (DLBCL) klinicky, genotypem a imunofenotypem. Standardní léčbou je R CHOP s nebo bez radioterapie. Prognóza pacientů s PMBL je obvykle lepší než u DLBCL, ale část pacientů s PMBL progreduje již v průběhu prvoliniové léčby nebo časně relabuje s následnou rezistencí na zachrannou léčbu. Použití agresivnějších léčebných režimů je nadále nejasné a zvažuje se jejich podání na základě prognostických faktorů, ke kterým se řadí šíření na přilehlé hrudní orgány, pleurální a perikardiální výpotky, performance status (PS)>1, LDH>2 násobek normy, věk > 40 let. Ve sdělení uvádíme první zkušenosti s podáním režimu DA EPOCH R („dose-adjusted“ etoposid, prednison, vincristin, cyklofosamid doxorubicin a rituximab). **Pacienti a metody:** U 3 pacientů (1 žena 66 let a 2 muži oba 32 let) jsme nově diagnostikovali PMBL se syndromem horní duté žíly. Z výše uvedených rizikových faktorů jsme zjistili u ženy vyšší věk a PS 2, u mužů tyto faktory nebyly přítomny. Pacientům byl podán DA EPOCH R á 21 dní cestou centrálního žilního katétru (u pacientky byl vstupně podán 1 cyklus R CHOP). Navyšování dávky DA EPOCH R ve 2. až 6. cyklu bylo provedeno podle protokolu a s ohledem na toxicitu. **Výsledky:** Dva pacienti byli léčeni pěti a šesti cykly DA EPOCH R bez radioterapie s trváním kompletní remise 15 a 6 měsíců po ukončené léčbě. U třetího pacienta nebyla zatím odpověď hodnocena z důvodu pokračování v léčbě. Z komplikací se vyskytl 1x pneumothorax při zavádění centrálního žilního katétru. Z hematologické toxicity se vyskytla neutropénie gr.4 u dvou pacientů bez infekční komplikace a anémie gr.3 u jednoho pacienta. Z nehematologické toxicity se vyskytla periferní senzitivní polyneuropatie gr.1. **Závěr:** DA EPOCH R je účinná léčba u PMBL s přijatelnou toxicitou. Jeho výhodou je možnost navyšování dávek chemoterapie podle toxicity, nevýhodou je nutnost podání cestou centrálního žilního katétru. Postavení DA EPOCH R u PMBL je nutné vyhodnotit v randomizovaných studiích ve srovnání se standardní léčbou R CHOP. Podpořeno z výzkumného projektu P 27/2012 Univerzity Karlovy, 3. Lékařské fakulty v Praze.

P50/2429.

Reaktivace vybraných p53 mutantů u B-buněčných nádorových linií prostřednictvím malých cílených molekul

Jašková Z., Šebejová L., Pospíšilová Š., Trbušek M. (*CEITEC, Brno; CMBGT, IHOK, FN, Brno*)

Background: The transcription factor p53 has an essential role in guarding the cell from genotoxic stress. Mutated p53 frequently accumulates in cancer cells and it has been shown that molecular manipulation can lead in some cases to p53 reactivation to its wt conformation. The prognosis of patients with p53 mutations is especially poor in hematological malignancies. **Aims:** To assess a feasibility of mutated p53 reactivation in B-cell lines using commercially available small molecules. **Methods:** The following cell lines expressing high level of mutated p53 protein were used: RAMOS (BL; I245D; 17p-); RAJI (BL; R213; ts Y234H); SU-DHL-4 (DLBCL; R273C; 17p-). PRIMA-1 and ellipticine were used as reactivation agents. The reactivation was tested at the p53 protein level by western blot (WB) and at p53 downstream pathway by qRT-PCR. **Results:** In all three cell lines, both PRIMA-1 and ellipticine affected cellular viability in a concentration-dependent manner. Time-dependent effect was more apparent in the case of ellipticine. Using WB, PRIMA-1 reduced mutated p53 protein level at two highest concentrations after 24 h in RAMOS cells. In RAJI cell line the reduction of mutated p53 protein level was obvious only at 30 °C; the two highest concentrations again led to disappearance of mutated p53, prominently after 72 h as well as in the case of SU-DHL-4. For ellipticine, WB was also performed and in RAMOS the most pronounced effect was observed at

highest concentration after 6 and 12 h. In RAJI, the reduction of mutated p53 was subtle at both 37 °C and 30 °C. Using PRIMA-1, RAMOS cells was inert to any reactivation concerning the induction of p53 downstream target genes. In RAJI, we observed a subtle induction (up to 350% compared to untreated control set at 100%) of p21 and PUMA. In SU-DHL-4 there was a clear induction (620%) of p21, but only at a single time interval. Regarding ellipticine, we observed subtle induction of BAX in RAJI and no gene induction in RAMOS. Summary/Conclusions: We showed that the small targeted molecules can manipulate with mutated p53 protein in cancer B-cells leading to mutated p53 reduction (clinically highly desirable due to predicted mutated p53 oncogenic gain of function) and to induction of cell cycle regulatory and proapoptotic genes. Further experiments will be performed to understand deeply exact mechanisms standing behind these effects. Supported by NT/13519-4/2012; MUNI/A/0723/2012.

P54/2459.

Molekulární cytogenetika v detekci nové translokace t(2;14)(p14;q32) u nemocné s CLL. Kazuistika

Krůzová L., Holzerová M., Mičková P., Reptová S., Kropáčková J., Prekopová I., Hanzlíková J., Pikalová Z., Urbanová R., Papajik T., Indrák K., Jarošová M. (*Hemato-onkologická klinika, FN a LF UP, Olomouc*)
Úvod: Chronická lymfocytární leukemie (CLL) je nejčastější leukemií dospělého věku na západní polokouli a vyznačuje se heterogenním průběhem s přežitím od několika let až po desítky let. Určení prognózy nemocných se opírá o klinické stážování rozsahu postižení a laboratorní výsledky, kde významnou roli hraje cytogenetika. Kromě chromozomových změn se známým prognostickým významem, jako jsou delece 6q, 11q, 13q a 17p určených rutinním molekulárně cytogenetickým vyšetřením, nalézáme u nemocných s CLL i další méně časté chromozomové aberace. K takovým patří chromozomové translokace zahrnující gen pro těžký řetězec imunoglobulinu (IgH). Na základě analýzy velkých souborů nemocných bylo prokázáno, že translokace zahrnující IgH je spojena s nepříznivou prognózou a pokročilým stádiem onemocnění. Popis případu: Předkládáme kazuistiku 63ti leté pacientky s diagnózou CLL, Binet C. V době diagnózy bylo v periferní krvi celkem 50,70x10⁹/l leukocytů, z toho 70 % patologických B-lymfocytů, které byly CD19+, CD20+, CD23+, CD38+ a CD5+. Cytogenetickým vyšetřením byl prokázán normální karyotyp a jedna metafáze s neklonální změnou: 46,XX,der(2p),add(14q)[1]. Metodou FISH se sondami Abbott Molecular (LSI ATM/TP53, LSI 13q14/13q34/cep12) a Kreatech (ON IgH, ON 6q21/MYC (8q24) byla prokázána delece 13q14 (66 %) ve dvou klonech, v jednom společně s přestavbou genu IgH (14%). Metodou metafázni FISH byla prokázána dosud nepopsaná translokace t(2;14)(p?14;q32). Detailním mapováním bylo vymezeno zlomové místo v oblasti o velikosti 500 kbp s kandidátními geny SERTAD2 (transkripční regulátor) a SLC1A4 (transport glutamátu/neutrálních AMK). Pacientka byla pro aktivní chorobu a autoimunitní hemolýzu léčena 2 cykly chemoterapie R-CHOP, díky které bylo dosaženo stabilizace onemocnění a vymizení známek hemolýzy. Pacientka je aktuálně 18 měsíců od stanovení diagnózy. Recidivují infekce s nutností substituce hypogamaglobulinémie. Závěr: U nemocné s CLL jsme odhalili dosud nepopsanou translokaci t(2;14) a detailním mapováním jsme identifikovali zlomové oblasti chromozomu 2 s kandidátními geny SERTAD2 a SLC1A4. Tento výsledek potvrzuje význam zařazení sondy pro určení přestavby genu IgH do rutinního panelu sond pro vyšetřování CLL. Prognostický význam nelze, vzhledem ke krátké době sledování nemocné, zatím hodnotit. Práce je podporována grantem IGA NT 13576 a grantem LF 2013-004.

P55/2460.

Dráha Wnt/PCP ovlivňuje kromě patogeneze chronické lymfocytární leukemie i vývoj B-lymfocytů
Mádrová H., Poppová L., Plevová K., Janovská P., Kaucká M., Borský M., Machač J., Šlapák I., Bryja V., Pavlová Š., Pospíšilová Š. (*CMBGT, Interní hematologická a onkologická klinika, FN, Brno; CEITEC, MU, Brno; Ústav experimentální biologie, PřF MU, Brno; Oddělení cytokinetiky, Biofyzikální ústav, AV ČR, Brno; Oddělení dětské otorinolaryngologie, FN a LF MU, Brno*)

Dráha PCP (planar cell polarity), nekanonická Wnt dráha, řídí buněčnou polarizaci, migraci a morfogenezi během embryonálního vývoje. Její deregulace je spojená s vývojovými poruchami a metastázováním nádorů. Nedávno jsme publikovali informaci, že exprese klíčových proteinů PCP dráhy je zvýšená u chronické lymfocytární leukemie (CLL), jejich hladina koreluje se stádiem onemocnění a prognózou pacienta (Kaucká M a kol. Cancer Res 2013). Funkčními testy in vitro a in vivo jsme

prokázali, že PCP dráha je nezbytná pro migraci CLL lymfocytů v chemokinovém gradientu. Je známo, že buňky CLL využívají mechanismy fyziologického zrání B-lymfocyty a imunitní odpovědi, význam PCP dráhy ve vývoji zdravých B-lymfocytů nebyl ale dosud popsán. Proto jsme v B-lymfocytech, které jsme získali z tonsil odebraných během rutinních zákroků, analyzovali expresi PCP genů metodou kvantitativní PCR v reálném čase. Ve srovnání s periferními B-lymfocyty jsme zjistili zvýšenou expresi Wnt5a, Fzd7, Celsr1 a Vangl2. Abychom určili, jak se mění exprese PCP dráhy během vývoje lymfocytu v lymfoidních orgánech, oddělili jsme sortováním pomocí FACS (barvení anti-IgD/CD38) jednotlivá vývojová stadia tonsilárních B-lymfocytů a srovnali expresi PCP genů v jednotlivých frakcích. Výsledky měření kvantitativní PCR v reálném čase ukazují, že proteiny PCP dráhy jsou regulovány během vývoje B-lymfocytů v germinálním centru. Projekt je podporován granty: IGAMZČRNT11217-5, GAČR301/11/0747, MŠM0021622430, ERDF CZ.1.05/1.1.00/02.0068, CZ.1.07/2.3.00/20.0045, MUNI/A/0723/2012, MPOFRTI2254.

P56/2461.

Metodou RT-qPCR k predikci vývoje chronické lymfocytární leukémie (CLL)

Jurčíčková Z., Mádrová H., Libra A., Plevová K., Tichý B., Bryja V., Pospíšilová S. (*GENERI BIOTECH s.r.o., Hradec Králové; CEITEC, Masarykova Univerzita, Brno; LF MU, Brno; Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita, Brno*)

Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je onemocněním B-lymfocytů a její průběh je velmi heterogenní. Prognózu onemocnění lze stanovit na základě analýzy mutační varianty genu pro variabilní oblast těžkého řetězce imunoglobulinu (IGHV), což je metoda poměrně časově náročná. Prognóza je příznivější u pacientů s mutovaným IGHV, zatímco nemutovaný IGHV značí horší prognózu onemocnění. S výsledkem mutační analýzy IGHV (predikce prognózy onemocnění) významně koreluje exprese vybraných molekulárních biomarkerů v B-lymfocytech. Ve spolupráci GENERI BIOTECH a Masarykovy Univerzity v Brně byl vyvinut diagnostický kit, který slouží k predikci vývoje CLL a je založen na metodě real-time PCR v kombinaci s reverzní transkripcí. Byla vyvinuta metoda stanovení kombinovaného parametru složeného z údajů o expresi jednotlivých molekulárních biomarkerů a referenčních genů. Experimentálně byla ověřena jeho prognostická účinnost. Analýza probíhala na souboru vzorků 118 pacientů a výsledek byl korelován s mutačním statutem IGHV. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí ROC analýzy (popisuje vztah senzitivity a specifčnosti laboratorního testu při různých hodnotách cut-off), přičemž výsledkem byla vysoká senzitivita i specifita. S ohledem na rozdílné metody zpracování vzorků periferní krve v diagnostických laboratořích byl hodnocen také vliv zpracování vzorků třemi různými metodami (osmolýza, gradientová centrifugace a gradientová centrifugace s deplecí T-lymfocytů) na výsledek zařazení pacienta do prognostické skupiny. Výzkum byl finančně podpořen granty MPO FR-TI2/254 a IGAMZČR NT/13493

P59/2464.

Význam imunoglobulinového receptoru u folikulárního lymfomu

Brázdilová K., Plevová K., Šupíková J., Janíková A., Hanke I., Křen L., Tichý B. (*CEITEC, Masarykova Univerzita, Brno; CMBGT, Interní hematologická a onkologická klinika, FN a LF MU, Brno; Ústav patologie, FN a LF MU, Brno; Chirurgická klinika, FN a LF MU, Brno*)

Řada lymfomů a leukémií odvozených od B-lymfocytů si zachovává schopnost exprese funkčního imunoglobulinového (IG) receptoru na povrchu nádorových buněk, což se jeví jako rozhodující vlastnost pro jejich růst a přežívání. Přesná úloha IG receptoru ale u většiny lymfomů stále nebyla objasněna. Exprimované IG geny lymfomů germinálního centra (jako je např. folikulární lymfom) získávají prostřednictvím somatických hypermutací N-glykosylační motivy, které jsou pozitivně selektovány. Jejich výskyt je u těchto onemocnění až desetkrát vyšší než u zdravých B-lymfocytů nebo jiných typů lymfoproliferativních onemocnění. N-glykosylační místa a oligomanózy, které se do nich vážou, by tak mohly představovat nový slibný terapeutický cíl a schůdnější alternativu antiidiotypických protilátek. Cílem naší práce bylo zjistit, zda jsou některé IG segmenty u folikulárního lymfomu využívány častěji, než je běžné u B-lymfocytů a dále identifikovat a charakterizovat N-glykosylační motivy v sekvencích exprimovaných klonálních IG genů folikulárního lymfomu. Tyto sekvence jsme analyzovali v 68 lymfatických uzlinách postižených folikulárním lymfomem u 61 pacientů. U 6 pacientů jsme vyšetření provedli opakovaně. Zjistili jsme preferenční využívání určitých variabilních IG segmentů (IGHV3-48, IGHV3-73), které by mohlo být spojeno s vyšší predispozicí pro tvorbu N-

-glykosylačních motivů v těchto segmentech. 1 až 3 N-glykosylační motivy jsme detekovali u 30 z 38 (80 %) analyzovaných IG těžkých řetězců. V 63 % případů se nacházely v jedné ze tří konkrétních preferovaných aminokyselinových pozic. Naše práce tímto potvrzuje význam N-glykosylačních míst pro folikulární lymfom. Projekt je podporován z grantů: MUNI/A/0723/2012, IGA MZCR NT13493-4/2012, CZ.1.05/1.1.00/02.0068, CZ.1.07/2.3.00/20.0045.

P62/2473.

Úspěšná terapie cladribinem pacientky se souběhem HCL a CLL

Skoumalová I., Urbanová R., Procházka V., Novák M., Pikalová Z., Papajík T., Indrák K. (HOK, FN, Olomouc)

Referujeme raritní případ pacientky se souběhem chronické lymfocytární leukémie a vlasatobuněčné leukémie. 10/2004 byla u 58 leté pacientky diagnostikována vlasatobuněčná leukémie (HCL). Vzhledem k uspokojivým parametrům krevního obrazu a dobrému klinickému stavu byla pacientka observována. Postupně vývoj lymfocytózy a progresi neutropenie, proto 6/2011 byla provedena kontrolní imunofenotypizace periferní krve a trepanobiopsie. Kromě HCL byla souběžně u nemocné diagnostikována B-chronická lymfocytární leukémie (CLL), prognostické faktory: normální cytogenetika a nemutovaný stav IgVH. Pro pozvolnou progresi neutropenie, vývoj anémie a B symptomy byla pacientka indikována k zahájení terapie. Od 5/2012 proto rozhodnuto o zahájení terapie cladribinem, modifikovaný protokol cladribinem pro CLL dle Robaka (cladribin 8 mg/D s.c. celkem 5 dnů). Podáno bylo celkem 6 cyklů terapie á 28 dnů. Terapie byla dobře tolerována, průvodní cytopenie byly řešena podáním růstových faktorů, významnější infekční komplikace se neobjevily. Dosaženo kompletní remise CLL a HCL v kostní dřeni. Pacientka je aktuálně v dobrém klinickém stavu v trvalé remisi onemocnění. Podrobná klinická data budou předmětem prezentace. Podpořeno grantem IGA UP LF-2013-004.

P63/2474.

Cytogenetická analýza u CLL: záchyt chromosomových aberací po stimulaci CLL buněk s CpG oligonukleotidy a IL-2

Stoklasová M., Dostálová L., Šablaturová T., Strnková A., Dřevojánková B., Burdová A., Brychtová Y., Brejcha M. (Laboratoř lékařské genetiky, Laboratoře Agel a.s., Nový Jičín; Interní hematologická klinika, LF MU a FN, Brno; Hematologické oddělení, Nemocnice Nový Jičín a.s.)

Úvod: CLL buňky jsou vysoce závislé na interakcích se svým mikroprostředím a pokud nejsou kultivovány in vitro s přidavkem vhodných cytokinů a mitogenů, velmi rychle podléhají apoptóze. Jako nejefektivnější metoda se osvědčilo použití specifického protokolu s CpG-oligonukleotidy (DSP30) a IL-2 (Diecker et al, 2006, Mayr et al, 2006, Haferlach et al, 2007). Pacienti a metody: Klasická cytogenetická analýza (CCA) a molekulárně-cytogenetické metody zahrnovaly (FISH, M-FISH, M-BAND) soubor 552 pacientů (212 žen/340 mužů) z let 2008-2012. Karyotyp byl stanoven ze vzorků periferní krve nebo kostní dřeni kultivované v přítomnosti DSP30/IL-2. Na nestimulovaných kulturách byla provedena I-FISH za použití standardního CLL panelu sond (tj. 13q-, 11q-, 17p-, +12). Výsledky: Úspěšně bylo kultivováno 93% (512/552) vzorků. CCA odhalila změny v karyotypu u 51% (262/512) a I-FISH u 73% (371/512) případů. Kombinací obou metod byly chromosomové aberace zachyceny v 79% (405/512) případů. Frekvence výskytu aberací zachycených pomocí CCA byly následující: normální karyotyp (28%), 13q- (14%), 11q- (12%), +12 (11%) a 17p- (6%) a v 18% případů byly zaznamenány další rekurentní aberace (např. zisk 2p, 6q-, 14q-, +21, přestavby IGH@). Komplexní změny v karyotypu byly prokázány v 22% (111/512) případů. CCA byly zjištěny další chromosomové aberace v 7% (34/512) případů s negativním I-FISH nálezem, z toho 6 případů mělo komplexní karyotyp. U 14% (71/512) případů, u nichž I-FISH identifikovala pouze 13q-, byly prokázány další chromosomové změny (v 31 případě se jednalo o komplexní karyotyp). Závěr: Kultivace CLL buněk v prostředí DSP30 a IL-2 je efektivní metoda nejen k indukci metafází, ale i k detekci dalších chromosomových změn u nemocných s CLL v rutinní praxi. Získáním hodnotitelných mitos lze objasnit mechanismus vzniku aberací a potvrdit hraniční nálezy z I-FISH vyšetření. Kombinace metod klasické cytogenetiky a FISH analýzy poskytuje komplexní informace o změnách v karyotypu CLL buněk, což může v budoucnu posloužit k detailnější kategorizaci a definování dalších nezávislých prognostických faktorů.

P66/2493.

Úspěšná kombinace splenektomie s následnou imunosupresivní terapií u refrakterní trombocytopenie pacienta s chronickou lymfocytární leukémií

Turcsányi P., Urbanová R., Hluší A., Papajík T., Indrák K. (HOK, FN, Olomouc)

Úvod: Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je nejčastější hematologickou malignitou s heterogenním klinickým průběhem, doprovázeným variabilními autoimunitními komplikacemi. Referujeme efektivní léčbu autoimunitní trombocytopenie splenektomií a kombinovanou imunosupresí. Při rozhodování o postupu bylo využito výsledku „přežívání trombocytů“ značeným radiofarmakem. Kazuistika: 3/2007 byla tehdy 59 letému muži diagnostikována chronická lymfocytární leukémie, stádium Binet C, IgVH status nemutovaný, normální karyotyp, difúzní typ infiltrace kostní dřeni. Krevní obraz: leukocyty (leuko)226 x 10⁹/l, hemoglobin (Hb) 128 g/l, trombocyty (Tr) 82 x 10⁹/l. Byla zahájena terapie fludarabinem 40 mg/m² p.o. 1-3 den, cyklofosfamidem 250 mg/m² p.o. 1-3 den. Po prvním cyklu chemoterapie došlo k rozvoji autoimunitní hemolytické anémie (AIHA) s tepelnými protilátkami (Hb 53g/l). Byla podána terapie vysocedávkovanými (HD) kortikoidy bez efektu. Pokračováno proto imunochemoterapií R-CHOP. Po 6 cyklech CHOP a terapii alemtuzumabem s celkovou dávkou 273 mg bylo dosaženo kompletní klinické remise onemocnění 9/2007. 03/2010 a 08/2010 recidivy těžké trombocytopenie (Tr < 10x10⁹/l). Sonograficky velikost sleziny 17,5 cm, v kostní dřeni 50% patologických CLL, diagnostikován relaps CLL. Terapie HD kortikoidy a HD imunoglobuliny s přechodným efektem, udržovací terapie cyklosporinem A, kortikoidy a 4 cykly rituximabu (R). Pacient byl přeléčen pro reaktivaci borreliózy. 6/2011 další recidiva trombocytopenie, 3 cykly R-COP a 5 cyklů rituximabu do 1/2012, udržovací terapie prednisonem a cyklosporinem A, léčba pouze s částečným efektem, komplikováno dekompenzací steroidního diabetu, renální insuficiencí a dekompenzací hypertenze. Bylo provedeno vyšetření přežívání trombocytů, které zkráceno na 1,5 dne se zvýšenou sekvestrací ve slezině. Pacient byl pro refrakteritu těžké trombocytopenie indikován ke splenektomii, ta provedena 9/2012, pro nedostatečný efekt dále nasazeny kortikoidy a azathioprim, bylo dosaženo remise trombocytopenie. 1/2013 při poslední kontrole trvalá remise trombocytopenie, pacient bez známek aktivity CLL. Závěr: Referujeme případ úspěšné terapie refrakterní autoimunitní trombocytopenie u CLL kombinovanou léčbou splenektomií a následnou imunosupresivní terapií. Podpořeno Výzkumným záměrem MŠMT MSM-6198959205, grantem LF-2013-004 UP v Olomouci.

P67/2495.

Včasná alogenní nepříbuzenská transplantace periferních kmenových buněk u fludarabin refrakterní CLL s komplexním karyotypem.

Obr A., Urbanová R., Faber E., Raida L. (HOK, FN, Olomouc)

AKUTNÍ LEUKEMIE

P15/2322.

Zhodnocení sérových koncentrací vybraných cytokinů a adhezních molekul u pacientů léčených pro akutní myeloidní leukémii

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

Cíl: Zhodnotit sérové koncentrace vybraných cytokinů a adhezních molekul a posoudit změny související s aktivitou onemocnění u pacientů léčených pro AML. Metodika: Byl studován soubor 20 pacientů, věk $53,5 \pm 11,8$ let, medián 55,4 let, 7 mužů a 13 žen, 4 s nízkým, 7 se středním a 9 s vysokým rizikem dle cytogenetického a molekulárně-genetického vyšetření. Pacienti byli léčeni chemoterapií (3+7, 2+5, HiDAC), u 5 nemocných v kombinaci s léčbou FLAG-Ida, přípravný režim Bu/Flu/ATG a provedením alogenní transplantace krvetvorných buněk. Hodnotili jsme sérové hladiny celkem 22 analytů: interleukiny (IL) 1 α , 1 β , 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 23, vascular endothelial growth factor (VEGF), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon-gama (IFN- γ), epidermal growth factor (EGF), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), E-selektin, L-selektin, P-selektin, intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1 v době diagnózy AML a při trvalé kompletní remisi (CR) cca 6 měsíců po ukončení chemoterapie. Biomarkery byly stanoveny s využitím biochip array technologie a analyzátoru Evidence Investigator (Randox). Pravděpodobnosti s (p) < 0,01 dle párového t-testu byly považovány za statisticky významné. Výsledky: Porovnáním sérových koncentrací analytů mezi obdobím s aktivní leukémií a trvalé CR jsme zjistili statisticky významný vzestup u IL-7 ($6,43 \pm 4,91$ ng/l vs. $21,36 \pm 7,72$ ng/l; $p < 0,00005$), EGF ($17,52 \pm 16,01$ ng/l vs. $48,66 \pm 28,15$ ng/l; $p < 0,0001$) a VEGF ($65,48 \pm 41,33$ ng/l vs. $158,92 \pm 60,75$ ng/l; $p < 0,0005$). Koncentrace L-selektinu ($2430,93 \pm 1032,85$ mcg/l vs. $1340,15 \pm 308,27$ mcg/l; $p < 0,0005$) a IL-13 ($6,97 \pm 3,41$ ng/l vs. $4,02 \pm 4,02$ ng/l; $p < 0,01$) statisticky významně poklesly. Změny v sérových koncentracích ostatních analytů nebyly statisticky významné. Závěr: Sérové koncentrace některých cytokinů a adhezních molekul (IL-7, EGF, VEGF, L-selektin, IL-13) jsou ovlivněny aktivitou onemocnění. Zda lze tyto změny považovat za prognostický marker u AML není známo, k hodnocení prediktivního potenciálu bude třeba korelace se zavedenými prognostickými ukazateli (cytogenetika, molekulární genetika) na větším počtu pacientů. Práce byla podpořena prostředky z Projektu specifického výzkumu „Analýza vybraných prognostických markerů u nemocných s AML“ (FVZ) a z projektu RO 1011 (FVZ). Kontakt: Tom.Kupsa@fnhk.cz

P21/2346.

Sérové koncentrace cytokinů a adhezních molekul u pacientů s nově diagnostikovanou akutní lymfoblastickou leukémií

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

Úvod: Cytokiny a adhezní molekuly jsou studovány jako markery aktivity imunitního systému u různých chorob včetně hematologických malignit. Cílem naší pilotní studie bylo porovnání sérových koncentrací vybraných cytokinů a adhezních molekul u pacientů s nově dg. akutní lymfoblastickou leukémií (ALL) před zahájením léčby a u zdravých jedinců. Metodika: Do studie bylo zařazeno 15 pacientů s nově dg. ALL (medián věku 46, rozptyl 24 – 63 let, 11 mužů) a 15 zdravých dárců krve (medián věku 41, rozptyl 25–58 let, 11 mužů). Hodnotili jsme sérové koncentrace 22 cytokinů a adhezních molekul: interleukiny (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-23), vascular endothelial growth factor (VEGF), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon-gamma (IFN- γ), epidermal growth factor (EGF), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), E-selektin, L-selektin, P-selektin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). Všechny biomarkery byly měřeny biočipovou technologií na principu enzymoimunoanalýzy s chemiluminiscenční detekcí na analyzátoru Evidence Investigator (Randox). Hodnoty $p < 0,01$ byly považovány za statisticky významné. Výsledky: U pacientů s nově dg. ALL jsme zjistili významné zvýšení sérové koncentrace VCAM-1 ($1078,54 \pm 456,96$ mcg/l vs. $328,31$

$\pm 88,66$ mcg/l; $p < 0,000001$), ICAM-1 ($499,57 \pm 237,53$ mcg/l vs. $196,69 \pm 36,06$ mcg/l; $p < 0,0001$), L-selectinu ($2366,33 \pm 1035,37$ mcg/l vs. $1104,54 \pm 243,45$ mcg/l; $p < 0,0001$), MCP-1 ($433,99 \pm 328,59$ ng/l vs. $153,25 \pm 53,60$ ng/l; $p < 0,01$) a IL-8 ($34,07 \pm 28,52$ ng/l vs. $4,87 \pm 3,09$ ng/l; $p < 0,001$). Dále jsme zjistili významné snížení sérové koncentrace IL-3 ($7,34 \pm 3,41$ ng/l vs. $11,53 \pm 4,66$ ng/l; $p < 0,01$) a IL-4 ($1,10 \pm 1,08$ ng/l vs. $3,27 \pm 2,21$ ng/l; $p < 0,01$). Koncentrace ostatních hodnotených biomarkerů se statisticky významně nelišily. Závěr: Naše výsledky naznačují, že sérové koncentrace některých cytokinů a adhezních molekul (VCAM-1, ICAM-1, L-selectin, MCP-1, IL-8, IL-3, IL-4) jsou významně alterované u pacientů s nově dg. ALL a mohou mít vztah k aktivitě onemocnění. Není jasné, zda tyto změny mohou sloužit jako prognostický marker u ALL. Další studie na větším počtu pacientů a srovnání sérových koncentrací cytokinů a adhezních molekul se zavedenými prognostickými faktory budou nezbytné k vymezení role těchto a dalších markerů při stratifikaci rizika ALL. Práce byla podpořena z projektu RO 1011 (FVZ).

P28/2360.

Specifická starostlivost o periférny a centrálny venózní katéter

Hamráček J., Halušková A., Kaščáková A., Fialeková M., Bocková J. (*UNLP, Klinika hematológie a onkohematológie, Košice – SK*)

Intravenózna terapia tvorí neoddeliteľnú súčasť klinickej starostlivosti, či už v ambulanciách alebo lôžkových nemocničných zariadeniach, na krátkodobé či dlhodobé podávanie infúznej liečby, parentálnej výživy alebo podávanie krvných derivátov. Intravenózna kanyla je pre telo cudzím telesom, po zavedení je kolonizovaná mikroorganizmami a je najčastejším zdrojom infekčných komplikácií. Len pri dodržaní správnych bariérových techník pri zavádzaní a dodržaní štandardov a správnych postupov starostlivosti o i.v. prístup môžeme zaistiť správne a bezpečné fungovanie kanyly a prevenciu možných komplikácií. Medzi periférnym a centrálnym venóznym prístupom sú rozdiely jednak v ich zavádzaní, predpokladanej dĺžke podávanej liečby či v rozdielnych dopadoch možných komplikácií na klinický stav pacienta. Kľúčové slová: Periférny venózný katéter, centrálny venózný katéter, ošetrovateľská starostlivosť, komplikácie, ošetrovateľské štandardy PARTICULARITIES IN THE CARE OF PERIPHERAL AND CENTRAL VENOUS CATHETER HALUŠKOVÁ A., HAMRÁČEK J., KAŠČÁKOVÁ A., FIALEKOVÁ M., BOCKOVÁ J. Košice 2013 Clinical Department of Haematology and Oncohaematology, Louis Pasteur University Hospital in Košice Intravenous therapy forms an inseparable part of clinical care at both outpatient clinics and hospital bed departments, for short-term or long-term administration of infusion therapy, parenteral nutrition or administration of blood derivatives. Intravenous cannula is treated as a foreign body and is after administration colonized by microorganisms thus becoming the most common source of infection complications. Only by following proper barrier precautions upon administration and by observing the standards and proper care procedures a sound and safe cannula operation as well as prevention against eventual complications can be secured for. There are differences between peripheral and central venous approach both upon insertion and in supposed duration of a therapy applied as well as in different effects of eventual complications on the clinical state of a patient. Key words: Peripheral venous catheter, central venous catheter, nursing care, complications, nursing standards

P37/2373.

Zriedkavý nález maskovanej t(15;17)

Blahová A., Pavlíková G., Lengyelová K., Tomášová R., Tóthová K., Lukačková R., Hojsíková I. (*Oddelenie klinickej genetiky, Medirex,a.s., Bratislava – SK*)

Akutná promyelocytová leukémia (APL) je ochorenie s typickým klinickým, morfológickým, genetickým a molekulovým obrazom. Konvenčnou cytogenetikou je možné v 70 - 90% prípadov v čase diagnózy detegovať recipročnú translokáciu t(15;17)(q22;q21), pri ktorej dochádza k tvorbe fúzných génov PML-RAR α na chromozóme 15 a RAR α -PML génu na chromozóme 17. V ostatných prípadoch APL sú opísané variantné translokácie t(11;17)(q32;q21), t(5;17)(q35;q12-21)t(11;17)(q13;q21) a der(17). Zriedkavo sa cytogeneticky stanoví fyziologický karyotyp, ktorý predpokladá maskovanú prestavbu, detegovateľnú citlivejšími molekulovými metódami ako FISH, RT-PCR alebo sekvenovanie. FISH metóda použitím komerčne dostupných dual color, dual fusion sond zachytí takmer všetky PML-RAR α fúzie vrátane variantných a maskovaných foriem. Prezентujeme zriedkavý prípad paci-

entky s de novo APL, ktorej bol v čase diagnózy po 24 a 48 hodinovej kultivácii buniek kostnej drene konvenčnou cytogenetikou stanovený karyotyp 47,XX,+8[16]/46,XX[4]. Takisto vyšetrenie FISH metódou nezachytilo prítomnosť fúzných génov, ani prestavbu RAR α génu. Avšak pomocou RT-PCR bol detegovaný chimérický transkript PML-RAR α . Záver: Väčšina prípadov s APL bez cytogeneticky detekovanej t(15;17) je asociovaná s fúziou génov PML a RAR α na molekulovej úrovni. Liečba kyselínou all-transretinovou (ATRA) v kombinácii s chemoterapiou ponúka veľkú šancu na vyliečenie, preto je aj v takýchto prípadoch dôležitá včasná a presná diagnostika.

P39/2376.

Akutní myeloidní leukemie z pohledu epigenetických změn detekovatelných v periferní krvi

Látalová P., Smešný Trtková K., Sztokowski T. (*Ústav klinické a molekulární patologie, LF UP a FN, Olomouc; Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc*)

Úvod Modifikace genové exprese, které nejsou způsobeny změnou v sekvenci DNA, jsou součástí epigenetických procesů. K těm patří zejména metylace DNA, posttranslační modifikace histonů a změny miRNA. Methylace DNA – kovalentní vazba metylové skupiny na uhlík CpG dinukleotidu – je dosud nejlépe prostudovaným epigenetickým mechanismem s nezanedbatelným významem v kancerogenezi a nádorové progresi, což bylo popsáno u solidních nádorů i u hematologických malignit. Zatímco globální hypomethylace vede často k nestabilitě genomu, lokální hypermethylace promotorů tumorsupresorových genů způsobuje jejich inaktivaci a současně je změnou uplatňující se již v časně fázi procesu nádorové transformace. Hypermethylace v oblasti promotorů byla popsána u celé řady genů, které regulují různé buněčné funkce, buněčný cyklus, opravy DNA, apoptózu apod. Jednotlivé diagnostické jednotky se v počtu i typu hypermetylovaných genů značně liší, což je předmětem mnoha současných výzkumů. Metoda V pilotní studii jsme se zaměřili na pacienty s nově diagnostikovanou akutní myeloidní leukemií. Ze vzorků periferní krve jsme izolovali DNA, kterou jsme modifikovali metodou bisulfitové konverze a následně použili pro metyl-specifickou PCR. Znázornění výsledků bylo provedeno pomocí gelové elektroforézy. Výsledky Výše uvedenou metodou je možné detekovat obě části nádorové populace – buňky nesoucí hypermetylovaný i nemetylovaný gen. Zatímco v některých vyšetřených vzorcích jsou obě populace zastoupeny přibližně stejně, u části pacientů zřetelně převažuje populace nesoucí hypermetylovaný ev. nemetylovaný úsek genu. Diskuze Při dostupnosti nových léků – demetylačních činidel – nabývá výzkum epigenetických změn na stále větším významu. Naše prvotní výsledky naznačují určitý potenciál v zavedení neinvazivní a rychlé metody při vyšetření metylačních změn konkrétních genů z malého vzorku periferní krve. Práce byla podpořena vnitřním grantem LF_2013_009.

P51/2441.

Prognostický význam cytogenetických a molekulovo-biologických zmien u pacientov s akútnou myeloblastovou leukémiou

Sopko L., Lukáš J., Mistrík M., Hojsíkova I. (*Klinika hematológie a transfúziológie, LFUK a SZU, Univerzitná nemocnica, Bratislava – SK; genetické laboratórium, MEDIREX, Bratislava – SK*)

Úvod: Akútna myeloblastová leukémia (AML) predstavuje rôznorodú skupinu maligných ochorení krvotvorby. Toto ochorenie je charakteristické svojou fenotypovou a genotypovou heterogenitou. Metódy: Cieľom práce bolo identifikovať prognostický význam cytogenetických a molekulovo biologických zmien, ktoré sa u AML vyskytujú. Konvenčné cytogenetické, FISH a molekulovo biologické vyšetrenie bolo zrealizované u 101 pacientov. Skúmali sme liečebnú odpoveď na podanie indukčnej chemoterapie (CHT), čas do progresie ochorenia (TTP) a celkové prežívanie (OS) v korelácii s jednotlivými cytogenetickými a molekulovými markermi. Výsledky: Pri dosahovaní kompletnej remisie (KR) sme zistili, že najprediktívnejší marker pri dosahovaní KR je cytogenetický nález ($p < 0,0001$). U pacientov s priaznivým cytogenetickým nálezom bolo dosahovanie KR na úrovni 100%, pričom u pacientov s nepriaznivým karyotypom len na úrovni 44,5%. Ako faktory, ktoré signifikantne nepriaznivo ovplyvňujú TTP sme identifikovali nepriaznivý cytogenetický nález a vek pacientov nad 60 rokov. Naopak, ako priaznivý faktor sme identifikovali pacientov s nadexpresiou wt1. Pri porovnávaní celkového prežívania bol opäť cytogenetický nepriaznivý nález a vysoký počet bielych krviniek v čase diagnózy spojený so zlým celkovým prežívaním. Prítomnosť FLT3/ITD mutácie u pacientov s normálnym karyotypom znamenala pre pacientov skorší relaps ochorenia a horšie OS, pričom p-value sa blížilo

hranici štatistickej významnosti ($p = 0,055$). Záver: Keďže v dnešnej dobe existuje viacero liečebných možností AML, cytogenetické a molekulové markery nám pomáhajú identifikovať pacientov, ktorí sú najviac ohrození zlyhaním liečby resp. relapsom ochorenia a voliť u nich intenzívnejšie metódy liečby.

P52/2442.

Úloha BAL pri stanovení etiologického patogéna zápalových pľúcnych infiltrátov u pacienta s hematologickou malignitou

Horváthová D., Chovanová V., Kubalová S., Rimajová V., Lukáš J., Mistrík M. (*Klinika hematológie a transfúziológie SZU, LFUK a UNB, Bratislava – SK; Pneumologická ambul. EPO, NOÚ, Bratislava – SK*)

Infekcia dolných dýchacích ciest vrátane pľúcneho parenchýmu predstavuje u imunokompromitovaného pacienta vážnu komplikáciu s nepriaznivou prognózou, a to najmä pri odklade účinnej antiinfekčnej liečby. Dôležité je preto rýchle stanovenie pôvodcu infekcie. Bronchoalveolárna laváž (BAL) je minimálne invazívnou metódou pri získavaní alveolárnej tekutiny a pomáha v rýchlej a presnej diagnostike etiológie pneumónie (60%). Názory na využitie laváže u imunokompromitovaných pacientov sú však stále kontroverzné. Existujú údaje podporujúce BAL u jedincov s dokázanými pľúcnymi infiltrátmi a s nedostatočnou odpoveďou na ATB, avšak u ťažko chorých neutropenických pacientov je vyšetrenie spájané s častým výskytom komplikácií. To viedlo niektorých autorov k úvahám o rezervovaní laváže u týchto jedincov výlučne pre diagnostiku tuberkulózy, pneumocystovej a CMV pneumónie. Na našej klinike sme za 2 roky v spolupráci s bronchoskopickým pracoviskom NOÚ uskutočnili 48 výkonov BAL u 38 jedincov s hematologickou malignitou (AML 60%, ALL 21%, MDS 9%, CLL 6%, MM 4%) a súčasným CT nálezom zápalových pľúcnych infiltrátov. V čase vyšetrenia malo 38% pacientov agranulocytózu trvajúcu v priemere 21 dní, 62% vyšetrených bolo bez neutropénie. Až 73% jedincov bolo predliečených antibiotikami, 96% antimykotikami, virostatiká užívalo 29% chorých. Špecifického infekčného patogéna sme vo vzorkách z BAL identifikovali u 73% chorých (35/48), z toho v 28% prípadov išlo o baktériu a 26% jedincov malo kvasinky. Pozitívny aspergilový antigén malo 29% chorých (12/42), kryptokokový antigén 6% chorých (3/48), u 24% jedincov (11/46) sme potvrdili vírusovú infekciu. U jedného chorého sme zistili m.tuberculosis, u žiadneho sme nedokázali pneumocystovú infekciu. Výkon bol vo všetkých prípadoch nekomplikovaný. Celková výpovednosť BAL, kultivačný záchyt baktérií a nález vírusovej infekcie v našom súbore pacientov boli porovnateľné s údajmi v literatúre. Podstatne chudobnejší bol kultivačný nález mykotického agens (26% v.s. 57%) s nulovým záchyтом vláknitých húb v dôsledku podávania antimykotík a všeobecne nižšej výpovednej hodnoty kultivačného vyšetrenia v diagnostike aspergilovej infekcie. Významným preto zostáva vysoko špecifické a senzitivne stanovenie galaktomananu z laváže. Výsledky v prezentovanom súbore podporujú využitie BAL v diagnostike pľúcnej infekcie u imunokompromitovaných pacientov ako bezpečnej a zobrazovacie vyšetrenia dopĺňajúcej metódy.

P53/2454.

Response of steroid-resistant capillary leak syndrome to Bevacizumab

Al Sabty F., Bojtárová E., Demečková E., Horváthová D., Kubalová S., Rimajová V., Zwiewka M., Marculjak I., Wild A., Mistrík M. (*Klinika hematológie a transfúziológie, LF UK, SZU a Univerzitnej nemocnice, Bratislava – SK; Fakultná nemocnica s poliklinikou F. D. Roosevelta, Banská Bystrica – SK*)

Capillary leak syndrome (CLS) is a severe complication after haematopoietic stem cell transplantation (HSCT). The underlying pathology is poorly understood, however generalized capillary endothelial cell injury in multiple organs results in a loss of intravascular fluid into interstitial spaces. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a potent inducer of vascular permeability and may have a crucial role in the mechanism underlying CLS formation. Objectives: the potential role of VEGF prompted us to use the anti-VEGF antibody bevacizumab (Avastin) in patient with severe steroid-resistant CLS. Methods: a 38 years old woman with acute lymphoblastic leukemia (common B ALL) underwent sibling, ABO compatible allogeneic HSCT in first complete remission in our institution. Results: the first CLS attack developed day 15 after HSCT (pericardial and pleural effusions, generalized edema) and responded promptly to glucocorticoids 2mg/kg/d i.v. and appropriate supportive management. Engraftment was observed day 26 (ANC $0,5 \times 10^9/l$ and Plt $20 \times 10^9/l$), there were no signs of graft versus host disease (GvHD). On day 84 the patient developed second attack CLS (sudden abdominal pain, decreased urine output, with pericardial and pleural effusions, ascites, hepatomegaly). Restor-

ing glucocorticoid therapy improved CLS. Another CLS attack appeared day 153 after HSCT with chest pain, shortness of breath, ascites and peripheral edema. CT scan documented pericardial and pleural effusions, hepatomegaly and moderate ascites. This time glucocorticoids (2mg/kg/d i.v.) and conventional supportive measures (diuretics, oral fluids restriction, nutritional support, albumin administration, etc.) were not effective and patient had to undergo repeated (3x600ml) thoracenteses for pleural effusions. Intravenous bevacizumab (Avastin, 5 mg/kg body weight) was administered over a 90-minute period on day 174 and day 188 after HSCT. Bevacizumab infusion was well tolerated, all CLS symptoms were ameliorated and a marked decrease in the amounts of pleural effusion was evident on the chest X-ray. On the fourth day after second bevacizumab administration the patient discharged from the hospital without any signs of CLS. Conclusion: CLS treatment is based on systemic corticosteroids. However, in steroid-resistant CLS using bevacizumab may offer a new therapeutic strategy to counteract this severe vascular permeability disorder, especially in patients with life-threatening attacks.

P58/2463.

Spontánní ruptura sleziny u pacienta s akutní promyelocytární leukemií během indukční chemoterapie

Kuba A., Sztokowski T., Rohon P., Faber E., Turcsanyi P., Holzerova M., Prasil V., Indrak K. (*Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc; Radiologická klinika, FN, Olomouc*)

Background: Acute promyelocytic leukemia is a subtype of acute myeloid leukemia with high curability rates. However, it is often accompanied by severe coagulopathy and bleeding risk and thus represents potentially fatal hematological emergency requiring immediate treatment. Spontaneous splenic rupture is a rare event in all hematological malignancies. Only two clinical cases have been described so far in setting of acute promyelocytic leukemia. Patient: We report a patient without preceding splenomegaly who underwent urgent splenectomy for spontaneously occurring splenic rupture during induction chemotherapy. The patient completed induction chemotherapy and achieved complete remission. Conclusion: This is the second clinical case of spontaneous splenic rupture without preceding splenomegaly in a patient with acute promyelocytic leukemia during induction chemotherapy described so far. Our clinical case demonstrates that emergent splenectomy can be life saving even in severe unfavourable condition of a highly immunosuppressed patient. Supported by grant IGA UP LF-2013-004.

P60/2465.

Infekčné komplikácie indukčnej liečby akútnej myeloidnej leukémie

Čerňan M., Sztokowski T. (*Hemato-onkologická klinika, FN a LF UP, Olomouc*)

Úvod: Infekcie patria k častým komplikáciám indukčnej liečby akútnej myeloidnej leukémie (AML). Cieľ: Zmapovanie infekčných komplikácií u pacientov s AML podstupujúcich indukčnú terapiu. Metodika: Retrospektívna analýza záznamov pacientov liečených na Hemato-onkologickej klinike LF UP Olomouc v rokoch 2007 – 2011. Pacienti: Súbor predstavovalo 100 pacientov (50 mužov a 50 žien), vo veku 21 až 73 rokov (medián veku 60,5 roku). Výsledky: Klinicky alebo mikrobiologicky dokumentované infekčné komplikácie sa vyskytli u 48 a febrilná neutropénia u 45 pacientov. Bez infekcie prebehla indukčná chemoterapia u 7 pacientov. U troch pacientov boli infekčné komplikácie príčinou úmrtia. Bakteriálne infekčné komplikácie boli najčastejšie, 32 pacientov malo sepsu, 22 pneumóniu, ďalších 22 klinicky dokumentované infekčné ložisko a 2 pacienti enteritis s preukázaným enterotoxínom *Clostridium difficile*. Grampozitívne koky boli zachytené v hemokultúrách 21 (65,6%) a gramnegatívne agens u 17 (53,1%) pacientov so sepsou. Antibiotická terapia s terapeutickým / profylaktickým zámerom bola nasadená u 99 pacientov. Mykotické infekcie boli popísané u 42 z celkového počtu pacientov, z toho 35 (83%) bolo postihnutých invazívnou mykózou a 7 (17%) pacientov trpelo slizničnou formou mykózy. Dokázané invazívne mykózy boli u 2 (6%), pravdepodobné u 4 (11%) a možné u 29 (83%) pacientov. Antimykotická terapia s terapeutickým / profylaktickým zámerom bola nasadená u 99 pacientov. Vírusové a parazitárne ochorenia ako infekčné komplikácie boli najmenej časté. 8 pacientov malo 'herpes labialis', u 27 pacientov bol nasadený aciclovir. Klinicky manifestná CMV infekcia nebola zaznamenaná. Parazitárne ochorenie taktiež nebolo zistené. Záver: Infekcie patria k najčastejším komplikáciám liečby v hematooonkológii. Výsledky

ukázali, že 93% pacientov malo behom indukčnej chemoterapie AML infekciu. Napriek tomu len 3 pacienti na následky infekcie zomreli, čo je veľmi pozitívny výsledok. Vhodné používanie dostupných a vývoj nových antimikrobiálnych terapeutík a postupov je dôležitým krokom k zvýšeniu úspešnosti supportívnej terapie pri indukčnej liečbe AML.

P61/2472.

Septický šok u pacientov s akútnou leukémiou

Lukáš J., Sopko L., Mistrík M. (*Klinika hematológie a transfúziológie, LFUK, SZU, UN, Bratislava – SK*)

Úvod: Cytostatika, ktoré sa používajú u pacientov s akútnou leukémiou v rámci indukčnej a postremisnej liečby spôsobujú dreňovú apláziu s ťažkou neutropéniou (ANC pod 0,5x10⁹/l) trvajúcu minimálne 10 dní. Protrahovaná neutropénia je hlavným rizikovým faktorom rozvoja infekčných komplikácií, s prechodom do ťažkej sepsy až septického šoku. Metódy: 64 pacientov s diagnózou akútnej leukémie (48-AML, 16-ALL) bolo od januára 2011 liečených intenzívnou systémovou chemoterapiou na Klinike hematológie a transfúziológie v Bratislave. Spoločne bolo podaných 149 cyklov chemoterapie - 1. cyklus indukčnej CHT (64x), 2. cyklus indukčnej CHT (21x), konsolidačná CHT (64x). Cieľom práce bolo retrospektívne analyzovať incidenciu, vyvolávajúcu príčinu a spôsob manažmentu septického šoku. Výsledky: Incidencia septického šoku po liečbe bola 13% (20/149). Najvýznamnejším rizikovým faktorom bola intenzita podanej CHT a s tým súvisiaca doba trvania ťažkej neutropénie. Septický šok sa vyskytol u pacientov s AML v priemere na 10 deň po ukončení CHT a u pacientov s ALL na 18 deň GMALL protokolu. Identifikovať patogéna z krvi zodpovedného za septický šok sa podarilo u 11 pacientov z 20 prípadov (55%). Medzi izolovanými kmeňmi prevládali gram negatívne baktérie (7x) nad gram pozitívnymi (4x). V dobe narastajúcej rezistencie nemocničných patogénov na ATB sa aj v našom súbore 7 gram negatívnych infekcií krvého prúdu vyskytli 3 karpapnem rezistentné bakteriálne kmene, ktoré vyústili do ireverzibilného septického šoku. Mortalita pacientov v septickom šoku predstavovala 30% (6/20). Záver: Napriek pokroku a získaniu nových poznatkov v manažmente septického šoku, zostáva sepsa najčastejšou príčinou mortality u pacientov s akútnou leukémiou.

MNOHOTNÝ MYELOM A AMYLOIDÓZA

P1/2292.

Hodnocení exprese CD 45 u pacientů s mnohočetným myelomem a jeho vliv na časnost progresu

Jungová A., Holubová M., Vokurka S., Lysák D., Jindra P. (*Hematologicko onkologické odd., Plzeň*)

Mnohočetný myelom (MM) je poměrně časté onemocnění charakterizované klonální proliferací patologických plazmocytů s produkcí paraproteinu. Plazmocyty mají většinou specifický imunofenotyp CD38+, 138+, normální plazmatické buňky vykazují fenotyp CD19+CD56-, zatímco zralé myelomové buňky mají fenotyp CD19-CD56+. V literatuře je dále popisován povrchový antigen CD45 (Protein tyrosin fosfatáza, receptor typu C). Znak CD45 je popisován jako regulátor antigen-zprostředkované signalizace a aktivace lymfocytů. Za normálních okolností mladé plazmatické buňky tento znak exprimují, ale v průběhu diferenciace na zralé plazmocyty jej ztrácí. Plazmatické buňky CD45 negativní více odolávají apoptóze. Podle literatury by měla být nízká exprese CD45 nepříznivým faktorem ovlivňující časnost progresu. Cílem práce bylo porovnání doby do progresu/relapsu (TTP) u pacientů s MM s ohledem na expresi CD45 znaku. Retrospektivně byly hodnoceny vzorky 71 pacientů s nově diagnostikovaným MM v 5/2011 až 12/2012. Cytogenetické riziko: nepříznivé = normální karyotyp, změny na 13 a 17 chromozomu, t(4;14) a t(14;16), příznivé = vše ostatní a t(11;14). Pomocí vícebarevné průtokové cytometrie byla analyzována exprese CD45 antigenu na populaci plazmocytů gatovaných jako CD38 a CD138 double-pozitivní buňky. Fyziologické a patologické plazmocyty byly odlišeny podle exprese antigenu CD19. S ohledem na intenzitu flowcytometrické exprese CD45 byla definována skupina s nízkou expresí „dim“ a skupina s vyšší expresí „bright“. Mezi těmito dvěma skupinami byly porovnávány demografické parametry. Skupinu „dim“ (n=25) vs. „bright“ (n=46): medián věku 58 let vs. 62 let (p=0,30), poměr muži/ženy 13/12 vs. 24/22 (p=1,0), nepříznivá cytogenetika 16/21 (76 %) vs. 25/42 (60 %) (p=0,26), cytogenetika nevyšetřena u 16% pac. vs 9% pac., četnost CR po 1.linii léčby 3/25 vs. 8/46 (p=0,73), četnost autologní SCT v 1.linii 23/25 (92%) vs. 38/46 (83%) (p=0,48), Žijící pacienti 21/25 (84%) vs 43/46 (93 %) (p=0,23), medián follow-up u žijících je 11 měs (1-40) vs. 20 měs. (1-98), medián TTP byl 8 vs 22 měs. (p=0,0003). Pravděpodobnost progresu ve 24 měsících je 100% vs. 52 % (p=0,0003). Porovnali jsme soubor s nízkou a vyšší expresí CD45 u pacientů s MM. Nebyl pozorován rozdíl v demografických parametrech, rizikosti cytogenetiky ani typu 1.linie léčby. Soubor s nízkou expresí CD45 měl významně nižší TTP. Exprese CD45 antigenu by se mohla stát jedním z prognostických faktorů MM.

P2/2295.

Cirkulující mikroRNA u monoklonálních gamapatií

Ševčíková S., Kubicková L., Kryukov F., Dementyeva E., Slabý O., Nekvindová J., Radová L., Mikulášová A., Kuglík P., Penka M., Pour L., Adam Z., Hájek R. (*Babákova myelomová skupina, Ústav patologické fyziologie, LF MU, Brno; Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův onkologický ústav, Brno; Ústav molekulární a translační medicíny, LF UP, Olomouc; Oddělení klinické hematologie, FN, Brno; Interní hematologická a onkologická klinika, FN, Brno; Ústav klinické hematologie, FN, Ostrava*)

Úvod MikroRNA, krátké, nekódujících molekuly RNA, se podílí na patogenezi mnohočetného myelomu (MM). Jejich přítomnost byla také prokázána v tělních tekutinách u MM pacientů nebo u osob s monoklonální gamapatií nejasného významu (MGUS). Tyto cirkulující miRNA jsou stabilní a mohly by sloužit jako efektivní marker pro pacienty s monoklonálními gamapatiemi. Cíle Cílem studie bylo zjistit specifický profil sérových miRNA u nově diagnostikovaných MM pacientů a osob s MGUS ve srovnání se zdravými jedinci (HD). Získaný profil byl validován pomocí kvantitativní real-time PCR (qRT-PCR) a korelován s klinickými a cytogenetickými parametry. Materiál a metody Do studie bylo zahrnuto celkem 190 vzorků séra MM pacientů, osob s MGUS a HD. Po provedení skríningu 667 miRNA pomocí TaqMan Low Density Arrays (TLDA) byla hladina 6 významně deregulovaných miRNA (p<0,05) mezi MM a HD validována pomocí qRT-PCR na vzorcích séra 103 MM, 30 HD a 57 MGUS. Receiver Operating Characteristic (ROC) analýza byla použita pro vyjádření specifity a senzitivity každé miRNA zvlášť i v kombinaci. P hodnoty <0,05 byly považovány za statisticky významné. Výsledky Pomocí TLDA analýzy bylo nalezeno 14 významně deregulovaných miRNA mezi

MM a HD, miR-222, miR-130a, miR-34a, miR-744, let-7d a let-7e byly validovány na větším souboru vzorků MM, MGUS a HD. Mir-744, miR-130a, let-7d a let-7e byly významně sníženy, zatímco miR-34a byla významně zvýšená u MM i MGUS vzorků (všechny p<0,001). Pomocí ROC analýzy byla pro MM stanovena nejvyšší senzitivita (80,6 %) a specifita (86,7 %) (AUC=0,898) pro kombinaci miR-34a+let-7e a stejná kombinace miRNA pro MGUS poskytla senzitivitu (91,1 %) a specifitu (96,7 %) (AUC=0,976). Dále byla jak u MM tak u MGUS pozorována významná pozitivní korelace mezi hladinami miR-744, let-7d a let-7e s hladinou hemoglobinu a albuminu a významná negativní korelace s hladinami kreatininu a β 2-mikroglobulinu, u MM navíc tyto miRNA pozitivně korelovaly s hladinou trombocytů. Nebyla nalezena žádná spojitost mezi hladinami miRNA a infiltrací kostní dřeně plazmocytů, pouze u MM byla nalezena korelace mezi hladinami let-7d a let-7e a del(13q14) (p=0,045 a p=0,019 resp.). Nižší hladiny miR-744, let-7d a let-7e byly spojeny s vyšším ISS stádiem (všechny p<0,0001). Shrnutí Naše pozorování ukazují, že miRNA by mohly stanovit nový nadějný markr pro jedince s monoklonálními gamapatiemi jako je MGUS a MM. Grantová podpora: NT11154, NT12130, MUNI/11/InGA17/2012 a CZ.1.07/2.3.00/20.0046

P3/2296.

Zavedení detekce minimální residuální choroby pomocí alelově specifické qPCR u pacientů s mnohočetným myelomem

Sedlaříková L., Kubicková L., Kryukov F., Pour L., Ševčíková S., Hájek R. (*Babákova myelomová skupina, Ústav patologické fyziologie, LF MU, Brno; Interní hematologická a onkologická klinika, FN, Brno; Oddělení klinické hematologie, FN, Brno*)

Úvod Mnohočetný myelom (MM), nádorové onemocnění plazmatických buněk (PB), je dnes stále obtížně léčitelný. Cílem léčby je dosažení kompletní remise, bohužel po čase většina pacientů relabuje. Proto je pozornost zaměřena na zpřesnění sledování remise i relapsu metodami molekulární biologie. K těm patří i alelově specifická (ASO) real-time kvantitativní PCR (qRT-PCR) založená na detekci specifické přestavby genu pro těžký řetězec imunoglobulinu (VDJ IgH přestavba) u klonálních PB. Při detekci minimální residuální choroby (MRD) pomocí PCR u MM využíváme především hypervariabilní oblasti IgH přestavby, jejíž sekvence slouží pro návrh primerů a sond specifických pro konkrétní klon PB pacienta. Tato metoda nebyla dosud zavedena na žádném pracovišti v ČR. Metody Pro zavedení detekce MRD pomocí PCR jsme použili 10 vzorků DNA izolované z mononukleárních buněk kostní dřeně pacientů s MM v relapsu (2/10) či u nově diagnostikovaných pacientů (8/10). Nejprve jsme provedli PCR screening pomocí degenerovaných primerů (VHFs a JHD) pro nalezení klonální VDJ přestavby. Tento PCR produkt byl následně sekvenován, analyzován pomocí databáze IMG/TVQUEST, poté byly navrženy ASO primery v oblastech CDR3 a CDR2 IgH a sonda v oblasti FR3. Pro qRT-PCR stanovení MRD byly připraveny standardní křivky podle kritérií ESG-MRD-ALL a kvantifikace MRD byla vztažena k referenčnímu genu pro lidskou RNÁzu P. Výsledky Pro 10 pacientů byla stanovena klonální VDJ přestavba. U 2 pacientů byla zjištěna polyklonální sekvence. 50 % pacientů (5/10) mělo VH3 alelu, 10 % pacientů mělo alelu VH1 (1/10), 10 % VH2 (1/10) a 10 % VH4 (1/10). Pro všech 8 monoklonálních pacientů byly navrženy specifické ASO primery pro 2. kolo kvalitativní PCR a sonda pro qRT-PCR. Dále byla jejich sekvence klonována do plazmidů pro možnost absolutní kvantifikace pomocí qRT-PCR. U všech 8 pacientů bylo provedeno 2. kolo PCR s ASO primery, navíc pro 4 pacienty byla provedena qRT-PCR. U 4 pacientů bylo kvantifikováno množství klonálních MM buněk v původním vzorku a u 2 byly nalezeny ty stejné klonální buňky v periferní krvi v době dalšího relapsu, jelikož kostní dřeň pacientů nebyla k dispozici. Závěr Detekce MRD pomocí PCR je u MM z důvodu velké heterogenity nádorových PB náročná a je úspěšná jen u některých pacientů. Na našem pracovišti se nám úspěšně povedlo zavést tuto metodu jak na úrovni kvalitativní, tak u některých pacientů na úrovni kvantitativní. Grantová podpora: NT11154, NT12130, MSM0021622434 a MUNI/C/0963/2012.

P14/2321.

Polymorfismy v genu P-glycoprotein 1 souvisí s intervaly přežití u nemocných s mnohočetným myelomem léčených bortezomibem

Almáší M., Sábliková B., Kubicková L., Ševčíková S., Kryukov F., Brožová L., Jarkovský J., Jurajda M., Adam Z., Penka M., Vašků A., Hájek R. (*Babákova myelomová skupina, Ústav patologické fyziologie, LF MU, Brno; Institut biostatistiky a analýz, LF MU, Brno; Ústav patologické fyziologie, LF*

MU, Brno; Interní hematologická a onkologická klinika, FN, Brno; Oddělení klinické hematologie, FN, Brno; Ústav klinické hematologie, FN, Ostrava)

Úvod: Jednonukleotidové polymorfismy (SNPs) v genu pro P-glykoprotein 1 (MDR1) a genu pro protein multilékové rezistence (MRP1) mohou buď změnit produkci nebo funkci proteinů efluxní transmembránové pumpy dopravující endogenní cizorodé látky a léky z buněk a tím zapříčinit multilékovou rezistenci. Cíl: Naším cílem bylo sledovat spojitost tří SNPs a jejich haplotypů v genu MDR1 a jeden v genu MRP1 s intervaly přežití u pacientů s mnohočetným myelomem (MM). Materiál a metody: Pro zjištění frekvence genotypů bylo provedeno testování genomové DNA od 235 pacientů s MM (112 žen/123 mužů); medián věku při zahájení terapie 67 (rozmezí 49-79) let. Všichni pacienti byli léčeni bortezomibem v různých léčebných liniích: primoléčba (20,4 %; 48/235), druhá (40,9 %; 96/235), třetí (28,9 %; 68/235), čtvrtá (7,7 %; 18/235), pátá a další linie léčby (2,1 %; 5/235). Většina pacientů s MM 63,8 % (150/235) byla léčena režimem CVD – cyklofosfamid, Velcade (bortezomib), dexametazon. Genotypy byly analyzovány metodou TagMan real-time PCR specifické alelické diskriminace na přístroji StepOne™, Applied Biosystems. Haplotypy byly odvozeny v software PHASE, ver.2.1. Intervaly přežití byly hodnoceny pomocí Kaplan-Maierových křivek. Výsledky: Všechny SNPs splňovaly podmínky Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Pacienti, u nichž nebyl nalezen haplotyp TGT (rs1045642, rs2032582 and rs1128503) v genu MDR1 měli při sledování do 2 let od začátku terapie delší období přežití (medián 23,1 vs. 11,4 měsíců; $p=0.017$), delší období bez progresu (PFS; medián 9,1 vs. 7,5 měsíců; $p=0.007$) a delší čas do progresu (TTP; medián 13,0 vs. 9,1 měsíců; $p=0.017$) než pacienti s jednou nebo dvěma kopiemi tohoto haplotypu. V genu MRP1 (rs4148356) jsme nenalezli statisticky významnou asociaci. Shrnutí: Naše analýzy ukazují významnou farmakogenetickou spojitost specifického haplotypu v genu MDR1 s dvouletým sledováním léčebného účinku u pacientů s MM léčených bortezomibem. Nicméně jsou potřeba další studie pro ověření zda by tyto výsledky mohly přispět k následné individualizaci léčby. Grantová podpora: IGA NT13190 a NT11154.

P22/2347.

Transplantace srdce pro AL amyloidózu následovaná transplantací hematopoetických kmenových buněk - kazistiky

Honek T., Krejčí J., Hude P., Němec P., Adam Z., Kořístek Z., Špinarová L. (Mezinárodní centrum klinického výzkumu - I. interní kardiologická klinika, FN u sv. Anny, Brno; Centrum kardiologické transplantace a transplantace chirurgie, Mezinárodní centrum klinického výzkumu, Brno; Interní hematologická a onkologická klinika, FN, Brno; I. patologicko - anatomický ústav, FN u sv. Anny, Brno)

Úvod: Srdeční postižení při AL amyloidóze je známkou velice závažné prognózy s mediánem přežití 6 měsíců bez léčby. Pacienti se zachovalou systolickou funkcí levé komory mohou být léčeni vysokodávkovaným melfalanem (HD MEL) s následnou transplantací periferních kmenových buněk (ASCT). U pacientů s přítomným srdečním selháním je nutné nejprve provést srdeční transplantaci (OTS) a následně indikovat kurativní hematoonkologickou léčbu. Soubor pacientů: Popisujeme 3 pacienty (2 muži a 1 žena) se srdečním selháním na podkladě srdeční AL amyloidózy, kteří podstoupili OTS. S odstupem 5 měsíců po OTS byl po stimulaci G-CSF 10 ug/kg/den proveden sběr hematopoetických kmenových buněk a následně provedena HD MEL v dávce 100 mg/m² s ASCT. Výsledky: Pacient A (muž *1955) s diagnózou srdeční AL amyloidózy diagnostikovanou pomocí endomyokardiální biopsie (EMB) 4/2010 podstoupil OTS 8/2010. Následně byla provedena HD MEL s ASCT 3/2011, bez zjištěné toxicity. Nicméně nebylo dosaženo kompletní remise (CR). Byla provedena sternální punkce, splněna kritéria mnohočetného myelomu 12/2011, proto byla podána CHT v režimu BDD. Po 7 cyklech bylo dosaženo CR. Funkce srdečního graftu je normální, bez přítomnosti amyloidu 30 měsíců po OTS. Pacientovi B (muž *1962) s těžkým srdečním selháním a přítomnou monoklonální gamapatií, s podezřením na AL amyloidózu, byla provedena EMB, která neprokázala depozita amyloidu. OTS byla provedena 6/2010. V explantovaném srdci byla nalezena nehomogenita fokální depozita amyloidu. HD MEL s ASCT byla provedena 1/2011. Nebylo však dosaženo CR, proto bylo aplikováno 8 cyklů CHT v režimu CVD 3-11/2011 vedoucí jen k parciální remisi (PR). Třetí linie léčby RAD byla podána 11/2011-7/2012 a pacient je po ní ve velmi uspokojivé PR. Funkce srdečního štěpu je dobrá, bez detekce amyloidu v srdci 32 měsíců po OTS. Pacientka C (žena *1949) s diagnózou srdeční amyloidózy potvrzenou EMB 12/2011 podstoupila OTS 5/2012. V plánu byla HD MEL a ASCT, která však nebyla provedena, neboť pacientka dosáhla CR, pravděpodobně

při souběžně podávané imunosupresivní terapii (takrolimus, MMF, prednison). Pacientka je nyní ve stabilním stavu bez přítomnosti amyloidu v srdečním graftu 9 měsíců po OTS. Závěr: Srdeční selhání při AL amyloidóze je velmi závažné onemocnění s velmi špatnou prognózou. Předřazení OTS u selektovaných nemocných bez multiorganového postižení umožní podání kurativní hematoonkologické léčby, což vede k dramatickému zlepšení přežívání postižených jedinců.

P27/2358.

První zkušenosti s metodou aCGH u 19 jedinců s monoklonální gamapatií nejasného významu
Mikulášová A., Vallová V., Smetana J., Grešliková H., Kupská R., Říhová L., Potáčková A., Sandecká V., Pour L., Kuglík P., Hájek R. (Laboratoř molekulární cytogenetiky, Ústav experimentální biologie, PřF MU, Brno; Babákova myelomová skupina, Ústav patologické fyziologie, LF MU, Brno; Interní hemato-onkologická klinika, FN, Brno; Oddělení klinické hematologie, FN, Ostrava)

Nález klonálních chromozomových aberací v plazmatických buňkách je u pacientů s mnohočetným myelomem (MM) považován za jeden z nejdůležitějších nezávislých prognostických faktorů. Bylo prokázáno, že podobné chromozomové aberace se vyskytují i u jedinců s premaligním stádiem MGUS. Výzkum chromozomových odchylek je však u MGUS značně komplikován malým množstvím buněk, které je možné pro analýzu získat. Proto je molekulárně cytogenetické vyšetření většinou omezeno na analýzu přítomnosti základních chromozomových aberací, např. delecí genu RB1, translokace genu IGH, zisk v oblasti 1q21 a hyperdiploidie, které jsou vyšetřovány u MM, a to pomocí metody I-FISH. Prognostický význam doposud popsanych chromozomových aberací však nebyl prokázán. Proto současné studie směřují k analýze dalších chromozomových abnormalit pomocí celogenomového profilování. Pomocí metody aCGH s využitím oligonukleotidových DNA mikročipů platformou Agilent "Human Genome CGH, 4x44K" (N=12) a "SurePrint G3 CGH+SNP, 4x180K" (N=7) jsme celkově analyzovali 19 jedinců s MGUS (13M/6Ž; medián věku 64). Plazmatické buňky byly separovány pomocí FACS s využitím protilátek proti znakům CD138, CD19 a CD56. Z buněk byla izolována a pomocí MDA techniky amplifikována DNA, která byla použita do standardního protokolu aCGH doporučeného výrobcem mikročipů. Chromozomové aberace jsme našli u 58% (11/19) jedinců s MGUS. U 26% (5/19) byla přítomna hyperdiploidie, tedy zisky minimálně 2 z následujících chromozomů: 3, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 15, 17, 18, 19, 21. Nejčastější početní změnou bylo zmožení chromozomu 9 (32%; 6/19) a 11 (26%; 5/19). Dále jsme našli strukturní chromozomové aberace, a to zisky v oblastech 1q, 3q22.3-q29, 6p, 11q13.3-q25, 16p, Xq23-q28 a ztráty v oblastech 6q, 6q23.3, 8q24.21-q24.22, 13q13.3-q34, 16p11.2-p11.1, 16q11.2-q13, 16q21-q24.3, 16q23.1-q23.2. V naší studii jsme úspěšně optimalizovali a u prvních jedinců s MGUS použili protokol celogenomového vyšetření nebalancovaných chromozomových aberací metodou aCGH. Z našich prvních výsledků vyplývá, že u více než poloviny jedinců s MGUS se vyskytují různé chromozomové aberace. Potvrdili jsme, že metoda aCGH umožňuje zachytit i řadu dalších odchylek, které nejsou vyšetřovány v rámci běžného panelu FISH a které bude možné dále studovat jako potenciální prognostické faktory přeměny MGUS do nádorové choroby. Podpora: NT13492, NT13190, NT11154, OPVK CZ.1.07/2.3.00/20.0183, MSM0021622434, GAP304/10/1395

P40/2377.

Amyloidóza: Jak správně diagnostikovat? Kdy zahájit léčbu?

Hájek R. (Klinika hematoonkologie, FN a LF OU, Ostrava)

Amyloidóza patří mezi vzácná onemocnění. Mají svá diagnostická úskalí, která z onemocnění dělají obtížně diagnostikovatelné onemocnění i pro zkušené hematology a pathology. Nedostatečně zvládnuté diagnostické metodiky jsou často důvodem falešně negativních vyšetření. Rovněž tak zcela zbytečně provedených biopsií ledvin či srdce, což není bez rizika pro nemocného. Včasná diagnostika je rozhodující pro úspěšnost léčby. Prognosticky kritická a rozhodující je rozsah poškození orgánů, zvláště pak srdce. Jak diagnostika, tak léčba vyžadují v řadě případů úzkou spolupráci lékařů různých specializací. Řada účinných léků není hrazena v indikaci této raritní choroby, přesto je mnoho nenákladných léků v řadě případů rovněž dostatečně účinných (melfalan, cyklofosfamid, glukokortikoidy). Při léčbě amyloidózy dělají lékaři často chybu, neboť k ní přistupují podobně jako k mnohočetnému myelomu, s nímž má hlavní typ amyloidózy AL na první pohled hodně společného. Zatímco u mnohočetného myelomu lze často s léčbou čekat s výhodou pro nemocného, u amyloidó-

zy je tomu naopak. Důvodem je odlišná patofyziologie onemocnění a zvláště pak odlišný toxický efekt lehkých řetězců u obou onemocnění. Jde o rozdíl zcela zásadní. Tomu musí odpovídat i zásadně odlišný přístup při použití strategie „watch & wait“. Ta je často možná u mnohočetného myelomu, téměř nikdy není možná u amyloidózy. V České republice doposud neexistoval systémový přístup k diagnostice a léčbě amyloidózy. To je cílem nového „Akčního plánu amyloidóza“ zaměřeného na vytvoření národní kooperační platformy s cílem zvýšit kvalitu diagnostiky a léčby a informovanosti lékařů. Souhrnně zvýšit kvalitu péče o nemocné s amyloidózami v České republice.

P46/2422.

Korelace rozsahu postižení skeletu u mnohočetného myelomu hodnoceného pomocí konvenční radiografie a celotělové magnetické rezonance s vybranými biologickými ukazateli mikroprostředí kostní dřeni

Minařík J., Puščíznová P., Heřman M., Petrová P., Pika T., Hrbek J., Bačovský J., Ščudla V. (III. interní klinika – NRE, FN a LF UP, Olomouc; LF UP [Student 6. r. – SVOČ], Olomouc; Radiologická klinika, FN a LF UP, Olomouc; Oddělení klinické biochemie, FN a LF UP, Olomouc)

Mnohočetný myelom je zhoubné onemocnění krvetvorné tkáně charakterizované neoplastickou transformací a proliferací nádorově změněných plazmatických buněk. U většiny nemocných je onemocnění spojeno s různou mírou postižení skeletu – od přítomnosti drobnoložiskového postižení až po rozsáhlé kostní defekty. Diagnostické možnosti posouzení rozsahu skeletální manifestace se opírají o zhodnocení rentgenového vyšetření osového skeletu. To se ale v současnosti jeví jako nedostatečné s ohledem na mnohem modernější a citlivější metody detekce. Současně s makroskopickými nálezy pomocí zobrazovacích technik lze tíži postižení skeletu odhadnout též pomocí ukazatelů kostního metabolismu, tj. parametrů osteogeneze a osteoresorpce, případně angiogenezy, které odrážejí biologické vlastnosti plazmatických buněk a změny mikroprostředí kostní dřeni. Náplní tohoto pilotního hodnocení bylo posouzení vztahu mezi rozsahem postižení skeletu pomocí rentgenového hodnocení (dle Durieho) a technikou celotělové magnetické rezonance (stážování Durie-Salmon plus) a hladinami vybraných působků kostního metabolismu a angiogenezy v historickém souboru 32 nemocných s nově diagnostikovaným onemocněním. Mezi parametry mikroprostředí kostní dřeni byly zařazeny osteokalcin (OC), kostní isoenzym alkalické fosfatázy (bALP), parathormon (PTH), karboxyterminální telepeptid kolagenu typu-I (ICTP), N-terminální propeptid prokolagenu typu-I (PINP), insulinu podobný růstový faktor-1 (IGF-1), hepatocytární růstový faktor (HGF), syndecan-1/CD138 (SYN), vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), osteoprotegerin (OPG), osteopontin (OPN), endostatin (ES), zánětlivý makrofágový faktor 1 α a 1 β (MIP-1 α , MIP-1 β), interleukin-17 (IL-17) a angiogenin (ANG). Z uvedených parametrů vyšetřených při diagnóze byla zjištěna pozitivní korelace s rozsahem postižení skeletu dle Durieho u následujících parametrů – ICTP (korelační koeficient $kk = 0,514$, $p = 0,004$), PINP ($kk = 0,493$, $p = 0,004$) a OPN ($kk = 0,492$, $p = 0,006$). U VEGF byl naznačen trend, avšak bez statistické významnosti ($kk = 0,484$, $p = 0,111$). Ostatní ukazatele s rozsahem postižení skeletu nekorelovaly. V případě hodnocení dle stážování Durie-Salmon plus nebyla nalezena pozitivní korelace s žádným z vyšetřovaných ukazatelů. Cílem hodnocení bude prezentace výsledků provedené analýzy spolu s výběrem základních biologických ukazatelů k plánovanému rozšíření panelu o současné moderní parametry myelomové kostní nemoci. Za podpory grantu IGA MZ CR NT14393.

P47/2423.

Profylaxe herpes zoster nízkou dávkou acykloviru u nemocných s mnohočetným myelomem léčených bortezomibem

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

Cílem našeho hodnocení byla retrospektivní analýza 204 pacientů léčených bortezomibem na naší klinice v letech 2003-2012. Před zavedením profylaxe acyklovirem bylo celkem 72 jedinců léčeno chemoterapií se začleněním bortezomibu bez jakýchkoli preventivních opatření. Pozdější skupina 126 nemocných mělo současnou profylaxi nízkou dávkou acykloviru (200 mg denně). Incidence herpes zoster u nemocných bez profylaxe byla 28%, zatímco ve skupině s profylaxí acyklovirem 200mg denně došlo k reaktivaci onemocnění pouze u jednoho pacienta (1%) v důsledku non-compliance. Nemocní s předchozí anamnézou herpetické infekce měli obzvláště vysoké riziko reaktivace one-

mocnění (3 ze 6, tj. 50% incidence). Infekce herpes zoster se u většiny nemocných (78%) objevila během prvních tří cyklů léčby. Přesto byla reaktivace zaznamenána i v pozdějších fázích, dokonce i po 7. cyklu chemoterapie. U žádného z nemocných nebyly pozorovány nežádoucí účinky spojené s léčbou acyklovirem. Naše sdělení potvrzuje zvýšenou incidenci infekce herpes zoster u nemocných s mnohočetným myelomem léčených bortezomibem, obzvláště u jedinců s předchozí anamnézou herpetického onemocnění. Nízká dávka acykloviru (200mg denně) v prevenci herpes zoster je bezpečná, dobře tolerovaná a současně poskytuje dostatečnou profylaxi, měla by však být zachována po celou dobu léčby bortezomibem. Za podpory grantu IGA MZ CR NT14393 a IGA MZ CR NT 12215-4/2011.

P49/2427.

Změny chromosomu 8 u nemocných s mnohočetným myelomem – srovnání nálezů v době diagnózy a relapsu onemocnění

Mičková P., Balcárková J., Pika T., Ščudla V., Holzerová M., Mikešová M., Hanzlíková J., Kropáčková J., Prekopová I., Indrák K., Jarošová M. (Hemato-onkologická klinika, LF UP a FN, Olomouc; III. interní klinika – NRE, LF UP a FN, Olomouc)

K nejčastěji identifikovaným změnám chromosomu 8 u nemocných s mnohočetným myelomem (MM) patří přestavba genu MYC s nejvyšší frekvencí výskytu v pokročilých stádiích onemocnění (~45% nemocných) a absencí nebo jen ojedinělým výskytem u nemocných ve stádiu MGUS či asymptomatického MM. Aktivace genu MYC v důsledku často nebalancovaných i komplexních translokací bývá detekována u nemocných s hyperdiploidii nebo translokací t(4;14). Jinou často se vyskytující změnou chromosomu 8 (~25%) u MM je delece v oblasti krátkého ramene chromosomu 8. Geny TRAILR1 (TNFRSF10A) a TRAILR2 (TNFRSF10B) s významnou úlohou v procesu TRAIL-indukované apoptózy nacházející se v oblasti 8p21.3 jsou považovány za kandidátní tumor supresorové geny zapojené v patogenezi mnohočetného myelomu. Cílem naší studie bylo určení typu a frekvence změn chromosomu 8 u souboru 30 nemocných s MM, kteří byli vyšetřeni klasickou a molekulární cytogenetikou jak v době diagnózy, tak v relapsu onemocnění a vyhodnotit výskyt aberace vzhledem k progresi onemocnění. Soubor 30 nemocných tvořilo 18 mužů a 12 žen s mediánem věku 62,5 let, kteří byli diagnostikováni a léčeni na III. interní klinice a Hemato-onkologické klinice FN a LF UP v Olomouci v letech 2000-2013. Medián sledování byl 56 měsíců. Cytogenetická a molekulárně cytogenetická vyšetření byla provedena na nestimulovaných buňkách kostní dřeni, s minimálním zastoupením 10 % plazmatických buněk. U všech nemocných byly chromosomové a genové aberace hodnoceny metodou FICTION s centromerickými, lokusově specifickými a BACS sondami. Ve vybraných případech byly využity metody mFISH, CGH a arrayCGH. Aberace chromosomu 8, nejčastěji nebalancované translokace, byly pozorovány u ~75% nemocných. Změna chromosomu 8 nebyla u žádného nemocného jedinou změnou v karyotypu. Nejčastěji byla pozorována společně s delecí genu RB1, nadpočetnou kopií oblasti 1q21 a početními změnami chromosomu 15. U dvou nemocných byla v době relapsu prokázána translokace t(8;14) zahrnující onkogen MYC. U jiné nemocné byl společně s translokací t(8;14) bez zapojení genů MYC i IgH prokázán i isochromosom dlouhých ramen chromosomu 8. Výsledky mapování zlomů chromosomu 8 společně s dalšími genovými a chromosomovými změnami v karyotypu nemocných s MM v době diagnózy a relapsu onemocnění a vyhodnocením jejich klinického významu budou prezentovány na konferenci. Práce je podporována IGA grantem NT 14400 a studentským grantem Univerzity Palackého LF-2013-004

P65/2491.

Sérové hladiny volných lehkých řetězců imunoglobulinu u AL amyloidózy

Pika T., Lochman P., Minařík J., Bačovský J., Ščudla V. (III. interní klinika NRE, FN, Olomouc; OKB, FN, Olomouc)

Úvod: Systémová AL amyloidóza je vzácné onemocnění patřící do skupiny monoklonálních gamapatií, přičemž podkladem choroby je extracelulární depozice insolubilních fibril tvořených fragmenty nebo kompletními molekulami monoklonálních lehkých řetězců imunoglobulinů produkovaných klonálními plazmocytů. V posledních letech je již zcela běžně prováděno stanovení sérových hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinu (VLŘ), což významně rozšířilo možnosti analýzy monoklonálního imunoglobulinu (MIg) u monoklonálních gamapatií. Cíl: Náplní předloženého sdělení jsou

vlastní zkušenosti se stanovením sérových hladin volných lehkých řetězců u pacientů s AL amyloidózou. Soubor a metody: Soubor čítal 19 nemocných se systémovou AL amyloidózou, věkový medián činil 62 let (48 – 92 let), zastoupení sekrece kappa : lambda bylo 3 : 16. Sérové hladiny VLŘ byly stanovovány systémem FreeLiteTM (The Binding Site) s užitím nefelometru Radim Delta (Radim Diagnostics) a od roku 2010 turbidimetru SPAplus (The Binding Site). Normální rozmezí sérových hladin bylo 3,3 – 19,4 mg/l v případě lehkého řetězce kappa (κ), v případě lambda (λ) pak 5,7 – 26,3 mg/l. Vzájemný poměr lehkých řetězců kappa/lambda (index κ/λ) byl určen výpočtem s normálním rozmezím 0,26 – 1,65, v případě renální nedostatečnosti pak 0,37–3,1. Výsledky: Hladiny Mlg byly prokázány v séru u 12/18 (63%) nemocných, přičemž medián hladin činil 1,69 g/l (0 – 9,8 g/l). Typizačně se jednalo ve 4 případech o kompletní molekuly izotypu IgG (2x IgG- κ , 2x IgG- λ), ve 3 případech IgA- λ a u jednoho nemocného byl zjištěn izotyp IgD- λ . U 4 nemocných byla v séru zjištěna přítomnost pouze lehkých řetězců λ . Při proteinové analýze moči byla exkrece Bence-Jonesovy bílkoviny zjištěna u 11 nemocných, ve všech případech v kvantitě nad 200 mg/24 hodin, přičemž u 2 nemocných byla navíc prokázána přítomnost kompletních molekul Mlg v moči (1x IgA- λ , 1x IgG- λ). Analýza sérových hladin VLŘ prokázala u všech nemocných abnormální hodnoty s mediánem 399 mg/l (54,4 – 2385 mg/l), přičemž patologie indexu κ/λ byla zjištěna u 17 nemocných (90 %). Závěr: Stanovení sérových hladin volných lehkých řetězců v současnosti představuje klíčový laboratorní parametr nejen v diagnostice a sledování průběhu onemocnění, ale zejména v hodnocení účinnosti podávané terapie. Kombinace standardních technik detekce MIG spolu se stanovením hladin VLŘ umožňuje monitorování naprosté většiny nemocných s AL amyloidózou. S podporou grantu NT 12451/5.

MDS, CML A PH- MPN

P4/2297.

Translokace t(2;11)(p21;q23) bez přestavby MLL genu je pravděpodobně spojena s dobrou prognózou u pacientů s MDS

Dvořák P., Lysák D., Vokurka S., Michalová K., Šárová I., Jonášová A., Hrubá M., Ryklovská A., Šubrt I. (Ústav lékařské genetiky, LF UK a FN, Plzeň; Hemato-onkologické oddělení, FN, Plzeň; Oddělení cytogenetiky, ÚHKT Praha; Centrum nádorové cytogenetiky VFN a 1. LF UK, Praha; 1. interní klinika, VFN a 1. LF UK, Praha)

Aberace chromosomů jsou nalézány u přibližně 50 % pacientů s de novo myelodysplastickým syndromem a mají velký význam při stanovení diagnózy a prognózy onemocnění. Přesto se u asi 10 % pacientů s de novo MDS nacházejí rekurentní aberace, které zatím nemají stanoven jednoznačný prognostický význam. Translokace t(2;11)(p21;q23) se vyskytuje u MDS s frekvencí přibližně 1 % a patří mezi primární aberace charakteristické pro MDS. Ukazuje se, že pacienti s touto t(2;11) mají společné klinicko-patologické znaky. Pacienti mají nižší věk ve srovnání s průměrným věkem pacientů s MDS (většina méně než 60 let) a je mezi nimi výrazná převaha mužů nad ženami (3:1). Cytologické či histologické vyšetření kostní dřeně většinou popisuje jen mírně vyjádřený myelodysplastický syndrom s výraznější dysplazií v megakaryopoeze. Nedávno bylo prokázáno, že následkem translokace t(2;11)(p21;q23) bez přestavby MLL genu není častější případ přímé aktivace onkogenu, ale zvýšení exprese miR-125b-1. U zvýšené exprese miR-125b byl prokázán vliv na expresi genů důležitých při hematopoéze, jako jsou geny JUN, STAT3 a BAK1. Většina dosud publikovaných prací zabývajících se klinickými daty pacientů s t(2;11)(p21;q23) však neměla u všech pacientů translokaci MLL genu vyloučenu. Naše studie je první, která hodnotila klinické údaje pacientů s touto translokací, kteří měli negativní výsledek při vyšetření MLL genu pomocí FISH metody. I při menším počtu pacientů v naší studii (7 pacientů) výsledky naznačují, že tato aberace by měla být spojena s dobrou prognózou. Podpořeno grantem RVO-VFN64165/2012

P8/2310.

Změny plasmatického proteomu pacientů s myelodysplastickým syndromem s refrakterní anémií

Májek P., Riedelová-Reicheltořová Z., Pečánková K., Čermák J., Suttner J., Dyr J. E. (Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha)

Refractory anemia and refractory anemia with ringed sideroblasts are two myelodysplastic syndrome (MDS) subgroups linked with anemia. MDS is a group of heterogeneous oncohematological bone marrow disorders characterized by ineffective hematopoiesis, blood cytopenias, and progression of the disease toward acute myeloid leukemia. The aim of this study was to search for plasma proteome changes in MDS patients with refractory anemia and refractory anemia with ringed sideroblasts. A total of 26 patient and healthy donor plasma samples were depleted of fourteen high-abundant plasma proteins, separated with 2D electrophoresis, and statistically processed with Progenesis SameSpots software. 55 significantly differing spots were observed and corresponded to 39 different proteins identified by nanoLC-MS/MS. Changes in the fragments of the inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 protein were observed. Using mass spectrometry-based relative label-free quantification of tryptic peptides, there were differences in alpha-2-HS-glycoprotein peptides, while no differences were observed between the control and patient sample groups for retinol-binding protein 4 peptides. This study describes plasma proteome changes associated with MDS patients with refractory anemia and refractory anemia with ringed sideroblasts. Changes observed in the inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 fragments were in agreement with our previous studies of other MDS subgroups: refractory cytopenia with multilineage dysplasia and refractory anemia with excess blasts subtype 1. Mass spectrometry-based relative quantification of retinol-binding protein 4 peptides has shown that there are differences in the modification of this protein between refractory anemia with excess blasts subtype 1 patients and MDS patients with refractory anemia and refractory anemia with ringed sideroblasts. Alpha-2-HS-glycoprotein seems to be a new potential MDS biomarker candidate. This study was supported by the Czech Science foundation P205/12/G118 and by the project (Ministry of Health, Czech Republic) for conceptual development of research organization (Institute of Hematology and Blood Transfusion).

P10/2312.

Změny proteomu krevních destiček u pacientů s myelodysplastickým syndromem

Pečánková K., Májek P., Riedelová-Reicheltová Z., Čermák J., Dyr J. E. (*Ústav hematologie a krevní transfúze, Praha*)

Myelodysplastický syndrom (MDS) je skupina onkohematologických onemocnění postihujících kostní dřeň. Onemocnění je charakteristické apoptosou hematopoetických buněk, která vede k neefektivní hematopoeze. Jedním z klinických projevů MDS může být krvácení způsobené trombocytopenií (nedostatek krevních destiček v periferní krvi) – nicméně krvácivé projevy se mohou objevovat i nezávisle na počtu krevních destiček. Cílem práce bylo nalézt změny v proteomu krevních destiček u pacientů s myelodysplastickým syndromem. Krevní destičky byly izolovány z periferní krve diferenciální centrifugací. Porovnávány byly vzorky krevních destiček pacientů s různými formami MDS (n = 10) oproti kontrolním vzorkům zdravých dárců (n = 10) vybraných tak, aby odpovídali věkem i pohlavím. Destičkový proteom byl prefractionován pomocí 1D SDS-PAGE a gely obarveny koloidní Coomassie Blue. Odlišné zóny byly vyříznuty, proteiny odlišných zón identifikovány pomocí nanoLC-MS/MS a analyzovány programem Progenesis LC-MS. Získané výsledky jsou předběžné a bude nutné jejich další doplnění a následná validace. Kompletní výsledky by mohly pomoci k hlubšímu pochopení krvácivých projevů spojených s MDS, mohly by přispět k odhalení dějů vedoucích k jeho vzniku, k objasnění role krevních destiček v tomto onemocnění, k přesnějšímu určení prognózy a k nalezení nových diagnostických metod či ke zlepšení metod dosavadních.

P18/2330.

Detekcia MPL mutácií u JAK2 negativných pacientov s MPN

Burjanivová T., Gemzová K., Marcinek J., Fossan Aas M., Lasabová Z., Plank L. (*Ústav molekulovej biológie, JLF UK a UNM, Martin – SK; Ústav patologickej anatómie, JLF UK a UNM, Martin – SK*)

Úvod: Polycythemia vera (PV), esenciálna trombocytóza (ET) a primárna myelofibróza (PMF) patria do skupiny Ph1 negativných myeloproliferatívnych neoplazií (MPN), pri ktorých sa často vyskytuje mutácia JAK2V617F. Tato mutácia sa vyskytuje takmer u všetkých pacientov s PV a u približne 60 % pacientov s ET a PMF. Jednou z ďalších mutácií, ktoré sa vyskytujú iba u pacientov s ET a PMF, sú mutácie génu MPL, kódujúceho trombopoetínový receptor. Najčastejšia mutácia je MPL - W515L/K, ktorá je zriedkavá a vyskytuje sa v malom počte prípadov JAK2 negativných pacientov. Trombopoetín a jeho receptor MPL je nevyhnutný pre prežívanie a diferenciáciu hematopoetických kmeňových buniek a spolu tvoria kľúčový regulačný faktor pre vývin megakaryocytov a tvorbu krvných doštičiek. Metodika: Doteraz sme vyšetrili rezy z 80 biotických vzoriek kostnej drene (po formolovej fixácii, dekalifikácii s EDTA a zaliatí do parafínu) od pacientov s klinicky a histopatologicky verifikovanou ET a PMF. DNA sme izolovali pomocou QIAamp DNA Micro Kitu. Použili sme primery umožňujúce amplifikáciu celého exónu 10. Proces amplifikácie prebiehal pomocou touch-down PCR. Vzorky sme sekvenovali využitím dideoxysekvencie podľa Sangera. Výsledky: Mutáciu MPL génu typu W515K sme detekovali len v jednom prípade z 80 vzoriek. V druhom prípade zmeny sekvencie bol prítomný polymorfizmus. Diskusia: Verifikovaná mutácia W515K sa podľa literárnych údajov vyskytuje u približne 5% JAK2 negativných pacientov s PMF a ET. Vzhľadom na počet vyšetrených pacientov sa počet prípadov s nami dokázanou mutáciou MPL génu zdá byť, prinajmenšom zo štatistického hľadiska, príznaky. Avšak vzhľadom na zriedkavosť mutácií MPL receptora u Ph1 negativných pacientov v populácii je nízky zachyt mutácií prirodzený. Druhým závažnejším dôvodom nízkeho počtu verifikovaných mutácií môže byť senzitivita zvolenej metódy sekvenácie. Nedávno boli publikované práce popisujúce rozdiel medzi zachytením MPL mutácií pomocou Sangerovho sekvenovania a next-generation sequencing (NGS), ktorý je značný a nemožno preto vylúčiť, že aj v našom súbore je v skutočnosti tých mutácií oveľa viac. V budúcnosti by sme chceli preto naše vzorky analyzovať skôr inou metódou ako je pyrosequencing alebo NGS, ktoré sú pravdepodobne senzitivnejšie a vhodnejšie pre túto analýzu. 1Podporené projektmi CEPV11 (ITMS: 26220120036) a MBRKM (ITMS: 26220220113), spolufinancovanými zo zdrojov EÚ.

P23/2351.

Systémová mastocytóza diagnostikovaná v súvislosti s anafylaxi po bodnutí hmyzem- zkušenosti našeho pracoviště

Lavičková A., Havlová E., Šigutová P., Kuntcherová J., Šlechtová J. (*ÚKBH FN, Plzeň; ŠPAÚ, Plzeň*)

Systémová mastocytóza je vzácné myeloproliferativní onemocnění charakterizované abnormálním růstem a hromaděním žírných buněk v jednom nebo více orgánových systémech (kůže, kostní dřeň, játra, slezina...). Onemocnění má variabilní klinický průběh od indolentní po agresivní formu. Klinicky dominují příznaky z uvolnění mediátorů žírných buněk (histamin, tryptáza, chymáza, karboxypeptidáza, heparin, chemokiny, cytokiny...). Příznaky jsou nespecifické a mohou imitovat alergické reakce, onemocnění oběhového systému, gastrointestinální poruchy, endokrinní poruchy apod. Proto může mastocytóza zůstat po dlouhou dobu nerozpoznána. Hlavním diagnostickým kritériem je histologický a imunohistochemický průkaz infiltrace kostní dřene nebo jiného extrakutánního orgánu abnormálními mastocyty. V období let 2010-2012 bylo na naší hematologickou ambulanci alergologie odesláno 10 pacientů k vyloučení mastocytózy pro zvýšenou hladinu sérové tryptázy. Jednalo se většinou o pacienty pro prodělané anafylaktické reakce na hmyzí bodnutí. Hladiny tryptázy se pohybovaly v rozmezí od 14 do 200 ug/l (fyziologické meze 0-11,4 ug/l). V tomto souboru byla diagnostikována systémová forma mastocytózy u 44 letého muže, kožní forma mastocytózy u 34 letého muže a systémová mastocytóza asociovaná s jiným hematologickým onemocněním (B-CLL) u 57 letého muže. Naše práce shrnuje možnosti diagnostiky a terapie u tohoto onemocnění.

P25/2354.

Diferenciální diagnostika „myelodysplastického syndromu“ v podmínkách nefakultního pracoviště (kazuistika)

Kadlíčková E., Rohoň P., Navrátil M., Křen L., Zimová I., Palíšek J., Staníček J. (*Hematologicko-transfúzní oddělení, Krajská nemocnice T. Bati, Zlín; Hematoonkologická klinika, FN, Olomouc; Interní hematoonkologická klinika, FN, Brno – Bohunice; Ústav patologie, FN, Brno – Bohunice; Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny, FN, Brno – Bohunice; Radiodiagnostické oddělení, Krajská nemocnice T. Bati, Zlín; Oddělení nukleární medicíny, Masarykův onkologický ústav, Brno – Žlutý Kopec*)

Myelodysplastický syndrom je heterogenní skupina klonálních onemocnění, která se vyznačuje dysplastickými změnami v kostní dřeni, (pan)cytopenií v obvodové krvi a různě vyjádřenými riziky vzniku akutní leukemie. I přes recentní významné pokroky ve vyšetřování tohoto maligního onemocnění, zůstává někdy myelodysplastický syndrom diagnózou per exclusionem, zejména pokud jde o nízké rizikovou, časnou formu choroby. Jeho odlišení oproti jiným cytopeniím nejrozumnějšího původu může být opravdu náročné, jak dokládá samotná kazuistika. V kazuistice autoři předkládají případ diferenciální diagnostiky 47-letého pacienta s dosavadní nemou interní anamnézou, který byl v srpnu 2012 přijat na interní kliniku KNTB Zlín pro těžkou pancytopenii, zjištěnou při preventivní prohlídce u praktického lékaře. Protože úvodní vyšetření směřující k vyloučení zánětu, tumoru, infekce a systémového onemocnění byla negativní, bylo vysloveno suspiciem na myelodysplastický syndrom. Je provedena trepanobiopsie, cytogenetika a FACS z kostní dřene a pacient je svěřen do péče HA KNTB Zlín. MDS však následně není potvrzen. Pacient se rychle stává závislým na transfúzích, prožívá opakované infekty. Další diferenciálně diagnostický proces komplikuje sám pacient svými opakovanými negativními reversy stran interní hospitalizace a celkovou non compliancí. Nicméně na opakovaných CT vyšetřeních je patrná narůstající splenomegalie a pak i vícečetná osteoplastická a smíšená ložiska ve skeletu pánve, které ukazují na možný lymfom nebo nehematologickou malignitu a pacient je proto odeslán k dalšímu došetření na IHOK FN Brno Bohunice. Zde je indikováno celotělové PET a nalezeno rozsáhlé ložisko viabilní nádorové tkáně v hrudní stěně. Je proveden odběr histologie a započata fáze léčby kortikoidy, která je však následována renálním selháním při tumor lysis syndromu, dialýzou, překladem na JIP, respirační selháním, překladem na ARO, kde pacient v říjnu 2012 umírá pod obrazem MOF a DIC v den stanovení diagnózy nediferencovaného sarkomu. Součástí kazuistiky bude i fotodokumentace a podrobné zprávy patologa. Cílem práce je ukázat, že odlišení myelodysplastického syndromu oproti cytopeniím nejrozumnějšího původu může být opravdu náročné a neobejde se bez pružné mezioborové spolupráce a compliance samotného pacienta. Práce byla podpořena studentským grantem LF-2013-004

P29/2363.**Prehľad laboratórnej diagnostiky a výstupy zo sledovania pacientov s CML z genetických pracovísk v SR (v rokoch 2002-2012)**

Copáková L., Leitnerová M., Hojsíková I., Hanušovská A., Dubayová K., Karabinoš A. (*Oddelenie lekárskej genetiky, Národný onkologický ústav, Bratislava – SK; Medirex a.s., Bratislava – SK; Sembid s.r.o., Košice a Prešov – SK*)

Abstrakt Chronická myeloidná leukémia je myeloproliferatívne ochorenie charakterizované prítomnosťou Ph chromozómu. European leukemia Net – ELN a National Comprehensive Cancer Network – NCCN vypracovali medzinárodne akceptované odporúčania v liečbe ale aj monitoringu CML pacientov. Na základe aktuálnej liečby TKI a potreby stanovenia jednoznačných kritérií pre definovanie 3 skupín liečebnej odpovede – optimálna, suboptimálna a nepostačujúca, bol za zlatý štandard – mílnik v hodnotení liečebnej odpovede, stanovený moment dosiahnutia cytogenetickej remisie ochorenia. Celkovo sú výstupy genetických vyšetrení vrátane sledovania hĺbky molekulovej odpovede kľúčové v sledovaní priebehu ochorenia. V rozmedzí rokov 2002 – 2012 sme analyzovali výstupy laboratórnych vyšetrení pracovísk OLG NOÚ, Medirex a Sembid, ktoré spolu zahŕňajú 100% všetkých laboratórnych vyšetrení CML v Slovenskej republike. V súbore 409 pacientov bolo 82% pacientov sledovaných dlhšie ako 18 mesiacov. Mierna prevaha ochorenia bola zaznamenaná u mužov, priemerný vek v čase nasadenia TKI bol 50,2 rokov (SD 15,1). V 12 mesiaci liečby Imatinibom dosiahlo kompletnú cytogenetickú odpoveď 59% pacientov, v 18% liečby 64% pacientov. Približne 24% pacientov na liečbe TKI nedosiahlo molekulovú odpoveď, 25% pacientov podľa minulých kritérií (v čase používania termínu veľká molekulová a kompletná molekulová odpoveď) dosiahlo ako najlepšiu odpoveď veľkú molekulovú odpoveď a 51% pacientov dosiahlo kompletnú molekulovú odpoveď. Zaujímavý bol údaj o strate kompletnej molekulovej odpovede, ktorá bola zaznamenaná v 30% prípadov. V rámci variantov miesta scelenia bol najčastejšie sa vyskytujúci variant b3a2 v 59% a druhý najčastejší bol variant b2a2 v 34%. U 15 pacientov sme detekovali oba typy zlomu a pri sledovaní molekulovej odpovede v porovnaní so skupinou s jedným zlomom sme nezaznamenali rozdiel v dosiahnutí molekulovej odpovede. Výsledky genetických analýz v závere poukázali na to, že podiel optimálnej odpovede bol vyšší v prípade štandardizovaných postupov a teda prepočítavania molekulovej odpovede podľa konverzného faktora.

P30/2365.**Komplexné variantné translokácie t(9;22) u pacientov s CML**

Svoren Z., Kutková M., Ružbacký R., Janíková P., Čermák M., Žákovičová A., Szabóová Ž., Leitnerová M., Štuková M., Copáková L. (*OLG, NOU, Bratislava – SK*)

Translokácia t(9;22)(q34;q11) je prítomná približne u 90% pacientov s chronickou myeloidnou leukémiou, pričom v malej časti Ph+ pacientov (5-10%) sa vyskytuje jednoduchý alebo komplexný variant tejto translokácie. V tejto práci prezentujeme 7 pacientov, ktorých sme vyšetrili použitím metód G-band, FISH a RT-PCR. Nájdené komplexné variantné translokácie zahŕňajú chromozómy 1, 2, 6, 14, 15 a 22. V súčasnej dobe je väčšina prípadov CML úspešne liečená imatinibom, pričom viaceré štúdie uvádzajú, že variantné translokácie nevykazujú osobitný prognostický význam.

P34/2370.**Intralaboratórny porovnaní metodík detekcie stredného a minoritného klonu paroxysmální noční hemoglobinurie prútokovou cytometrií**

Kohoutová M., Tkáčová V., Pešek A., Marinov I. (*Ústav hematologie a krvný transfúzie, laboratór prútokovej cytometrie, Praha*)

Od roku 1996 je prútoková cytometrie metódou voľby pro diagnostiku paroxysmální noční hemoglobinurie (PNH) a stanovení PNH klonů. Vzhľadom k významné heterogenitě výsledků, intra a mezi-laboratorní variabilitě používaných metod, vydala v roce 2010 mezinárodní společnost pro klinickou prútokovou cytometrii (ICCS) vůbec první guidelines pro stanovení a monitorování PNH erytrocytů (Ery), granulocytů (Gr) a monocytů (Mo). V rámci guidelines jsou doporučené 3, 4, 5, 6 barevné protokoly na detekci PNH Gr/Mo a 1 nebo 2 barevné protokoly na detekci PNH Ery. Jednotlivé protokoly se liší počtem použitých monoklonálních protilátek, jednotlivými klony protilátek a příslušnými

fluorochromy. I přes tento významný pokrok dodnes není testování PNH klonů prútokovou cytometrií plně standardizovanou metodou. Cílem práce bylo porovnat laboratorní charakteristiky 4, 5 a 6 barevných protokolů pro leukocyty, 1 a 2 barevné protokoly pro erytrocyty a stanovit intralaboratorní variabilitu jednotlivých postupů. Pro každou metodu byla provedena analýza opakovatelnosti (n=3), reprodukovatelnosti (n=10), výsledky byly vyjádřeny variačním koeficientem (CV). Citlivost jednotlivých metod byla provedena za použití materiálu v různých koncentracích. Naše výsledky potvrdily velmi dobré charakteristiky jednotlivých metod z hlediska přesnosti (opakovatelnosti) a reprodukovatelnosti, excelentní korelaci a shodu mezi metodami. Variační koeficient (CV) pro přesnost/opakovatelnost byl v rozmezí od 0,67% / 1,49% do 2,56% / 3,09% pro granulocyty, od 0,93% / 3,09% do 7,76% / 12,06% pro monocyty a od 0,41% / 4,73% do 6,53% / 5,1% pro erytrocyty. Analýza lineární regrese také potvrdila vynikající korelaci (r = 0,99%), Wilcoxonův test ukázal nepodstatné statistické rozdíly (P > 0,005), Bland-Altmanova analýza ukázala dobrou shodu metod pomocí tzv. hodnoty „mean bias“, která byla v rozmezí 0,02-2,2. Identifikace granulocytárního klonu PNH je kriticky důležitá díky jejímu diagnostickému účelu. Každá z testovaných metodik prokázala velmi dobré vlastnosti. Naše výsledky poukazují na vynikající shodu mezi jednotlivými metodami.

P41/2386.**Expresie genu Musashi 2 v průběhu CML**

Nádorníková S., Žáčková M., Lopotová T., Klamová H., Moravcová J. (*Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha*)

Musashi1 (MSI1) a Musashi2 (MSI2) tvoří evolučně konzervovanou rodinu RNA vazebných proteinů. Změny v expresi genu MSI1 byly popsány u různých typů solidních nádorů. Zvýšení exprese MSI2 se ukazuje být charakteristické pro rozvoj některých hematologických malignit. Současná data naznačují, že vysoká hladina MSI2 proteinu je u hematologických malignit asociovaná s nárůstem buněčné proliferace, poklesem buněčné maturace, horší prognózou a větší agresivitou onemocnění. Retrospektivně jsme sledovali hladinu mRNA MSI2 u 49 pacientů v rozdílných stádiích chronické myeloidní leukémie (CML) a v různých odpovědích na léčbu – 18 v diagnóze (DG), 5 ve velké molekulární odpovědi (MMR), 4 v kompletní molekulární odpovědi (CMR), 2 po transplantaci kmenových krvinek (SCT), 10 v hematologickém relapsu (HR), 6 v akcelerované fázi (AP), 4 v blastické krizi (BC) a u 6 zdravých dárců. Expresi MSI2 jsme detekovali u všech vzorků. Medián relativní exprese mRNA MSI2 u pacientů v DG byl 1,43 (0,33-3,28), v MMR 0,52 (0,20-0,62), v CMR 0,37 (0,30-0,63), po SCT 1,28 (1,02-1,54), v HR 0,41 (0,16-0,58), v AP 3,78 (1,94- 13,69), v BC 15,17 (2,61-28,15). Expresie MSI2 byla statisticky významně zvýšená u pacientů v pokročilých stádiích CML (AP, BC) ve srovnání s pacienty v chronické fázi (CP) (P<0,0001). Statisticky významný rozdíl v expresi MSI2 byl rovněž zaznamenan mezi pacienty v DG a zbývajících pacienty v CP (P= 0,0006). U pacientů v DG nebyla pozorována žádná korelace mezi vyšší expresí hladiny MSI2 a jejich pozdější odpovědí na léčbu, popř. vyšší hladiny transkriptu BCR-ABL. S cílem ověřit, zda může MSI2 exprese sloužit jako marker progresu CML, jsme dále retrospektivně monitorovali kinetiku exprese MSI2 u 6 pacientů průměrně v průběhu 27 měsíců (18-48). U pacienta v BC rostla hladina transkriptu MSI2 v souladu s nárůstem počtu leukocytů a hladiny transkriptu BCR-ABL. U pacienta s rozvíjející se AP došlo k několikanásobnému nárůstu exprese MSI2, kdežto hladina BCR-ABL zůstávala na téměř konstantní, i když vysoké hladině. Oproti tomu jsme u pacientů v HR detekovali konstantní nebo dokonce lehce sníženou hladinu MSI2 bez ohledu na nárůst počtu leukocytů a hladiny BCR-ABL. Naše výsledky potvrzují asociaci vysoké hladiny transkriptu MSI2 s pokročilými fázemi CML a naznačují, že by hladina mRNA MSI2 mohla sloužit jako molekulární marker CML progresu zejména u pacientů s trvale vysokou hladinou BCR-ABL. S podporou grantu NT/12392-4 IGA MZ-CR.

P45/2417.**A rare t(9,22,16) (q34,q11,q24) translocation in chronic myeloid leukemia for which imatinib mesylate was effective: A case report**

Tothova E., Kafková A., Copáková L., Karabinoš A., Dubayová K., Szabo J. (*Ústav lekárskej a klinickej biofyziky, LF UPJŠ, Košice – SK; Klinika hematológie a onkohematológie, FN L.Pasteura, Košice – SK; Odd.genetiky, NOÚ, Bratislava – SK; Sembid.s.r.o, Košice – SK*)

Introduction: Chronic myeloid leukemia (CML) is characterized by the t(9,22) (q34,q11) translocation, in which the BCR gene at 22q11 is fused to the ABL at 9q34. The BCR/ABL fusion gene is thought to play a role in the leukemogenesis of CML and is a target of tyrosine kinase inhibitors. About 5-10% of CML patients have complex variant translocations involving a third chromosome in addition to chromosomes 9 and 22. Several hundred CML cases with variant translocations have been reported, and the distribution of the breakpoints is clearly clustered around particular chromosomal bands such as 1p36, 3p21, 5q13, 6p21, 9q22, 11q13, 12p13, 17p13, 17q21, 17q25, 19q13, 21q22, 22q12, and 22q13. On the other hand, only a few cases involving chromosome 16 have been reported. **Material and methods:** We describe a CML-chronic phase male with a complex translocation involving chromosome 16, t(9,22)(q34,q11,q24), for which imatinib mesylate was effective, even after a new subclone, +8 appeared. A major molecular response was obtained after 14 months of imatinib therapy, and the follow-up chromosomal analysis performed 9 years after the initiation of imatinib therapy displayed a normal karyotype of 46, XY. **Discussion:** Although our case displayed a clonal chromosome abnormality (+8) in Ph+ cells at the start of the imatinib therapy, a major molecular response was achieved. Concerning the therapeutic response in the pre-imatinib era, variant Ph patients observed shorter survival than those with classical Ph translocation. The patients harboring complex variant translocations at diagnosis exhibit a poor clinical outcome because of their relative genomic instability compared to classical t(9,22)(q34q22) patients without variant translocations. On the other hand, it has been reported that patients harboring variant translocations have similar prognoses to those with classical translocation when treated with imatinib. **Conclusions:** In the present case, even after a new subclone, +8, had appeared, imatinib mesylate treatment achieved success. We think that further elucidation of the therapeutic outcome of tyrosine kinase inhibitors therapy in CML cases involving variant translocations, including clonal evolution, is necessary.

P48/2426.

Alogénna transplantácia krvotvorných buniek pri myelofibróze: skúsenosti jedného centra
Bojtárová E., Žiaková B., Mistrik M. (*Klinika hematológie a transfuziológie, L FUK, SZU a UNB, Bratislava – SK*)

Úvod: Alogénna transplantácia krvotvorných buniek (TKB) je jediná kuratívna liečba myelofibrózy, hoci je spojená so značnou mortalitou a morbiditou. Cieľom tejto práce bolo vyhodnotiť výsledky alogénnej TKB u pacientov s myelofibrózou. Pacienti a metódy: Retrospektívne sme hodnotili výsledky TKB u 10 po sebe idúcich pacientov s primárnou myelofibrózou (MF) (n=9) alebo MF po predchádzajúcej esenciálnej trombocytemii (n=1). Pacienti dostali alogénne kmeňové krvotvorné bunky z kostnej drene (n=1) alebo periférnej krvi (n=9) od identických súrodencov (n=6) alebo nepríbuzných darcov (n=4) v období od 01/1996 do 12/2011 na Klinike hematológie v Univerzitnej nemocnici Bratislava. Medián veku pacientov bol 43 rokov (rozsah, 20-63). Všetci pacienti boli v čase TKB v strednom (n=9) alebo vysokom riziku (n=1) podľa Medzinárodného prognostického skórovacieho systému (IPSS). 5/10 pacientov dostali v príprave myeloablatívny režim: 4 pacienti busulfan (BU)/cyklofosamid (CY) (1 pacient s anti-tymocytovým globulínom (ATG) pred nepríbuzenskou TKB), 1 pacient celotelové ožiarenie/CY. 5 pacienti dostali prípravny režim s redukovanou intenzitou: fludarabín (FLU)/BU/CY (n=3) alebo FLU/BU (n=2), 3 pacienti s ATG pred nepríbuzenskou TKB. Splenektómii sa podrobili 3 pacienti pred TKB. Profylaxiu reakcie štetu proti hostiteľovi (GvHD) sme zabezpečili kombináciou metotrexat + cyklosporín A (CsA), 1 pacient dostal prednisolon + mykofenolát mofetil pre renálnu toxicitu CsA. Výsledky: U 9/10 pacientov sme zaznamenali prihojenie neutrofilov (t.j. počet neutrofilov nad 0.5 G/l) v mediáne 18 dní (rozsah, 15-32), u 8/10 pacientov prihojenie trombocytov (t.j. počet trombocytov nad 50 G/l) v rozsahu 14-135 dní (medián 37 dní). Analýza chimérizmu po TKB dokázala viac ako 99% buniek darcu u 8 pacientov, 1 pacient so zmiešanou chimérou nedosiahol kompletný darcovský chimérizmus po infúzii lymfocytov darcu. Akútna GvHD št. II-IV sa vyskytla u 4 pacientov, št. III-IV u 2 pacientov, extenzívna chronická GvHD u 3/8 hodnotiteľných pacientov. Príčinou smrti bola u 2 pacientov chronická GvHD a infekcia a u 2 pacientov relaps/progresia choroby. 6 pacientov žije 0.9-16.3 (medián, 6.3) rokov, pravdepodobnosť 5-ročného prežitia má 68% pacientov. Medián sledovania žijúcich pacientov bol 6,3±5,7 rokov. Záver: Alogénna transplantácia krvotvorných buniek môže poskytnúť dlhodobé prežívanie bez relapsu choroby pre pacientov s myelofibrózou.

P57/2462.

Liečba primárnej myelofibrózy (PMF)

Nosál M., Mistrík M., Skráková M., Hrubiško M., Babál P., Plank L., Szépe P., Copáková L. (*KHAT LFUK, UNB, SZU, Nem.sv.Cyryla a Metoda, Bratislava – SK; ÚPA LFUK, Bratislava – SK; ÚPA JL-FUK, Martin – SK; NOU, Bratislava – SK*)

Úvod: V súčasnej dobe sa predpokladá, že primárna myelofibróza (PMF) vzniká zo získaných mutácií, ktoré sú namerané na hemopoetickú kmeňovú bunku a spôsobuje dysreguláciu kinázovej signalizácie, klonálnu myeloprolifériáciu a abnormálnu cytokinovú expresiu. Tieto patogenetické procesy sú nezávislé a tiež sa samostatne podieľajú na fenotypе choroby-stromálne zmeny kostnej drene, na extramedulárnej hemopoéze, ineffectívnej erytropoéze a konštitučných symptómoch. Molekulová patogenéza PMF je nedokonale chápaná, hoci rastie zoznam prítomných somatických mutácií, ktoré sú buď funkčne spojené s Janusovou kinázou (JAK) – signálny transduktor, MPL a LNK mutácie a aktivátor transkripčnej hyperaktívácie (napr. JAK2, MPL a LNK mutácie) alebo sú možno zahrnuté v epigenetickej dysregulácii transkripcie (TET2, ASXL1 alebo EZH2 mutácií). Súčasná predpoveď PMF je založená na Dynamickom Medzinárodnom Prognostickom Skórovacom Systéme (Dynamic International Prognostic Scoring System) a modele, ktorý využíva 8 nezávislých znamení horšieho prežívania a umožňuje klasifikovať pacientov do skupiny s nízkym, intermediate 1, intermediate 2 a vysokým rizikom choroby. Zodpovedajúce mediány prežitia sú odhadom určené na 15.4, 6.5, 2.9 a 1.3 rokov. Skórovací systém sa použije na plánovanie liečebnej stratégie pre jednotlivého pacienta, ktorá by mohla zahŕňať samotné pozorovanie, konvenčnú alebo experimentálnu (napr. JAK inhibítory, pomalidomid) liečbu, allogénnu transplantáciu kmeňotvorných buniek redukovanú alebo konvenčnú, splenektómiu alebo rádioterapiu. V práci diskutujeme o jednotlivých liečebných postupoch. Metódy: sledovali sme pacientov v každej liečebnej skupine podľa klinického priebehu ochorenia. Zvláštnu pozornosť autori venujú PMF 5q- syndrómu. Uvádzame dvoch pacientov PMF s 5q- syndrómom, ktorí užívajú Lenalidomid + PDN. Dvoch pacientov po splenektómii. Osem pacientov po AlloTKB, traja zomreli v peritransplantačnom období. Jedného pacienta, ktorý začal užívať JAK2 inhibítor Jakavi. Výsledky: v jednotlivých liečebných skupinách pacientov prehľadne uvádzame v tabuľkách. Záver: PMF je choroba s mnohými molekulovými znakmi. V súčasnej dobe kuratívnu metódu je alloTKB. JAK2 inhibítory samotné nemusia predstavovať dostatočnú liečebnú možnosť pri PMF, ale v kombinácii s inými liekmi sa očakáva ich osôh.

P64/2475.

Interferonem-alfa dosažená kompletní molekulární odpověď u pacienta s chronickou myeloidní leukémií nesoucí T315I mutaci

Kuba A., Faber E., Rohon P., Divoka M., Jarosova M., Indrak K. (*Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc*)

Background: CML is a clonal myeloproliferative disorder characterized by acquisition of the Philadelphia (Ph) chromosome resulting from a reciprocal translocation between chromosomes 9 and 22 t(9;22)(q34;q11), giving rise to the fusion gene BCR-ABL1. Treatment with tyrosine kinase inhibitors (TKI) has become a golden standard in current therapeutic approach. However, TKI resistance is one of the major causes of treatment failure despite rapidly evolving next generation TKIs. INF- α was one of the main treatment options before the discovery of TKIs. Reports of complete cytogenetic response (CCyR) and CMR associated with excellent long-term prognosis achieved after INF- α therapy have been published. Case report: We report a patient that was diagnosed with high-risk CML at our center. After initial cytoreduction the patient was treated with TKI imatinib for 34 months, however only partial cytogenetic response was achieved. The patient was switched to the 2nd generation TKI dasatinib on which he achieved major molecular response (MMR), nevertheless T315I mutation was detected during molecular progression after 8 months of therapy. Since there was no HLA identical donor available in marrow donors registries INF- α at dose 3MU daily was initiated. First CMR was achieved after 17 months of INF- α administration. Since then the patient has maintained fluctuating levels of bcr-abl transcript between MMR and CMR and has continued INF- α for more than 60 months. Conclusion: Our clinical case demonstrates the usefulness and safeness of INF- α in high-risk CML patients harboring T315I mutation when standard treatment (bone marrow transplantation) cannot be performed. INF- α still represents a valid option for the treatment of individually selected CML patients in TKI era. Supported by the grant IGA UP LF-2013-004.

TRANSFUZNÍ, LABORATORNÍ A EXPERIMENTÁLNÍ SEKCE

P5/2302.

Kombinovaná metodika pro studium genové regulace genu SPI1 pomocí ChIP a MeDIP

Halbhuber Z., Blatný R., Krivjanský V., Vašák J., Krivjanská M. (KRD - obchodní společnost s.r.o., Praha)

Jak je známo DNA tvoří společně s histony nukleoproteinovou strukturu, kdy se obtáčí kolem histonových oktamerů a tak tvoří základní strukturu chromatinu. Histonové modifikace (např. acetylace, metylace, fosforylace) a metylace CpG ostrůvků jsou dominantní částí mechanismů genové regulace, která vyžaduje volný přístup k DNA pro jednotlivé regulační proteiny (např. transkripční faktory) i komplexní systémy (např. RNA polymerázy). Těmito epigenetickými mechanismy jsou regulovány různé procesy zahrnuté v regulaci buněčného dělení, odpovědi na stres, diferenciaci, zánětlivé odpovědi, apoptózy. A protože tyto mechanismy hrají důležitou úlohu ve vývojových procesech, tak jsou asociovány i se vznikem a vývojem nádorových onemocnění. Efektorové molekuly často rozeznávají histonové modifikace, což bohužel také často vede ke zjednodušení při hledání určitého specifického vzoru asociovaného s onemocněním. Např. overexprese genů MUC1-4, biomarkerů u karcinomu pankreatu, je provázena acetylací H3K9 a H3K27 a trimetylací H3K4 v oblasti TSS (transcription start site). Nebo naopak jsou studie zaměřeny na hledání vzoru v metylaci DNA promotorů určitých genů, např. u MDS jsou to tumor supresorové geny CDKN2B, DAPK, RASSF1, FHIT a HIC1. Je zřejmé, že při použití epigenetické léčby např. inhibitorů DNA metyltransferáz (5-azacitidine) je výhodné znát jak samotný metylační status DNA, tak i stav kondenzace chromatinu, který může blokovat přístup vlastního efektorového proteinu. Takovým příkladem je gen SPI1 a jeho produkt – transkripční faktor PU.1. PU.1 určuje a směřuje hematopoézu jako antagonistu či kofaktor dalších transkripčních faktorů jako jsou CEBPA, EGR. Gen SPI1 obsahuje vzdálenou regulační oblast URE, která reguluje ~80% jeho exprese a umožňuje vazbu RNA polymerázy II na jeho promotor. U pacientů s mnohočetným myelomem a některých buněčných linií je oblast URE metylována, což je nezbytné pro dělení nádorových buněk. Použití demetyláz (jako je 5-azacitidin) indukuje apoptózu a zastavuje buněčný cyklus, což koreluje s pozitivní regulací PU.1. Zvýšení hladiny PU.1 bylo pozorováno i u jiných epigenetických terapií. Náš postup integruje dvě detekční metody ChIP (chromatinová imunoprecipitace) a MeDIP (imunoprecipitace meDNA) a ukazuje jejich využití u pacientů s MDS, při detekci metylačního statusu DNA v místě regulační oblasti URE genu SPI1 a zároveň stupeň kondenzace chromatinu v této oblasti. Práce byla podpořena grantem FR-TI2/509 (MPO ČR).

P7/2309.

Snížení objemu destiček po LDL-aféřeze

Bláha M., Košťál M., Bláha V., Lánská M., Filip S., Žák P. (4. interní klinika - hematologie, LF UK a FN, Hradec Králové; 3. interní klinika, LF UK a FN, Hradec Králové; Klinika onkologie a radioterapie, LF UK a FN, Hradec Králové)

ÚVOD: Jedním z nedořešených problémů při léčbě LDL-aférezou je vyhledání vhodného ukazatele, který by jednoduchou a levnou technikou umožňoval sledovat aktivitu atheromatosy a řídit intenzitu terapie. V současné době budí pozornost střední objem destiček (MPV). Pokles MPV po LDL-aféřeze by mohl být jeden z markerů úspěšné terapie. Prezентujeme vlastní výsledky měření MPV při dlouhodobé léčbě pacientů s familiární hypercholesterolemií (FH) léčených extrakorporální eliminací (EE) cholesterolu. METODY A SOUBOR NEMOCNÝCH: MPV byl vyšetřován u pacientů s těžkou FH, léčených dlouhodobě EE (3 – 12 let), a to LDL-aférezou (imunoaférezou) nebo kaskádovou filtrací. Plazma byla získávána centrifugací (separátor Cobe-Spectra, Denver, USA). K imunoaféřeze bylo použito adsorberů Lipopak 400® a ke kaskádové filtraci filtry Evaflux® 4A a 5A (Kurraray, Osaka, Japonsko). Dlouhodobě je léčena skupina 12 pacientů, 7 mužů a 5 žen. Průměrný věk: 47±16.6 roků (range 21-63, medián 52 let). Klinicky je fenotyp charakterizován zvýšenou hladinou LDL-cholesterolu a celkového cholesterolu, šlachovými xantomy a předčasným vznikem ischemické choroby srdeční. Bylo vyšetřeno 96 párových vzorků (vždy před a po proceduře u 12 nemocných – u každého během 4 let celkem osmkrát). VÝLEDKY: MPV před procedurou byl v průměru 10.891 fl, CI 10.25 - 11.53. MPV po procedurách byl 10.478 fl, CI 09.84 - 11.11. Rozdíl obou hodnot je

statisticky významný ($p = 0.036$). MPV nekoreloval s věkem, pohlavím, počtem destiček ani s délkou léčby. DISKUSE: MPV je veličina, jejíž změny by mohly pomoci při určování intenzity nebo frekvence léčby EE u pacientů s FH. Bylo zjištěno, že MPV je ve vztahu k riziku ischemické choroby srdeční nebo cévních cerebrovaskulárních chorob a aktivity atheromatosy vůbec. MCV je hodnota, která je snadno vyšetřitelná. Za poslední dva roky jsme našli kolem 50 publikací, věnovaných MCV u různých chorob. Pokud jde o vztah MCV s léčbou familiární hypercholesterolemie (nebo léčbou LDL-aférezou), jsou v literatuře ojedinělé zprávy. ZÁVĚR: Po EE došlo k statisticky významnému poklesu MPV. MPV by mohl být jeden z markerů léčebné efektivity u pacientů s FH, kteří musí být léčeni EE LDL-cholesterolu. Klinický význam nebo použití tohoto parametru k posouzení účinnosti uvedených léčebných procedur bude třeba dalším výzkumem ověřit. PODĚKOVÁNÍ: Práce byla podporována grantem IGA MZ ČR NT/13037, NT/13475-4 a PRVOUK P37/12.

P9/2311.

Změny proteomu krevních destiček u kardiiovaskulárních onemocnění

Riedelová Z., Májek P., Pečánková K., Martin M., Oravec M., Suttar J., Dyr J. E. (Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha; FN Motol, Praha)

Cardiovascular diseases are the main cause of death in the developed countries. Platelets are essential for primary hemostasis and also play a key role in the development of acute coronary syndrome (ACS). The aim of this work was to identify the proteome changes in platelets of the patients with acute coronary syndrome ($n=8$) and stable angina pectoris (SAP) ($n=7$) in comparison with two control groups as well as to compare the proteome changes between individual groups. We used two control groups: the first control group included young healthy donors ($n=8$) and the second group was a cardiac control group ($n=8$) composed of patients from Cardiology department with similar frequency of occurrence of the risk factors and excluded of ACS and SAP diagnosis. Proteome changes of platelet samples were examined using 2D SDS-PAGE (10% polyacrylamide gel, pl 4–7). The gels were stained with colloidal Coomassie blue stain and evaluated using Progenesis SameSpots software. Spots that differed significantly in the gels of all groups were excised, digested by trypsin, and further analyzed using nanoLC-MS/MS. Individual proteins were identified using MASCOT and SWISS-PROT database. We found 33 unique spots that differed significantly ($p < 0.05$) in normalized volumes. Proteins in 32 spots were identified and corresponded to 53 different proteins. We observed a fragmentation of Fermitin family homolog 3 in both patient groups. The fragmentation was confirmed both by western blot and by MS. The proteome changes reflected a partial activation of platelets in blood stream of patients with ACS and SAP, as well as the occurrence of cardiovascular risk factors. The newly described fragmentation of Fermitin family homolog 3 indicates a new point for future research and target therapy. This study was supported by the Czech Science foundation P205/12/G118 and by the project (Ministry of Health, Czech Republic) for conceptual development of research organization (Institute of Hematology and Blood Transfusion).

P11/2313.

Dynamika změn krevního obrazu po rheohemaferéze - možný vztah ke klinickým změnám

Bláha M., Košťál M., Rencová E., Langrová H., Studnička J., Lánská M., Bláha V., Rozsival P. (4. interní klinika - hematologie, LF UK a FN, Hradec Králové; Oční klinika, LF UK a FN, Hradec Králové; 3. interní klinika, LF UK a FN, Hradec Králové)

INTRODUCTION: Age-related macular degeneration (AMD) is the main cause of legal blindness among the elderly. During the course of AMD periods of long-term stabilization may occur as well as a sudden turn for the worse. Therefore, it is necessary to recognize the disease activity in time and try to stop its progress by rheohemapheresis (RHF). AIM: To identify the blood count changes that could serve as easily available markers of the rheological therapy effectiveness in patients with AMD. PATIENTS: 46 patients included in this study were suffering from the dry form of age-related macular degeneration: 17 men, and 29 women, mean age 68.9 (± 7.2) years, range: 53-86. The patients had to have diagnosis of AMD in both eyes, dry AMD in one or both eyes confirmed by fluorescein angiography and fundus photography. Controls were recruited from healthy blood donors – 20 men and 50 women mean age 41 $\pm$ 10.3 years, range: 19-61 years. RESULTS: Rheopheresis caused a decrease in hemoglobin ($p < 0.001$), leukocytes ($p < 0.034$) and increase in platelets ($p < 0.005$). We

identified the platelet/MPV ratio as a good predictor of the clinical outcome. To evaluate clinical effect (changes in the size of the DPED area before and after the treatment) we used platelet/MPV ratio. Using ROC analysis for prediction of favourable prognosis we identified criterion 21.5 ($p < 0.001$), sensitivity 76.9%, specificity 80.0%, AUC 0.817. Patients with platelet/MPV ratio above 21.5 before the last RHF had significantly better outcome ($p = 0.003$, mean regression in the DPED area was $3.35 \text{ mm}^2 (\pm 2.88)$ vs. $0.344 \text{ mm}^2 (\pm 2.63)$). **CONCLUSION:** Basic parameters of blood count significantly change during rheohemaphereses. These changes are not clinically dangerous but in the research may be of high statistical significance. The changes occur after individual RHF procedures (see above) but also during long-term follow-up due to changes in microenvironment. The ratio thrombocyte count/MPV at the end of rheopheresis is a possible laboratory marker of the patient's prognosis. **AKNOWLEDGEMENT AND DECLARATION OF INTERESTS:** The work was supported by the research task of IGA MH CZ No NT/14037. The authors report no declarations of interest.

P13/2320.

Hodnocení dimorfní populace erytrocytů na analyzátoch Sysmex XE-2100 a XE-5000

Pešková E., Rydvalová D., Smolej L. (IV. interní hematologická klinika - laboratoř, FN, Hradec Králové)

Nález dvouvrcholové distribuční křivky erytrocytů (dimorfní populace erytrocytů) je způsoben výskytem dvou a více různě velkých populací erytrocytů v periferní krvi (mikrocytů spolu s normocyty, mikrocytů spolu s makrocyty a nebo normocyty spolu s makrocyty, event. všech tří populací současně). Dimorfní populace erytrocytů je spojována s celou řadou onemocnění jako je sideropenická, megaloblastová a sideroblastická anémie, vyskytuje se také během léčby deficitu železa, po podání erythropoetinu, u hemolytických anémií, po transfúzích krve, při kombinovaném nedostatku železa a kys. listové, u hemoglobinopatií, u některých myelodysplázií apod. Variabilita laboratorních nálezů s dimorfní populací erytrocytů je značná. Analyzátoch krevních buněk Sysmex XE-2100 a XE-5000 u vzorků s vícečetným histogramem erytrocytů nevydají hodnotu šíře distribuční křivky (RDW), hodnota středního objemu erytrocytů (MCV) je označena znakem snížené spolehlivosti. MCV je průměrná hodnota objemu počítaných erytrocytů, nedává žádnou informaci o přítomnosti rozdílných populací erytrocytů. Je tedy důležité, zvláště v případech abnormálního histogramu erytrocytů, sledovat nejen numerické parametry (MCV, RDW), ale také tvar distribuční křivky. Např. při přítomnosti makrocytů spolu s mikrocyty analyzátoch může vydat i normální MCV, tedy hodnotu naprosto neodpovídající skutečnosti. Hodnotu MCV lze spolehlivě použít pouze v případech symetrických distribučních křivek. Analyzátoch Sysmex XE v případě dimorfní populace erytrocytů vydají také počty a střední objemy obou populací. Od března 2012 jsme na našem pracovišti začali systematicky sbírat klinická a laboratorní data nemocných s dimorfní populací erytrocytů. U jednotlivých pacientů jsme se snažili zdůvodnit vícečetný histogram erytrocytů a díky informacím o počtech a středních objemech obou populací jsme také mohli v některých případech sledovat vývoj laboratorních nálezů v čase. V naší prezentaci uvádíme přehled těchto laboratorních nálezů včetně několika vybraných případů.

P17/2329.

Moderní hemoterapie ve Fakultní nemocnici Olomouc

Galuszková D. (Transfuzní oddělení, Olomouc)

Úvod: Transfuzní medicína má úzkou vazbu na řadu klinických medicínských oborů, pro které je nepostradatelná. Jelikož je hemoterapie spojena také s některými nežádoucími riziky pro pacienty, dochází neustále k rozvoji nových technologií, směřujících k minimalizaci potenciálního rizika. Příspěvek představuje nové možnosti v hemoterapii, které mohou klinická pracoviště využívat pro své pacienty. Metody: K rutinně používaným postupům patří de leukotizace transfuzních přípravků (TP); v naší nemocnici je de leukotizováno 22 % erytrocytárních a 61 % trombocytárních koncentrátů, indikace určuje Číselník VZP. Významnou možností je i ozáření TP, jako prevence GVHD. Tento postup se využívá asi u 20 % produkce oddělení. Aktuálním trendem je nahrazení části plazmy v trombocytárních koncentrátech náhradním roztokem. Významně se tímto postupem sníží riziko některých potransfuzních reakcí. V předchozím roce jsme tento postup využili u 60% produkce trombocytárních koncentrátů. Pro dětské pacienty se v řadě případů využívá multikomponentního dárčovství, kdy od jednoho dárce připravujeme různé kombinace přípravků erytrocytárních, trombo-

cytárních a plazmy. V roce 2012 naše oddělení zajistilo pro čtyři imunodeficitní pacienty koncentrát granulocytů. Bylo aplikováno celkem 28 T.U. tohoto preparátu. Mezi novinky posledního roku patří patogenní inaktivace umožňující preventivně odstranit možné patogeny z trombocytárních koncentrátů a z plazmy. Přípravek je hrazen ze zdravotního pojištění, pokud jsou splněny striktní indikace. Řada klinických pracovišť využívá u rizikových pacientů klinicky velmi bezpečné SD plazmy (směsná, solvent-detergent antivirové ošetřená), kterou máme na krevní bance neustále na skladě. Závěr: Moderní postupy v transfuziologii umožňují připravit účinné a velmi bezpečné transfuzní přípravky, jejichž parametry lze dokonce individualizovat podle potřeb konkrétního pacienta.

P19/2331.

miR-155 a jeho význam pre potreby diagnózy a určenia prognózy onkologických ochorení

Jurkovičová D., Krivjanská M., Krivjanský V., Kulcsár L., Chovanec M., Gibadulinova A., Ovečková I. (KRD molecular technologies, Praha – CZ; KRD molecular technologies, Bratislava – SK; Ústav experimentálnej onkológie SAV, Bratislava – SK; Virologický ústav SAV, Bratislava – SK)

Úvod: microRNA – nekódujúce RNA molekuly dĺžky približne 22 bp sú známe regulátory exprese génov. Na bunkovej úrovni, microRNA komplementárne sa viažu na mRNA cieľových génov, zohrávajú kritickú úlohu v bunkovej proliferácii, diferenciácii, apoptóze a podieľajú sa na celkovom osude bunky. Vzhľadom na ich dobrú stabilitu in vivo a ich dôležitosť pri rozvoji ochorení, tvoria generáciu nových biomarkerov pre diagnostiku a prognostiku a nesú potenciál jedinečných terapeutických cieľov pre liečbu nádorových aj iných ochorení. Týmto umožňujú rozvoj konceptu tzv. personalizovanej medicíny zohľadňujúcej individuálne špecifiká pacienta. Cieľom personalizovanej medicíny je na základe poznania individuálnych parametrov diagnózy pacienta pred liečbou – jeho molekulárnych markerov asociovaných s diagnózou alebo prognózou daného onkologického ochorenia, liečbu efektívne nastaviť, zvýšiť jej úspešnosť, dobou prežívania pacienta a redukovat vedľajšie účinky. miR-155 patrí medzi takéto významné onkogénne markery. V procese hematopoézy miR-155 reguluje funkciu a maturáciu B a T lymfocytov. Pri vyšších hladinách pôsobí ako onkogén a stimuluje proliferáciu, lymfogenézu, nádorovú inváziu. Jeho zvýšená expresia je asociovaná s chronickou lymfocytárnou leukémiou, málobunkovým lymfómom, ako aj s agresívnymi lymfómami Hodgkinovho a neHodgkinovho typu. Ľudská miR-155 je generovaná z génu MIR155HG (BIC, chromozóm 21), ktorý je regulovaný najmenej štyrmi signálnymi dráhami: 1) transkripčnými faktormi JUNB, FOSB (FOS), 2) NF- κ B a p38/MAPK dráhou, 3) transkripčným faktorom MYB a 4) TGFB a SMAD dráhou. Metodika: Štúdium regulácie exprese MIR155HG využíva prístup chromatinovej imunoprecipitácie (ChIP), transfekovanej ChIP a metódu kvantitatívnej RT-PCR, využívaná aj pri determinácii zmien exprese jej cieľových génov. Výsledky: Získané poznatky sú východiskom pre návrh a tvorbu molekulárnych nástrojov stanovenia expresnej aktivity MIR155HG s predpokladom využitia v klinickej alebo výskumnej praxi. Závěr: Poznanie molekulárnej regulácie exprese onkogénneho markera MIR155HG a identifikácie jeho cieľov v rôznych typoch nádorových ochorení má jedinečný význam pre spresnenie diagnózy a odhadu prognózy pacienta, ako aj monitorovanie úspešnosti jeho terapie. Podakovanie: Táto práca bola podporená grantom spolufinancovaným zo zdrojov EÚ - Európskeho fondu regionálneho rozvoja prostredníctvom operačného programu Výskum a vývoj (kód projektu ITMS 26240220074/kód výzvy OPVaV-2011/4.2/07-SORO).

P20/2344.

Systém managementu kvality laboratoře pro transplantační jednotku hematopoetických kmenových buněk

Vraná M., Čechová H., Feixová H., Dobrovolná M. (Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha)

Ústav hematologie a krevní transfuze (ÚHK) je jedním ze specializovaných pracovišť poskytujících léčebnou péči pacientům s hematologickými a onkohematologickými chorobami. Součástí léčebných programů je i alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk (aloHSCT). Národní referenční laboratoř pro DNA diagnostiku ÚHK vyšetřuje HLA systém u pacientů indikovaných k aloHSCT, jejich příbuzných a vybraných nepříbuzných dárců z českých i zahraničních registrů. Úspěšnost aloHSCT je monitorována vyšetřením buněčného chimerismu. Pracoviště poskytuje tato vyšetření pro transplantační jednotku dospělých pacientů v ÚHK a dětské pacienty KDHO FN Motol. Laboratoř má aplikovaný jednotný systém managementu kvality dle ČSN EN ISO/IEC 17025

(akreditace ČIA od roku 2002) a podle ČSN EN ISO 15189 (od roku 2004). Do tohoto systému jsou též zahrnuty požadavky standardů European Federation for Immunogenetics (EFI) pro HLA genotypizaci od roku 2007, v tomto roce se laboratoř přihlásila k rozšíření o požadavky pro sledování chimerismu po alogHSCT, akreditační šetření EFI proběhne v dubnu 2013. Celý systém je nastaven tak, aby vyhovoval i standardům Joint Commission International, které splňuje celé ÚHKT. Nastavení jednotného systému managementu kvality bylo dosaženo harmonizací řízené dokumentace, která v jednotlivých svých vrstvách odráží pozornost věnovanou požadavkům na management, postavení laboratoře v rámci organizace, na systém řízení kvality (interní i externí kontroly kvality, řízení neshod, vyřizování stížností, interní audity), řízení dokumentů, přezkoumávání smluv, služeb a dodávek. Pravidelně je hodnoceno personální, prostorové a technické zajištění poskytovaných služeb, o kterém jsou vedeny řízené záznamy. Zavedením jednotného systému managementu kvality se zvýšila dohledatelnost průběhu jednotlivých vyšetření. Laboratoř tím též splňuje požadavky české legislativy, neboť dle zákona 373/2011 Sb. musí být všechny laboratoře poskytující vyšetření v oblasti testování lidského genomu akreditovány dle ČSN EN ISO 15189. Současně jsou splněny požadavky BMDW (Bone Marrow Donor Worldwide), který je mezinárodním konsorciem registrů dárců hematopoetických kmenových buněk. Dle tohoto požadavku musí být laboratoře při transplantacích centrech HSCT akreditované podle standardů EFI. Díky splnění i požadavků BMWd je pro pacienty transplantované v ÚHKT a KDHO FN Motol dostupných více než 20 milionů dárců HSC z mezinárodních registrů sdružených v tomto konsorciu.

P31/2367.

Jak oddělení a kliniky FN vyplňují požadavkové listy k rutinnímu hematologickému vyšetření?
Sekaninová P., Korelusová I., Šigutová P., Štambachová A. (*ÚKBH Lochotín, hematologický úsek, FN, Plzeň*)

Naše sdělení vychází z výsledků interního auditu, který patří mezi základní ukazatele kvality a slouží k soustavnému sledování a hodnocení podílu laboratoře na péči o pacienta. Cílem auditu bylo ověřit, zda je v praxi plně realizován systém managementu kvality v souladu se standardem Systému řízení kvality, laboratorní příručkou a požadavky NASKL v preanalytické fázi vyšetření biologického materiálu na centrálním příjmu ÚKBH FN Plzeň. Interní audit kvality se uskutečnil v únoru 2013 a sestával ze dvou částí: vlastní sledování práce při předávání biologického materiálu do laboratoře a přezkoumání již zpracovaných žádanek. Předkládáme výsledky kontroly dodržování požadavků ÚKBH na preanalytickou fázi na centrálním příjmu biologického materiálu ÚKBH FN Plzeň Lochotín a Bory týkající se požadavkových listů ve formě klasické papírové a elektronické. V laboratoři na Lochotíně byly zkontrolovány žádanky 432 pacientů. Převažoval počet elektronických požadavků (81 %). Na elektronických žádankách se uvádí datum a čas požadavku, neuvádí se datum a čas odběru. Ostatní náležitosti včetně adresy pacienta žádanky splňovaly. U papírových žádanek bylo 60 % vyplněno chybně. Nejčastější chybou (40 %) bylo neuvedení lékaře požadujícího vyšetření. V laboratoři na Borech byly zkontrolovány požadavkové listy 471 pacientů. Převažoval počet klasických žádanek (59 %), 19 % z nich bylo chybně vyplněno. Nejčastějšími chybami bylo neuvedení lékaře požadujícího vyšetření (44 %) a chybějící údaj roku odběru (44 %). Na obou příjmech byly v menší míře zjištěny nedostatky u klasických žádanek ve vyplňování data a času odběru a diagnózy. Na některých žádankách byly ručně psané údaje nečitelné; žádanky byly několikrát přeložené (problém s automatickým načtením požadavků). Zaznamenali jsme i výskyt žádanek potřísněných krví. Výsledky interního auditu nám kromě jiného umožnily porovnat práci na centrálním příjmu biologického materiálu ÚKBH ve dvou částech FN Plzeň. Audit ukazuje na nespochybnitelný přínos používání elektronických žádanek ve velkém zdravotnickém zařízení. Většina požadavkových listů odpovídala normě ČSN 15189 i NASKL II. Závažné neshody zjištěny nebyly; bylo dáno doporučení změnit nastavení elektronických žádanek ve spolupráci s pracovníky správy informačního systému. Závěry auditu byly předány vrchnímu laborantovi k projednání na pravidelných poradách s vedením klinik a oddělení FN. Sledováním činnosti na příjmu materiálu se budeme i nadále zabývat.

P32/2368.

Příklady neshod v hematologické laboratoři ÚKBH FN Plzeň

Korelusová I., Nováková R., Lajoš P., Šigutová P., Šlechtová J. (*ÚKBH Lochotín, hematologický úsek, FN, Plzeň*)

Sledování neshod a přijímání nápravných opatření je součástí správné laboratorní práce v hematologických laboratořích. Laboratoř má zavedená pravidla související s řízením neshod. Zvláštní důraz je kladen na možný opakovaný výskyt stejného typu neshod, s maximální snahou o identifikaci, zdokumentování a především odstranění základní příčiny opakování neshod. Mezi neshody řadíme provozní neshody, neshody z auditů, reklamace, stížnosti. Cílem sdělení bylo vyhodnotit neshody zjištěné na společném centrálním příjmu materiálu ÚKBH FN Plzeň Lochotín a Bory a neshody zjištěné při měření krevních obrazů a rutinní koagulace. Neshody na příjmu biologického materiálu ÚKBH se v laboratořích evidují neprodleně po zjištění ve speciálním bloku laboratorního informačního systému (LIS). Odtud se záznamy jednou měsíčně exportují pro další zpracování a vyhodnocení vedením laboratoře a manažerem kvality. Neshody při měření krevních obrazů a rutinní koagulace v hematologických laboratořích ÚKBH byly evidovány v LIS rovnou v žádance a jednou měsíčně vyhodnoceny. Porovnával se podíl nabraných zkumavek s biologickým materiálem k celkovému počtu požadavků na rutinní vyšetření krevního obrazu a koagulace Lochotín a Bory (jeden požadavek = jedna zkumavka s biologickým materiálem). Při požadavku na krevní obrasy v obou hematologických laboratořích převažuje v hodnocených neshodách sražený vzorek. Počty v jednotlivých měsících kolísají, nelze hodnotit tendenci ke zlepšení. U koagulačních požadavků na Lochotíně je převažující neshodou nepřesný odběr (poměr antikoagulantu a plné krve neodpovídá; není dodržen odběr „po rysku“). U koagulačních požadavků na Borech převažuje v hodnocených neshodách sražený vzorek. Jedním z důvodů četnosti sražených vzorků oproti nepřesnému odběru může být skutečnost, že laboratoř na Borech nepřesné odběry neposuzuje v takové míře jako laboratoř na Lochotíně. Špatný odběr (např. odběr po infuzi) se u požadavků na Lochotíně vyskytoval v minimální míře, v borské laboratoři lze přisuzovat jeho zvýšený počet nesprávnému zařazení typu neshody. Závěr: Podařilo se nastavit takový systém kontroly, který umožňuje neshody efektivně vyhodnocovat a výstupy konkrétně předkládat klientům laboratoří.

P33/2369.

Stanovení CMV specifické funkční odpovědi T lymfocytů a CMV specifických paměťových CD8+ T lymfocytů průtokovou cytometrií

Tkáčová V., Válková V., Kouba M., Kohoutová M., Pešek A., Marinov I. (*Ústav hematologie a krevní transfúze, laboratoř průtokové cytometrie, Praha*)

Cytomegalovirová (CMV) reaktivace je jedna z nejčastějších infekčních komplikací u pacientů po transplantaci kmenových buněk (SCT). Důležitou roli v regulaci CMV infekce hrají CMV specifické, paměťové CD8+ T lymfocyty (CMV CD8+ Tly). Jejich detekce je možná pomocí CMV- tetrametr testu nebo pomocí ex-vivo stanovení CMV specifické T buněčné funkční odpovědi. Naším cílem bylo porovnat, zda CMV CD8+ Tly detekované pomocí tetrametr testu produkují IL-2 a INF- γ , což by znamenalo, že CVM specifická imunita je u pacientů po SCT plně funkčně obnovena. Stanovili jsme CMV CD8+ Tly pomocí CMV tetrametr testu a ex-vivo CMV antigenem vyvolanou funkční odpověď mononukleárních buněk periferní krve u 37 pacientů po alogenní SCT. Intracelulární cytokiny (IL-2, INF γ) a tetramer pozitivní CD8+ Tly byly měřeny pomocí mnohobarevné průtokové cytometrie. Porovnání běží zatím 4 měsíce. Dosud bylo analyzováno pouze 37 pacientů v intervalech +60, +150, +240, +360 den po alogenní SCT. U 10 pacientů (37%) byla zachycena dvojí pozitivita CD8+IL-2+INF γ +. Což podle literatury ukazuje na dostatečnou CMV specifickou funkční odpověď Tly. U 7 z 10 (70%) těchto jedinců byly současně detekovány tetrametr pozitivní CD8+Tly: 203 b/μl (min. 51 b/μl, max. 759 b/μl). Žádný z těchto 10 pacientů neměl žádné závažné CMV potíže. 3 z 10 pacientů (8%) prodělali závažnou CMV nemoc. U těchto jedinců nebyly detekovány tetrametr pozitivní CMV CD8+ Tly ani lymfocyty produkující IL-2 a INF γ . Z dosavadních výsledků zatím můžeme říci, že ex vivo stanovení CMV specifické funkční odpovědi T lymfocytů a stanovení CMV CD8+ Tly tetramer testem spolu navzájem koreluje. V budoucnu by nám mohly podávat informaci o imunitní rekonstituci CMV specifické imunity u konkrétních pacientů a nápomoci zahájit anti-CMV terapii.

P35/2371.

Výsledky paralelného monitorovania chimérizmu po alogénnej transplantácii krvotvorných buniek (alo-TKB) dvomi metódami molekulovej genetiky

Hanušovská E., Šufliarska S., Bojtárová E. (*Medirex, a.s. Klinická genetika, Bratislava – SK; Transplantačná jednotka kostnej drene, LF UK a DFNSP, Bratislava – SK; Klinika Hematológie a transfuziologie, LFUK, SZU, FNSP, Bratislava - SK*)

Úvod: V posledných desaťročiach vzrastá význam alogénnej transplantácie kmeňových krvotvorných buniek (alo-TKB) ako ďalšej liečebnej možnosti pri onkologických aj neonkologických ochoreniach. Jedným z prostriedkov na správne manažovanie pacienta po alo-TKB je meranie chimérizmu príjemcu. V našej štúdii sme porovnávali 2 molekulové metódy pri tých istých pároch darca/príjemca v rovnakých časových intervaloch. Jednalo sa o relatívnu kvantifikáciu SNP, rep. NPs metódou Real-time PCR (RQ PCR) a fragmentačnú analýzu (FA) kvantifikácie PCR produktov STR markerov na genetickom analyzátoe. Metódy: Na izoláciu DNA boli použité vzorky periférnej krvi pred transplantáciou na získanie informatívnych markerov a následne v presných časových intervaloch po alo TKB na meranie chimérizmu. (N = 65 párov darca/príjemca z oddelenia KHaT v Bratislave). Vzorky sa analyzovali v Medirexe a DFNSP v Bratislave. Pri RQ PCR sa používali PCR mixy so SYBR green a 12 špecifických párov primerov pre dve alelické variácie polymorfizmov a kontrolného génu GAPDH. Na analýzu STR sa použil komerčný kit na STR multiplexnú amplifikáciu s fluorescenčne značenými primermi. Kvantifikácia markerov darcu a príjemcu sa vypočítala z plochy píku analyzovaného markera. Výsledky: Zoskrútovali sme 65 príbuzenských a nepríbuzenských párov darca/príjemca a našli sme v každom prípade minimálne jeden informatívny marker. Po alo-TKB sa oboma spomentými metódami meral chimérizmus v presných časových intervaloch (zväčša 30, 100 dní, 1rok, 2roky, 3roky po alo-TKB). Porovnaním výsledkov sme zistili, že úplná zhoda kvantifikácie bola v 2% a diskrepancia bola zaznamenaná tiež v 2%. Pokiaľ sa jednalo o výsledky zmiešaného chimérizmu (MC) v rozpätí od 1-50% autológných DNA markerov, dostali sme podobné výsledky. Avšak kompletný chimérizmus (CC) potvrdený metódou fragmentačnej analýzy (FA) na genetickom analyzátoe bol v prípade kvantifikácie RQ PCR vyhodnotený v 94% ako zmiešaný chimérizmus (MC) hlavne v prvom pol roku až roku po alo TKB. Príklad paralelného monitoringu dvoma metódami je na Obr.1. Záver: Obe porovnávané metódy sú vhodné na meranie chimérizmu po alo TKB, avšak majú rôznu citlivosť. RQ PCR má vyššiu citlivosť na zachytenie nízkych koncentrácií autológných markerov (<1%) ako FA, čo umožňuje skôr odhaliť prípadný prichádzajúci relaps. Na druhej strane však kvantifikácia darcovských markerov sa ukázala byť presnejšia metódou FA.

P36/2372.

Diagnostický panel vyšetrení hereditárnej sférocytózy na hematologickém úseku ÚKBH FN Píseň

Nováková R., Korelusová I., Šlechtová J., Koptová L. (*ÚKBH hematologický úsek, FN, Píseň*)

Hereditárna sférocytóza (HS) je najčastejší vrodená hemolytická anémia v bēlošské populácii s prevalenciou 1:2000 až 1:5000 prevažne autosomálne dominantní dedičnosť. Příkladnou sférocytózy je nedostatečná tvorba alebo defekt některého z membránových proteinů erytrocytů vedoucí ke ztrátě přirozeného tvaru, zvýšené propustnosti a osmotické křehkosti membrány, snížené plasticitě a energetickému deficitu s obrazem extravaskulární hemolýzy. Současná laboratorní diagnostika se opírá o zvýšené hodnoty nepřímého bilirubinu, snížené hodnoty červeného krevního obrazu, mikroskopický nálezy sférocytů, zvýšený počet retikulocytů, sníženou osmotickou rezistenci (OR), zvýšený PINK test a negativní přímý antiglobulinový test. Dalšími diagnostickými testy jsou autohemolýza, kryohemolýza, průtoková cytometrie s eosin-5-maleimidem, elektroforéza membránových proteinů či molekulární genetiky. V naší laboratoři tvoří diagnostický panel HS krevní obraz, počet retikulocytů, mikroskopický nálezy sférocytů, OR a PINK test. Technicky a časově náročnou autohemolýzu neprovádíme, kryohemolýzu jsme pro nízkou výpovědní hodnotu nezavedli. Nově jsme zavedli výpočty vycházející z parametrů krevního obrazu a retikulocytů měřených na analyzátoe LH 750, který dokáže při měření retikulocytů stanovit střední objem sférovaného erytrocytu (MSCV). Principem je schopnost erytrocytu přijímat v hypotonickém prostředí tekutinu. U takto modifikovaného zakulaceného erytrocytu se měří objem MSCV. U sférocytů dojde dosažením limitního osmotického objemu k fragmentaci buňky a k poklesu MSCV. U zdravých lidí je tento objem větší než střední objem erytrocytů (MCV), ale pacienti s HS mají MSCV nižší než MCV. Výpočty potvrzující diagnózu HS: 1.

rozdíl (MCV-MSCV) je vyšší než 9,6 fl a 2. poměr (MSCV/MCV)*100 je větší než 94,8 %. Cíl: Ověřit pravdivost těchto výpočtů na vybraném souboru pacientů. Výsledky: Soubor pacientů (n=16) tvoří 7 dětských pacientů ve věku 4-11 let (medián 7 let) a 9 dospělých pacientů ve věku 21-80 let (medián 40 let). U dětí jsou mediány hodnot MCV 82 fl (76,0-90,6fl), MSCV 66,2 fl (57,7-70,8fl), (MSCV/MCV) 78,1 % (75,0-82,0%) a (MCV-MSCV) 18,3 fl (15,3-20,4fl). U dospělých jsou mediány hodnot MCV 87,9 fl (79,8-94,0fl), MSCV 70,6 fl (62,5-80,7fl), (MSCV/MCV) 83,5 % (71,8-87,9%) a (MCV-MSCV) 14,6 fl (10,6-24,5fl). Závěr: Výsledky ověřovaných výpočtů souboru splnily v 94 % uvedená kritéria. Vedle přesvědčivého výsledku výpočtů je velkou výhodou časová, technická a finanční nenáročnost.

P42/2400.

Umělé cévní protězy potažené fibrinovou sítí s extracelulárními proteiny

Riedel T., Chlupáč J., Filová E., Bačáková L., Brynda E., Dyr J. E. (*Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha; Klinika transplantací chirurgie, IKEM, Praha; Fyziologický ústav, AV ČR, v.v.i., Praha; 1. Ústav makromolekulární chemie, AV ČR, v.v.i., Praha*)

Syntetické cévní protězy užívané v cévní chirurgii ve formě bypassu selhávají na podkladě trombózy a intimální hyperplázie. Tyto umělé cévní protězy, nejčastěji z polyetylentereftalátu, nepodporují adhezi a proliferaci endotelových buněk. V okamžiku kontaktu krve s jiným povrchem než je endotelová monovrstva na vnitřní straně cévy dochází k aktivaci koagulace. Fibrinová síť, která se následně vytvoří, slouží jako dočasný podpůrný materiál pro buňky, účastníci se regenerace. Tyto fyziologické procesy pomáhají organismu udržovat hemostázu, nicméně v případě kontaktu krve s umělým materiálem způsobují trombotické komplikace, zejména u umělých cévních protéz s malým průměrem. Konfluentní vrstva endotelových buněk na povrchu protězy by mohla tuto komplikaci vyřešit. Cílem této studie bylo připravit povrchové modifikace umělých cévních protéz umožňující vznik monovrstvy endotelových buněk. Cévní protězy byly modifikovány fibrinovou sítí s regulovanou tloušťkou. Pro vyhodnocení vlivu extracelulárních proteinů byla fibrinová síť dále modifikována kolagenem, lamininem a fibronectinem. Všechny sledované modifikace povrchu vedly k vyšší hustotě buněk na povrchu v porovnání s nemodifikovanou protézou. Imunofluorescenční barvení talinu a vinkulinu znázornilo vznik fokálních adhezivních plaků. Na fibrinových sítích bylo nalezeno větší množství exprimovaného CD31 a von Willebrandova faktoru a zároveň nižší koncentrace ICAM-1 než v případě nemodifikované protězy. Tyto výsledky naznačují, že modifikace fibrinových sítí extracelulárními proteiny lze použít k podpoře endotelizace umělých cévních protéz.

P43/2401.

Hemoglobinopatie v české a slovenské populaci

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

Hemoglobinopatie - talasemie (tal) a strukturní hemoglobinové (Hb) varianty - jsou nejrozšířenější monogenní dědičné nemoci na světě. Postihují 7 % světové populace. Výskyt těchto typů vrozených anemií je ve střední Evropě vzácný, ale s imigrací populace ze Středomoří a z východní Asie jejich počet roste. V posledních letech jsme v české a slovenské populaci detekovali tal alely u více jak 330 rodin a strukturní Hb varianty u téměř 40 rodin. Aktualizované výsledky jsou pravidelně prezentovány na OHD. Dosud bylo v ČR a SR identifikováno 25 β-tal mutací u více jak 400 heterozygotů s projevy tal minor, příp. tal intermedia. Mezi nimi bylo 5 nových β-tal mutací. Nejnověji bylo zjištěno, že inserce retrotranspononu do 2. intronu β-globinového genu je novým mechanismem vzniku β-tal z tlumení exprese z důvodu hypermetylace DNA a deacetylase chromatinu v oblasti β-globin-L1 promotoru (Láníková et al, zasláno k publikaci). Zjistili jsme i 3 deleční typy δ/β-tal. Vedle relativně častých - Sicilské δ/β-tal a Hb Lepore jsme v roce 2012 identifikovali i vzácnou Makedonskou δ/β-tal delecii u pacienta původem ze Středomoří. Molekulárně-genetické analýzy pro možnou přítomnost α-tal mutací byly dosud provedeny u 90 nemocných; u 34 z nich byla potvrzena deleční forma α-tal, mezi nimi i nový typ delecce regulační oblasti HBA lokusu (HS-40 delecce). Kromě nosičů vzácných β-tal alel s dominantní dědičností mají všichni ostatní pacienti s β-tal - heterozygoti pro mutovanou globinovou alelu - fenotyp β-tal minor. Heterozygoti s α-tal delecí (-α/αα, -α/αα, -α/α) jsou klinicky asymptomatictí resp. mají fenotyp α-tal minor. Klinicky závažné formy tal intermedia a major jsou v ČR a SR vzácné, přesto jsou

v posledních letech zjišťovány díky imigraci z malarických oblastí. Zjistili jsme jak kombinace dvou typů β -tal mutací u dvojíých heterozygotů, tak kombinace α -tal-1 a α -tal-2 delece u pacienta s HbH a kombinaci HbS s α -tal delecí u česko-afričské rodiny. V naší populaci jsme identifikovali 15 β -globinových Hb variant, vesměs s nestabilní Hbpatí s projevy hemolytické anémie, ale i nosiče vzácných variant s vysokou afinitou Hb ke kyslíku s familiární polycytémií. V roce 2012 jsme poprvé v ČR diagnostikovali HbC u imigranta ze Středomoří. Předmětem našeho sdělení je popis zajímavých případů vzácných vrozených anemií s prezentací klinických a molekulárně genetických výsledků včetně popisu metody. Podpořeno granty: IGA NT11208, IGA NT13587, LF_2013_004 a LF_2013_010.

HEMOSTÁZA

P44/2402.

Heparinem indukovaná trombocytopenie - nové pohledy a vlastní zkušenosti

Novotný J., Penka M., Zavřelová J., Kessler P., Gumulec J., Pavlík P. (OKH, FN, Brno; OKH, Pelhřimov; ÚKH, FN, Ostrava; CKCHTO, Brno)

Syndrom heparinem indukované trombocytopenie (HIT) představuje nejzávažnější komplikaci léčby hepariny s velkou klinickou i laboratorní variabilitou, který se týká vzhledem k ubikvitárnímu užití heparinů v prevenci i léčbě hyperkoagulací prakticky všech odvětví klinické medicíny. Jako u všech relativně vzácnějších syndromů je nutno na něj především pomýšlet v diferenciální diagnostice trombocytopenie a hyperkoagulace, dále je nutno od 5. dne aplikace zvláště nefrakcionovaných heparinů pravidelně kontrolovat počet destiček. Laboratorní diagnostiku HIT je výhodné vzhledem k řadě problémů soustředit do větších center s náležitou zkušeností, HIT je nutno konfirmovat baterií dvou a více laboratorních testů s vědomím, že negativní testy nevylučují klinickou diagnózu HIT s absolutní jistotou. Léky volby představují přímé inhibitory trombinu, nadějnými se zdají pentasacharidy. Jedině randomizované multicentrické studie mohou zodpovědět řadu dalších nevyřešených otázek, vzhledem k relativní vzácnosti HIT je však obtížné tyto studie realizovat. Autoři referují o vlastním souboru 6 pacientů s potvrzenou diagnózou HIT.

P68/2496.

Možnosti laboratorní kontroly nových antitrombotik

Úlehlová J., Slavík L., Krčová V., Hluší A., Procházková J., Palová M. (HOK, FN, Olomouc)

V posledních letech jsou do klinické praxe postupně zaváděna nová antitrombotika. Mechanismus jejich působení je rozdílný. Jedná se o přímé inhibitory trombinu (dabigatran) a inhibitory faktoru Xa (rivaroxaban, apixaban, edoxaban aj.). Dabigatran-etexilát je proléčivo o malé molekule, které nevykazuje žádnou farmakologickou aktivitu. Po perorálním podání se dabigatran-etexilát rychle vstřebává a je v plazmě a v játrech konvertován na dabigatran cestou hydrolyzy katalyzované esterázou. Dabigatran je silným kompetitivním, reverzibilním a přímým inhibitorem trombinu, a je hlavním účinným činitelem v plazmě. Protože trombin (serinová proteáza) umožňuje v koagulační kaskádě přeměnu fibrinogenu na fibrin, jeho inhibice brání vzniku trombu. Dabigatran inhibuje jak volný trombin tak, trombin navázaný na fibrin a trombinem navozenou agregaci krevních destiček. Pro detekci hladiny dabigatran etexilátu je možné použít, jak klasické testy (aPTT), tak moderní specifické testy (diluovaný trombinový čas). APTT test stejně jako trombinový test má omezenou citlivost a není vhodný pro přesné monitorování antikoagulačního účinku dabigatranu. Pro stanovení přesné hladiny léku by měly být provedeny citlivější kvantitativní testy, jako je kalibrovaný dilutovaný trombinový čas (dTT) či ekarínový test. Při použití dTT jsou koncentrace dabigatranu nad 200 ng/ml měřené v době nejnižší koncentrace při dávce 150 mg dvakrát denně (10-16 hodin po předchozí dávce) spojeny se zvýšeným rizikem krvácení. Ke kontrole rivaroxabanu nelze použít INR, je kalibrováno pouze pro kumariny, použít jen při přechodu na warfarin. Nejvhodnějším testem pro monitorování rivaroxabanu je specificky kalibrovaný anti FXa. V případě krvácivých komplikací musí být léčba přerušena, zjištěn zdroj krvácení a substitucí zajistit jeho omezení. Protože se dabigatran vylučuje převážně renálně, musí být udržována adekvátní diuréza. Nová antikoagulační postupně nahrazují doposud užívaný warfarin. Nejvíce praktických zkušeností je v současné době s dabigatranem. Podpořeno grantovým projektem LF-2013-004.

P69/2497.

In vitro detekce inhibice agregace trombocytů acetylosalicylovou kyselinou

Úlehlová J., Slavík L., Krčová V., Hluší A., Procházková J., Palová M. (HOK, FN, Olomouc)

Souhrn: V dnešní době stále vzrůstá počet informací o příčinách a patogenetických mechanismech velmi časných manifestací ischemické choroby srdeční ve formě akutního infarktu myokardu (AIM). Běžnou součástí sekundární prevence AIM je antiagregační léčba kyselinou acetylosalicylovou (ASA) a thienopyridinovými deriváty. Tato léčba však může být u 5–20 % pacientů neúčinná z důvodu rezistence na antiagregační léky. Nejprve byl tento fenomén popsán při podávání kyseliny

acetylsalicylové a následně u thienopyridinů. Příčiny těchto rezistencí jsou multifaktoriální a jejich laboratorní stanovení využívá více možných detekčních způsobů. Jelikož genetická predispozice v polymorfismu destičkového receptoru COX-1 není jedinou příčinou rezistence, hledali jsme vyšetření, které by pomohlo odhalit nedůslednost pacienta při užívání léčiva nebo problémy spojené se vstřebáváním účinné látky. Materiál a metody: Vyšetřili jsme skupinu 124 pacientů s AIM, kteří užívali jako antiagregační terapii ASA. Pomocí impedanční agregometrie na analyzátoru Multiplate, po podání ASA, byla měřena agregace trombocytů po stimulaci arachidonovou kyselinou (1 μ mol/l). Základ tvořily pilotní poznatky získané z měření vlivu ASA in vitro. Pro další specifické měření byli dále vybráni pacienti, kteří neodpovídali na antiagregační léčbu tj. 22,32% pacientů. Vzorky jejich krve byly inkubovány s příslušným množstvím ASA, které odpovídá denní dávce 50-500 mg. 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. Ve dvou případech je však patrná změna aktivity destičky až při velmi vysoké dávce ASA. Můžeme zde usuzovat již zmíněné příčiny selhání antiagregační terapie a je nutné změnit léčbu. Závěr: Prostřednictvím této metody lze vyloučit poruchu destičkového receptoru, a tím odhalit nepravdivý příjem léčiva či poruchu vstřebávání. Většina pacientů měla detekovanou dostatečnou odpověď na přítomnost ASA. 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, interakce s ostatními medikamenty. Je nutné však vyloučit compliance pacienta. Podpořeno grantovým projektem LF-2013-004.

P70/2498.

Heparinem indukovaná trombocytopenie (soubor pacientů+ kazuistika)

Slavík L., Svobodová G., Úlehlová J., Krčová V., Hluší A., Procházková J., Indrák K. (HOK, FN, Olomouc)

Cíl: Heparinem indukovaná trombocytopenie (HIT) představuje závažnou komplikaci použití heparinu. IgG protilátky aktivující destičkový faktor 4 (PF4) spouští klinickou manifestaci HIT. Pouze část protilátek však disponuje schopností aktivovat destičky a tyto mohou být identifikovány agregací destiček (funkčním vyšetřením). Heparinem-indukovaná agregace destiček (HIPA) a 14C-serotonin release (SRA) assays pro stanovení HIT představují zdoluhavá a náročná vyšetření. Metody: Pro stanovení HIT bylo použito impedanční agregometrie na analyzátoru Multiplate® (MEA) jako heparinem indukované agregační techniky a Technozym HIT Ig ELISA test (Technozym HIT GmbH, Vídeň, Rakousko). MEA metoda využívá senzibilizace dárcovských destiček plasmou pacienta v přítomnosti heparinu v koncentraci 0,5 IU/ml. MEA stanovení bylo prováděno: 300 μ l citrátové plné krve s dárcovskými trombocyty, 150 μ l heparinu (konečná koncentrace 0,5 resp. 100 IU/ml) a 300 μ l plasmy chudé na destičky (PPP) vyšetřovaného pacienta. Změny v agregaci byly monitorovány po dobu 20 min. Výsledky: Výsledky ELISA vyšetření byly vyhodnoceny jako negativní při OD < 0.300, suspektní (0.300–0.800) a pozitivní OD > 0.800. Ve vyšetřeném souboru 100 pacientů, demonstrujeme rozdíly mezi agregačním a ELISA stanovením. Současně se nám podařilo detekovat velmi vysoké titry protilátek, kde je nutná modifikace agregometrického stanovení na základě vysokého ředění plasmy pacienta. Podpořeno grantovým projektem LF-2013-004.

P71/2499.

Trombofile jako možná příčina ischemických cévních mozkových příhod

Slavík L., Kral M., Skoloudík D., Úlehlova J., Krcova V. (HOK, FN, Olomouc; FN, Olomouc)

Cíl: V prospektivní studii bylo vyšetřeno 102 pacientů s ischemickou cévní mozkovou příhodou přijatých na všeobecném Strokovém Centru. Pacienti byli zařazováni do studie do 12 hodin od záchvatu mrtvice. Vyšetření při příjmu sestávalo z: 1 / akutní mozkové počítačová tomografie nebo magnetická rezonance 2 / markery trombofilie 3 / EKG 4 / jícnová nebo transthorakální echokardiografie, 5 / neurosonologické vyšetření 6 / EA. Hlavním cílem projektu je identifikovat rizika trombofilie u pacientů s projevem akutní ischemické cévní mozkové příhody. Cílem naší studie bylo zjistit riziko trombofilie u pacientů s projevy akutní ischemie. Proto jsme vyšetřovali pacienty na přítomnost vrozené a získané trombofilie. Metody: Pro stanovení rizika vrozené trombofilie byly vyšetřovány inhibitory

koagulace - AT III, protein C, protein S, APC rezistence jako mutace FV Leiden, mutace FII 20120 G / A a PAI-1 4G/5G. Pro posouzení vlivu získané trombofilie byly vyšetřovány hladiny FVIII, F IX, F XI a lupus antikoagulans. Výsledky: V naší skupině pacientů jsme zjistili vyšší incidenci trombofilie ve srovnání s kontrolní skupinou stejného stáří. Co bylo zvláště významné, je vyšší výskyt získané trombofilie ve formě lupus antikoagulans ve vyšším věku, který signifikantně koreluje s tíží ischemie podle NISSH. Skupina pacientů s pozitivním lupus antikoagulans má NISSH střední skóre 13 oproti skupině s negativním nálezem lupus antikoagulans, kde bylo skóre NISSH 6. Závěr: Riziko trombofilie je jeden z hlavních spouštěčů mozkové ischemie. Nicméně, naše výsledky ukazují, že vrozené riziko hraje mnohem menší roli než získané trombofilní stavy. Z tohoto důvodu je důležité, aby se u rizikových pacientů s podezřením na mozkovou ischemii vyšetřovaly získané rizikové faktory, zejména lupus antikoagulans. Podpořeno grantem IGA NT11046 a LF-2013-004.

P72/2500.

Dysfunkce endotelu u těhotných s chronickou formou hypertenze

Procházková J., Procházka M., Slavík L., Úlehlová J., Dhaifalah I., Lubušský M., Šimetka O. (HOK, FN, Olomouc; FN, Olomouc)

P73/2501.

Ciklosporin A u refrakterní imunitní trombocytopenie po splenektomii

Hluší A., Sztokowski T. (HOK, FN, Olomouc)

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



**XXVIII. OLOMOUCKÉ
HEMATOLOGICKÉ DNY
1.–3. 6. 2014**

www.olhemdny.cz