

## Postery

### P1 / 1502.

#### Duplicitní malignita MDS a B-CLL jako příčina pancytopenie – popis případu

Vondráková Jana, Pikalová Zuzana, Rohoň Peter, Novák Martin, Szotkowski Tomáš, Hubáček Jaromír, Jarošová Marie, Indrák Karel, Kučerová Ladislava, Černá Michaela, Repovský Štefan (*HOK FN a LF UP, Olomouc; Ústav patologie FN a LF UP, Olomouc; Středomoravská nemocniční a.s., Nemocnice, Přerov*)

60-letý muž, který dosud vážněji nestonal, byl hospitalizován na interním oddělení pro únavový syndrom a dušnost. Byla zjištěna anémie, která vyžadovala podání transfúzí. Podrobnými vyšetřeními však její příčina nebyla objasněna, a proto byla indikována sternální punkce, na jejímž základě byla vyslovena suspekce na MDS. Následně byl pacient odeslán ke konzultaci a provedení cytogenetického vyšetření. Při vstupním vyšetření byl fyzikální nálezy v normě, hodnoty leukocytů 2,32x10<sup>9</sup>/l, Hb 83 g/l, trombocyty 74x10<sup>9</sup>/l, neutrofily 0,5x10<sup>9</sup>/l, lymfocyty 1,7x10<sup>9</sup>/l, v MD segmenty 11%, tyče 7%, eosinofily 1%, monocyty 5%, lymfocyty 76%. Aspirát kostní dřevě (KD) prokazuje normocelulární kostní dřevě s dysplastickými změnami všech řad, 8% myeloblastů a 14% lymfocytů, imunofenotypizačně prokázána infiltrace myeloblasty CD33+, CD13+, CDw65+, CD34+, CD117+ a překvapivě klonální infiltraci 20% buněk B-CLL (CD19+, CD20+, CD22+, CD23+, CD5+, IgM/D lambda). Nově tak byla diagnostikována současná duplicita MDS typu RAEB I, IPSS 1,5 (int-2), WPSS 4 (high) a B-CLL C Binet. Cytogenetické vyšetření doplněné metodou FISH potvrzuje nálezy odpovídající oběma jednotkám – 2 patologické klony s trisomií chromozomu 12 a trisomií chromozomu 8. Trepanobiopsie KD svědčí pro MDS i B-CLL. PET/CT odhaluje pozitivitu uzlin v oblasti třísel (11x8x16mm), krku (23x10mm) a mediastina (10mm). Byla zahájena terapie rituximabem, podány 4 cykly, postupně však dochází k progresi pancytopenie, kontrolní vyšetření KD prokazují lehkou redukci klonu B-CLL (na 13%) s vymizením znaku CD20+, ale vývoj AML (35% myeloblastů), cca za 2 měsíce od dg. MDS/CLL. Proto bylo indikováno podání indukční chemoterapie. Zvolen byl redukovaný režim dle protokolu FLAG tak, aby cytostatika byla cílena na obě malignity. Léčba byla komplikována G+ sepsí při odontogenním fokusu a mykózou plic, nicméně bylo dosaženo kompletní remise choroby, resp. obou souběžných malignit. Autoři poukazují na význam komplexního laboratorního vyšetření v dif. dg. pancytopenie, zejména pak přínos průtokové cytometrie i u zdánlivě jasného případu MDS, která odhalila další souběžnou klonální malignitu a možnost úspěšné individuální modifikace terapeutického postupu. Práce podpořena VZ MŠMT ČR 6198959205 a IGA MZ ČR NR/9481-3

### P2 / 1488.

#### Deregulace microRNAs v progenitorových buňkách pacientů s 5q- syndromem

Bruchová Hana, Merkerová Michaela, Vašíková Alžběta, Beličková Monika, Neuwirtová Radana, Čermák Jaroslav (*ÚHKT, Oddělení molekulární genetiky, Praha; I. interní klinika 1. LF UK a VFN, Praha*)

Intersticiální delece na dlouhém raménku chromosomu 5, del(5q), je nejčastější delece nalézána u pacientů s de novo myelodysplastickým syndromem (MDS). Tato delece se vyskytuje jako izolovaná abnormalita karyotypu u MDS pacientů s 5q- syndromem, který se klinicky i molekulárně liší od ostatních MDS subtypů. Patofyziologie 5q- syndromu je zřejmě spojena s haploinsuficiencí genů lokalizovaných v deletované oblasti, avšak další mechanismy se mohou podílet na selhání funkce kostní dřevě. Řada studií již prokázala, že microRNAs (miRNAs) regulují hematopoézu a jejich aberantní exprese může přispívat ke klonální expanzi buněk. Proto jsme se zaměřili na detekci odlišně exprimovaných miRNAs v progenitorových buňkách pacientů s 5q- syndromem. Celková RNA byla izolována z CD34+ buněk kostní dřevě získané od 5q- pacientů a kontrolních jedinců. Expresní profily miRNAs byly stanoveny pomocí microarray metody založené na real-time PCR tzv. TaqMan Low Density MicroRNA Array detekující expresi 365 miRNAs. Komparativní analýza (p<0.05) identifikovala 38 deregulovaných miRNAs u 5q-pacientů. Zvýšenou expresi vykazovaly např. let-7b, miR-199a, miR-338, miR-410. Výrazně zvýšená exprese byla také pozorována u miR-34a s proapoptotickou funkcí, která se zřejmě může podílet na zvýšené apoptóze pozorované u low-risk MDS. Signifikantní downregulace byla detekována např. u miR-135b, miR-203, miR-369-5p, miR-429, miR-589. miR-203 je často hypometylovaná u hematologických malignit a reguluje gen ABL1. V deletované oblasti 5q31-q32 se nacházejí geny pro miR-143, miR-145 a miR-378. U pacientů však byly miR-143 a miR-145 exprimovány na stejné hladině jako u kontrol a pouze exprese miR-378 byla snížena. V programech TargetScan and Miranda byla provedena in silico predikce potenciálních cílových genů deregulovaných miRNAs a zároveň byly stanoveny mRNA profily buněk pomocí celogenomových Illumina microarrays. Kombinace dat z těchto dvou analýz vedla k identifikaci genů, jejichž exprese vykazovala negativní korelaci s expresí deregulovaných miRNAs: miR-299-5p/H3F3B, TP53INP2 a miR-34a/KLF4, LEF1, NR4A2. Tyto geny tak mohou představovat kandidátní cílové molekuly daných miRNAs. Výsledky studie dokumentují, že specifický profil miRNAs je asociován s 5q- fenotypem a taktéž na možné zapojení aberantně exprimovaných miRNAs do patogeneze MDS prostřednictvím deregulace cílových genů. Podpořeno grantem IGA: NR/9236 MZ ČR.

**P3 / 1457.****Průkaz dárcovského B-lymfomu u pacienta po transplantaci kostní dřeně**

Hilská Irena, Kalinová Markéta, Augustiňáková Alena, Mrhalová Marcela, Kodet Roman, Keslová Petra (*Ústav patologie a molekulární medicíny, Klinika dětské hematologie a onkologie, 2.LF UK a FN Motol*)

Akutní lymfoblastická leukémie (ALL) je závažné onemocnění krvetvorby postihující převážně děti. Základem terapie ALL je kombinovaná cytostatická léčba. V některých případech u typů ALL s vysokým rizikem relapsu se přistupuje po dokončení prvotní terapie k transplantaci kostní dřeně (TKD). Autologní TKD je zatížená vysokým procentem relapsů, proto se u těchto pacientů přistupuje k alogenní TKD od příbuzného nebo nepříbuzného dárce. Posttransplantační lymfoproliferativní onemocnění (Posttransplant lymphoproliferative disorder, PTLD) patří k méně častým komplikacím TKD nebo solidních orgánů. Ve velké většině případů je PTLD spojená s reaktivací latentní infekce B lymfocytů virem EBV (Epstein-Barr virus) v souvislosti s imunosupresí v rámci transplantačního režimu. PTLD u autologních TKD vycházejí z buněk hostitele, po alogenní TKD jsou dárcovského původu. Prezentujeme kauzistiku 17letého pacienta, kterému byla v únoru 2005 diagnostikována ALL. Pomocí high risk chemoterapie (prednison poor responder) byla dosažena remise a v listopadu 2005 pacient podstoupil alogenní TKD od HLA identického bratra. V červenci 2007 trvá remise v kostní dřeni, ale dochází k rozvoji PTLD v žaludku. K histologickému a molekulárnímu vyšetření byl doručen biotický vzorek pankreatu a žaludeční sliznice pacienta, vyšetření bylo doplněno o průkaz latentní infekce EBV virem. Imunohistochemickým vyšetřením fenotypu nádorových buněk (CD20+, CD10+, BCL2 neg., BCL6+, Ki-67+, EBER+) byla předběžně stanovena diagnóza Burkittova lymfomu. Metodou fluorescenční in situ hybridizace na interfázických jádrech (I-FISH) jsme potvrdili přítomnost zlomu 8q24 genu c-MYC a metodou chromogenní in situ hybridizace (CISH) zjištěna přítomnost latentní EBV infekce. Molekulární analýzou klonálních přestaveb receptorů B lymfocytů pomocí PCR jsme detekovali přítomnost buněčných klonů těžkých řetězců imunoglobulinů IGH (VH/FR1-JH) atypické velikosti, které poukazují na klonální lymfoproliferaci B lymfocytů. Fragmentační analýzou jsme vyšetřili 6 mikrosatelitních lokusů, z nichž 4 byly informativní. Ve vzorku nádoru ze žaludeční sliznice byl detekován genotyp dárce. Na základě souboru výsledků uvedených vyšetření byla stanovena diagnóza Burkittova lymfomu a potvrzen dárcovský původ tohoto EBV pozitivního lymfomu. Pacientovi byla následně nasazena intenzivní chemoterapie, pomocí které bylo dosaženo kompletní remise, která trvá do současné doby. Podporováno VZ FNM MZ 00064203/6704, MSM 0021620813.

**P4 / 1548.****Vyšetření protilátek proti vnútornému faktoru pri pernicioznej anémii**

Bratková Annamária, Čintalanová Helena, Žemberová Eva (*Hematologicko-transfuziologické oddelenie, Nemocnica Košice-Šaca - SR; RIA laboratórium, Košice - SR*)

Protilátky proti vnútornému faktoru /IFAB/ sú vysoko špecifické pre pernicioznu anémiu. Kombinácia megaloblastovej anémie, znížených sérových hladín vitamínu B12 a prítomnosti protilátok proti vnútornému faktoru znamená de facto diagnózu pernicioznej anémie. Súbor tvorilo 57 pacientov, 25 mužov a 32 žien, M:Ž = 1: 1,28, s priemerným vekom 63 rokov s megaloblastovou anémiou. Priemerná hladina vitamínu B12 bola 57± 41,9 /17-273/ j. Priemerná hodnota IFAB bola 11,9 ± 20,55 /0-107/, pozitívne hodnoty sa vyskytli u 54,3%, negatívne u 21,7%, nejednoznačné u 23,9% pacientov. Protilátky proti parietálnym bunkám žalúdka /APCA/ boli pozitívne u 52,6% pacientov, negatívne u 26,8%. Len u 3 pacientov /5,3%/ boli negatívne APCA i IFAB, 94,7% malo pozitívne APCA alebo IFAB. Na základe našich skúseností v súlade s literárnymi údajmi môžeme odporúčať vyšetrenie protilátok proti vnútornému faktoru u pacientov v rámci diferenciálnej diagnostiky makrocytovej anémie, u ktorých na základe prvotných vyšetrení je supponovaná perniciozna anémia.

**P5 / 1518.****Kongenitálna dyserytro-poetická anémia – fetálna erythroblastóza jako neobyklá manifestace**

Suková Martina, Pindurová Ester, Vodičková Elena, Pospíšilová Dagmar, Starý Jan (*Klinika dětské hematologie a onkologie FN Motol, Praha; Oddělení klinické hematologie FN Motol, Praha; Dětská klinika FN, Olomouc*)

Kongenitálna dyserytro-poetická anémia (CDA) je vzácná vrozná porucha erythropoesy, charakterizovaná anémiou s retikulocytopenií, inefektívnou erythropoesou a typickou morfológiou erytroidných prekursorů v kostní dřeni. CDA je fenotypově i genotypově variabilní onemocnění, dělení do 4-6 typů je morfológické, podklad v mutacích CDAN genů byl potvrzen u typu I-III. Manifestace CDA v novorozeneckém věku je velmi vzácná, jsou popsány ojedinělé kauzistiky prezentující se jako fetální hydrops. Představujeme dva případy sporadického výskytu těžké intrauterinní anémie s obrazem fetální erythroblastózy/hydropsu přecházející do obrazu chronické na transfuzích závislé anémie. Etiologická diagnostika byla u novorozenců komplikována těžkou anémiou (HCT 0,18/0,11) s potřebou transfuze v prvních hodinách života a následnou absencí vlastních erytrocytů při závislosti na transfuzích. Ačkoli známky inefektívné erythropoesy byly zřejmé od prvních týdnů věku (anémie, normoblastosa, retikulocytopenie, hyperplastická erythropoesa), typické morfológické znaky časných erytroidných prekursorů (binuklearita, multinuklearita, chromatinové můstky) se objevily až po

několika měsících. Morfologický obraz v obou případech odpovídal CDA II. typu, specifická biologická aktivita erytroblastů asociovaná s tímto typem však nebyla potvrzena, nálezy odpovídají geneticky nespecifikovanému IV. typu s nepříznivou prognosou. Pro těžkou závislost na transfuzích a známky přetížení železem byla jedna z dívek indikována k alogenní transplantaci kmenových buněk. MUD-SCT byla provedena ve věku 30 měsíců po myeloablativním režimu, následována den 94 odhojením štěpu a obnovením autologní krve tvorby s nutností splenektomie při progresivní splenomegalii. 3,5 roku po SCT zůstává závislá na transfuzích, na chelatační léčbě trvá laboratorní obraz přetížení železem. I druhá dívka s lehčím postnatálním průběhem je ve věku 18 měsíců závislá na transfuzích s potřebou chelatační léčby od 15 měsíců věku. Genetická a funkční diagnostika probíhá v zahraničních laboratořích. CDA se obvykle manifestuje jako mírná nebo středně těžká anemie s hemolytickými rysy u adolescentů, intrauterinní začátek je neobvyklý, signalizuje nepříznivý průběh s rizikem závislosti na transfuzích. Oba případy dokladují obtížnost diagnostiky vzácných vrozených selhání dřeně a upozorňují na potřebu mezioborové a mezinárodní spolupráce včetně napojení na vznikající evropskou databázi. S podporou VZ-FNM MZ 00064203

#### P6 / 1402.

##### **Effects of tyrosine kinase inhibitors on lymphocyte subpopulations in patients with chronic myeloid leukemia**

Rohoň Peter, Mustjoki Satu, Faber Edgar, Indrák Karel, Porkka Kimmo (*HOK FN, Olomouc; Hematology Research Unit, Biomedicum, University, Helsinki – Norway; Hematology Research Unit, Biomedicum, University Central Hospital, Helsinki; HOK FN, Olomouc*)

**OBJECTIVES:** Tyrosine kinase inhibitors (TKIs) are the standard treatment in patients with chronic myeloid leukemia (CML), in vivo effects of TKIs on immune effector cells are mostly unknown. We aimed at the characterization of lymphocyte subpopulations at diagnosis and during TKIs therapy in chronic phase CML patients. **MATERIALS AND METHODS:** A total of 142 peripheral blood (PB) and bone marrow (BM) samples were studied from CML patients at diagnosis (n=18) and during TKI therapy (n=28). Samples from (n=17) healthy volunteers served as controls. Lymphocyte subpopulations were analyzed with multicolor flow cytometry. **RESULTS:** The percentages of lymphocyte subpopulations correlated well in BM vs. in PB. At the time of diagnosis, the proportions of T-, Th-, Tc- and NK-cells were similar in CML patients compared to healthy controls. The percentage of B-cells was decreased both in BM (8% vs 21%, p=0.001) and in PB (9% vs. 12%, p=0.001) in CML patients. On the contrary, the percentage of NKT cells was increased at the time of diagnosis in BM (11% vs. 6%, p=0.02). During imatinib treatment, the proportions of T,

B-, NK- and NKT-cells did not differ from healthy controls, whereas the percentage of Tc-cells was decreased in BM (51% vs. 38%, p=0.006) and in PB (58% vs. 47%, p=0.001). The lymphocyte profile differed during dasatinib treatment and the proportion of B-cells was lower (9% in BM, p=0.02 and 6% in PB, p=NS) and increased numbers of NKT cells were detected (12% in BM and 14% in PB), similarly as at the time of diagnosis. In BM, the median percentage (range) of Tregs at diagnosis, during imatinib and dasatinib therapy and in healthy volunteers was 2.6 (0.9-5.3), 5.6 (0.2-9.8), 2.9 (1.3-5.8) and 4.3 (1.5-7.5), p=0.003. No correlation with age or the Sokal risk score at diagnosis was observed. **CONCLUSIONS:** We conclude that at the time of diagnosis, CML patients have decreased level of B-cells both in BM and in PB, whereas the T-cells numbers are comparable with those seen in healthy volunteers. Imatinib and dasatinib have shown to possess inhibitory functions on T-cells in vitro, no major differences were observed in T-cells numbers in patients during these treatments. Dasatinib therapy was associated with similarly low Treg levels as was found in CML patients at the time of diagnosis, whereas the level of Tregs was similar in imatinib treated patients as in healthy controls.

#### P7 / 1472.

##### **Burkitt-like lymfom a následná aplastická anemie u EBV-negativního 16letého chlapce s X-vázanou lymfoproliferativní chorobou**

Janda Aleš, Mejstříková Ester, Sumerauer David, Freiberger Tomáš, Hubáček Petr, Kynčl Martin, Ravčuková Barbora, Keslová Petra, Sedláček Petr, Kodet Roman, Kabíčková Edita, Starý Jan (*Klinika dětské hematologie a onkologie UK 2. LF a FNM, Praha; Laboratoř molekulární genetiky, Centrum kardiovaskulární chirurgie a transplantace, Brno; Klinika zobrazovacích metod, UK 2. LF a FNM, Praha; Laboratoř molekulární genetiky, Centrum kardiovaskulární chirurgie a transplantace, Brno; Ústav patologie a molekulární medicíny, UK 2. LF a FNM, Praha*)

X-vázaná lymfoproliferativní nemoc (XLP) je vzácný primární imunodeficit, který se nejčastěji manifestuje po infekci virem Epstein-Barr (EBV). Typický fenotyp zahrnuje fulminantně probíhající infekční mononukleózu, dysgamaglobulinémii a non-hodgkinský lymfom. Aplastická anémie patří mezi vzácnější projevy této nemoci. Kazuistika: 16letý chlapec byl přijímán pro generalizovanou lymfadenopatii, následně byl u něj prokázán Burkitt-like lymfom (BLL). V době stanovení diagnózy byl přítomen pleurální výpotek a malnutrice až kachexie. V předškolním věku trpěl na časté záněty středouší, 2 roky před stanovením diagnózy BLL byla zjištěna eufunkční struma a mírná růstová retardace. Při diagnóze byly hladiny imunoglobulinů a základní lymfocytární subpopulace v normě; EBV a CMV séronegativní. Byla zahájena léčba dle protokolu BFM B-NHL 2004. Kvůli neutropenické enterokolitidě po prvním cyklu a následnému zdr-

žení chemoterapie, byly do léčby zařazeny 2 dávky rituximabu (375 mg/m<sup>2</sup>). Léčba byla ukončena v lednu 2008. O 3 měsíce později se objevila pancytopenie (leu 1.6 x 10<sup>9</sup>/l, hgb 46 g/l, trombo 55 x 10<sup>9</sup>/l). Na základě vyšetření aspirátu a biopsie kostní dřeně (KD) byla stanovena diagnóza těžké aplastické anémie (SAA), relaps BLL vyloučen. V KD i v periferní krvi (PK) byl patrný zvýšený počet aktivovaných TCR gama/delta T lymfocytů (CD8+) bez jasné klonality. Chlapec byl PCR EBV, CMV i HHV6 negativní v PK i v KD, serologie nebyla vzhledem k aplikaci IVIG informativní, v malém množství byly v KD nalezeny kopie parvoviru B19. Současný výskyt BLL a SAA vedl k vyšetření SH2D1A genu, jednoho ze dvou genů, jejichž poškození podmiňuje XLP fenotyp. Byla nalezena delece 1. exonu. Pacient byl transplantován periferními kmenovými buňkami od jeho zdravého 9/10 HLA-shodného bratra. Nyní, 8 měsíců po transplantaci, je klinicky v pořádku, bez imunosupresivní či substituční léčby. Stejná mutace v genu SH2D1A byla detekována i u jeho 24letého maternálního bratrance, který trpí mutilujícím epidermolysis bullosa-like onemocněním kůže a mírnou psychomotorickou retardací. Chlapec je EBV séronegativní s normálními hladinami imunoglobulinů a dosud se u něj nikdy neprojevovaly příznaky běžně asociované s XLP. Závěr: Poškození genu SH2D1A může být příčinou EBV- negativního BLL a SAA. Genetické vyšetření rodinných příslušníků může odhalit jedince, u kterých je vysoké riziko propuknutí nemoci. Podpořeno granty IGA NS/9997-4 a VZ MZ ČR 0000064203.

#### P8 / 1513.

#### **TCR gama/delta pozitivní T lymfoproliferace v předchorobí fatálně probíhajícího hepatosplenického lymfomu u 16leté pacientky po transplantaci ledviny**

Mejstříková Ester, Sumerauer David, Seeman Tomáš, Froňková Eva, Zemanová Zuzana, Lizcová Libuše, Sedláček Petr, Smíšek Petr, Mužíková Kateřina, Pospíšilová Klára, Hubáček Petr, Trka Jan, Janda Aleš, Kodet Roman, Čapkova Linda, Starý Jan, Kabíčková Edita, Hrušák Ondřej (*Klinika dětské hematologie a onkologie, FN Motol, Praha; Pediatrická klinika, FN Motol Centrum nádorové cytogenetiky, Praha; VFN Ústav patologie a molekulární medicíny, FN Motol, Praha*)

Úvod. Pacienti po transplantaci orgánů chronicky užívací imunosupresiva jsou ohroženi rozvojem lymfoproliferativních onemocnění s incidencí 1-20%. Popisujeme případ pacientky s hepatosplenickým lymfomem diagnostikovaným 5 let po transplantaci ledviny, jehož rozvoj byl molekulárně sledován půl roku před prvními klinickými projevy. U dívky (11 let) byla v roce 2002 provedena transplantace ledviny pro Fanconioho nefronoftízu. V říjnu 2006 byla v periferním krevním obraze zachycena významná neutropénie (<200/uL) bez nápadnějších atypií v aspirátu kostní dřeně. Opakované epizody neutropénie (do konce roku 2006) ustoupily buď spontánně nebo po

zvýšené imunosupresi. V lednu 2007 v rámci další ataky neutropénie až agranulocytózy se objevila významná „monocytoza“ jak v periferní krvi tak i kostní dřeni. Procento morfologických „monocytů“ imunologicky korespondovalo se zmnožením atypických TCR gama/delta pozitivních T lymfocytů (CD7slabě+CD5negCD3jasně+). Molekulárně geneticky byla identifikována klonalita v systémech TCR delta i gama a bylo možné sledovat tento klon pomocí kvantitativního PCR. U pacientky nebyla zřejmá lymfadenopatie, pouze byla ultrasonograficky přítomná přechodně mírná hepatosplenomegálie. Konvenční ani molekulární cytogenetika neprokázala žádné chromozomální aberace v krvi ani v kostní dřeni. Neprokázali jsme serologicky ani molekulárně geneticky virovou reaktivaci EBV ani CMV. V květnu 2007 u pacientky došlo k rozvoji rychle progredující hepatosplenomegálie s horečkami a pancytopenií, klinicky stav odpovídal hepatosplenickému lymfomu. Rovněž jsme nově prokázali pomocí FISH metody isochromosom 7q. Iniciálně u pacientky byla zahájena léčba monoklonální protilátkou campath s fludarabinem, ani 2. linie léčby nebyla úspěšná (prednison, vincristin, daunorubicin, asparagináza) a pacientka zemřela 2 týdny od manifestace lymfomu. Retrospektivně jsme prokázali identické klonální přestavby TCR více než rok před manifestací lymfomu (na hladině 0,03%), kdy byla pacientka zcela bez jakýchkoli obtíží s normálním krevním obrazem. Závěr. Prokázali jsme dosud v literatuře nepopsanou chronickou T lymfoproliferaci klonálně identickou s vlastním hepatosplenickým lymfomem ve vlastním předchorobí lymfomu. Typická chromozomální aberace isochromosom 7q je pozdní změna ve vlastní geneti lymfomu a pravděpodobně souvisí s agresivitou onemocnění. Podpořeno: IGA NS/9997-4; IGA NR/9531-3, MZCR 000064203, MSM0021620813

#### P9 / 1475.

**Dlouhodobá remise leukemizovaného folikulárního lymfomu se získanou von Willebrandovou chorobou a sekundární paraproteinémií IgM kappa po chemoterapii CHOP s konsolidací rituximabem**  
Hrudková Monika, Belada David, Dulíček Petr, Smolej Lukáš, Malý Jaroslav (*UK v Praze, LF v Hradci Králové a FN Hradec Králové, II. interní klinika, oddělení klinické hematologie, Hradec Králové*)

57-letý muž byl v 3/2003 přijat na OKH II. interní kliniky FN v HK pro podezření na lymfoproliferativní onemocnění překladem z ORL kliniky, kde byl vyšetřován pro epistaxi. Od 1/2003 měl pacient opakovaně enteroragii a epistaxi, necíleně zhubnul 12 kg za měsíc. V krevním obraze byla přítomna leukocytóza (38x10<sup>9</sup>/l) se 70 % X-buněk (mladších lymfoidních) v diferenciálním rozpočtu a hypochromní normocytární anémie (Hb 55 g/l). Vzhledem k vysoké celkové bílkovině (116 g/l) byla provedena imunoelktroforéza a zjištěn paraprotein IgM kappa (52,4 g/l). Biopsie kostní dřeně prokázala infiltraci folikulárním lymfomem (FL) grade II, stá-

dium IVB, S, E (hepatosplenomegalie). Pro výrazné krvácivé projevy (epistaxe, enteroragie, preretinální hemoragie) s negativní osobní i rodinnou anamnézou byla provedena rozsáhlejší koagulační vyšetření a diagnostikována získaná forma von Willebrandovy choroby [vWCH - nulová aktivita ristocetinového kofaktoru FVIII (RiCo)]. Byla zahájena substituce plazmami a koncentrátem obsahujícím FVIII i von Willebrandův faktor 1000 IU denně po dobu 15 dní s ústupem krvácivých projevů, vzestupem FVIII RiCo a FVIII. Pro hyperviskozitu při paraproteinémii (6,3 mPa.s) byla v úvodu 1x provedena plazmaferéza s dobrým efektem. K ovlivnění aktivity FL bylo po přefázi kortikoidy (metylprednisolon 80 mg i.v. 4 dny) podáno od 3/03 do 7/03 6 cyklů CHOP s dosažením parciální remise (přetrvávající splenomegalie a paraproteinémie IgM kappa 25 g/l). Při terapii FL se již krvácení neopakovalo, nebyla potřeba další substituce a postupně došlo k úplnému laboratornímu vymizení aktivity vWCH s normalizací všech testů. Od 10/03 následovalo v rámci konsolidace podání 4 dávek rituximabu v monoterapii (375 mg/m<sup>2</sup> 1x týdně) s dosažením nepotvrzené kompletní remise (uCR - přetrvávající IgM kappa 23 g/l) a od 5/04 poté udržovací terapie interferonem alfa (6 MU 3x týdně). Ta byla v 6/05 ukončena pro hepatotoxicitu a leukopenii. V 5/06 byl zjištěn 1. relaps FL (krční uzliny), st. IIA. Pacient obdržel znovu 4 dávky rituximabu v monoterapii 1x týdně s dosažením druhé uCR (IgM kappa 8,8 g/l). Během relapsu lymfomu již nedošlo k nové aktivaci získané vWCH. Nemocný je nyní v dlouhodobé remisi FL. Získaná forma vWCH je velmi vzácná, je mj. asociována právě s lymfoproliferacemi a paraproteinémiemi. K ovlivnění její aktivity je nezbytná úspěšná léčba základního onemocnění, jak bylo demonstrováno i na našem případě. Tato práce byla podpořena výzkumným záměrem MZO 00179906.

#### P10 / 1491.

##### Expresce znaku CD66abce u lymfoproliferativních chorob a mnohočetného myelomu

Karban Josef, Mociková Heidi, Pytlík Robert, Klener Pavel, Siebertová Katarina, Trněný Marek (*I.interní klinika 1.LF UK a VFN, Praha, Centrální hematologické laboratoře a Trombotické centrum VFN, Praha; I.interní klinika 1.LF UK a VFN Praha; I.interní klinika 1.LF UK a VFN, Ústav patologické fyziologie 1.LF UK, Praha; Centrální hematologické laboratoře a Trombotické centrum VFN, Praha*)

Úvod. Expresce znaku CD66 byla popsána u chronické myeloidní leukémie, u akutní myeloidní leukémie a u některých dětských akutních lymfoblastických leukémií. Méně je známa expresce CD66abce u lymfoproliferativních chorob (LPD) a mnohočetného myelomu (MM). Protílátka anti-CD66 (klon BW 250/183) značená radionuklidem <sup>90</sup>Y se v současné době zkouší k terapii některých nádorů. Cíl. Flow cytometrický průkaz exprese CD66abce na nádoro-

vých buňkách nově diagnostikovaných LPD a MM s určením vhodnosti léčby těchto nádorů pomocí protílátky anti-CD66 konjugované s <sup>90</sup>Y. Pacienti a metody. Expresce znaku CD66abce byla zkoumána na nádorových buňkách kostní dřeně od 227 pacientů s nově diagnostikovanou neléčnou LPD nebo MM ověřenou histologickým vyšetřením kostní dřeně. Soubor pacientů: 74 B-chronických lymfatických leukémií (B-CLL), 22 lymfomů z pláštěvých buněk (MCL), 18 folikulárních lymfomů (FCL), 15 lymfomů z B-buněk marginální zóny (MZL), 13 lymfoplazmocytárních lymfomů/Waldenströмова makroglobulinémie (LPL/MW), 13 difúzních velkobuněčných B lymfomů (DLBCL), 4 T-NHL, 4 vlasatobuněčné leukémie (HCL), 3 blíže nespécifikované B-NHL (B-NHL NOS), 3 B-ALL a 58 MM. Ve všech 227 vzorcích kostní dřeně byl znak CD66 detekován průtokovou cytometrií pomocí monoklonální protílátky anti-CD66abce (klon Kat4C) značené fluorescein isothiocyanátem (FITC) od firmy DAKO. 115 z 227 vzorků bylo paralelně značeno i protílátkou anti-CD66abce – FITC stejného klonu (BW250/183) jako terapeuticky zkoušený radioimmunokonjugát. Hodnocení pozitivitu znaku CD66 na nádorové populaci > nebo = 20%. Výsledky jsou shrnuty v Tab. 1. Závěr: Aberantní expresce znaku CD66abce byla nejčastěji prokázána u B-CLL, u MM, u MCL a u LPL. U těchto diagnóz by bylo vhodné zjistit terapeutickou účinnost protílátky anti-CD66 značené radionuklidem. Práce byla podpořena grantem FT-TA2/081.

Diagnóza	Expresce CD66abce (klon BW250/183)	Expresce CD66abce (klon Kat 4C)
	pozit./negat.	pozit./negat.
B-CLL	6/30	60/14
MM	8/24	43/15
MCL	3/11	22/0
FCL	3/6	5/13
MZL	4/3	13/2
LPL/MW	2/2	13/0
DLBCL	2/4	11/2
T-NHL	1/1	0/4
HCL	0/1	3/1
NHL NOS	0/2	3/0
B ALL	0/2	3/0
Celkem: pozit./negat. vzorky	29/86	176/51

#### P11 / 1466.

**Případ mycosis fungoides s folikulární mucinózou úspěšně léčený bexarotenem a elektronovou sprchou**  
Litvik Radek, Starostka David, Vantuchová Yvetta (*Kožní oddělení FN, Ostrava; Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou, Havířov*)

Prezentujeme případ 56letého pacienta s folikulárně vázanými papulemi ve kšticí a plakozními erytematosquamozními ložisky na integumentu. Provedené opakované biopsie potvrdily diagnózu mycosis fungoides s folikulární mucinózou. Jedná se o primární kožní T-buněčný lymfom, lymfatické uzliny, viscerální orgány ani kostní dřeň nebyly u pacienta postiženy (stadium T3N0M0, stadium dle WHO/EORTC IIB). Pacient byl léčen kombinovanou terapií lokálními kortikosteroidními externy a systémovou PUVA terapií s retinoidy (Re-PUVA) a posléze kombinací PUVA terapie s interferonem alfa (PUVA + IFN- $\alpha$ ). Pro progresi klinického nálezu byla tato terapie ukončena a pacient byl převeden na monoterapii systémovým bexarotenem. Parciální odpověď na léčbu bexarotenem trvala 5 měsíců.

Pro postupné zhoršování klinického nálezu bylo rozhodnuto o vysazení bexarotenu a celotělovém ozáření elektromy, které navodilo kompletní remisi onemocnění trvající 8 měsíců. Pacient po ozáření elektromy užívá bexaroten v udržovacím léčebném režimu.

#### P12 / 1459.

##### **Komplexní diagnostika kompozitního lymfomu - kazuistika**

Kalinová Markéta, Veselá Eva, Kamarádová Kateřina, Mandáková Petra, Stránská Eliška, Břízová Helena, Augustiňáková Alena, Hilská Irena, Pokorná Petra, Kodet Roman (*Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK Praha a FN Motol, Praha; Radioterapeuticko-onkologické oddělení 2. LF UK Praha a FN Motol, Praha*)

Současný výskyt dvou maligních lymfomů v jedné anatomické lokalitě je poměrně vzácný nález. Na našem pracovišti jsme diagnostikovali kolizi dvou B lymfomů nižšího stupně malignity: lymfomu z marginální zóny a malobuněčného B lymfomu typu B-CLL/SLL. Prezентujeme případ 57letého pacienta s 3 měsíční anamnézou podkožní rezistence temporální krajiny vlevo. Byla provedena exstirpace tumoru a jeho následné vyšetření. Komplexní diagnostika se opírala o vyšetření histologické včetně imunohistochemie (IHC), vyšetření průtokovou cytometrií a molekulární vyšetření klonality onemocnění pomocí detekce imunoglobulinových genů těžkých, kappa a lehkých řetězců (IgH, IgK a IgL) (European BIOMED-2 collaborative study). Nádorové buňky byly pozitivní v IHC průkazu proteinu CD20, bcl-2, slabě kólsavě pozitivní v CD23. Část nádorové populace nesla pozitivitu proteinu CD5, stejně jako malobuněčná nenádorová příměs v pozadí. Nádorové buňky dále exprimovaly lehké imunoglobulinové řetězce lambda (s průkazem restrikce lambda nad kappa). U nádorových buněk jsme imunohistochemicky nedetekovali expresi molekul CD10, bcl-6 a cyklinu D1. Průtoková cytometrie zastihla dvě subpopulace B lymfocytů; jedna subpopulace odpovídala malým B lymfocytům s imunofenotypem CD19+, CD5+, CD20+, lambda+, CD23+, CD52+, CD10-, CD38-, FMC7-, CD71-; druhou subpopulaci tvořily středně velké B lymfocyty s imunofenotypem CD19+, CD5-, CD20+, lambda silně +, CD38+, CD23+/-, CD52+, CD10-, FMC7-, CD71-. Molekulární vyšetření prokázalo monoklonální přestavbu IgH-VH/FR1-JH a VH/FR3-JH, biklonální přestavbu IgH VH/FR2-JH, dále monoklonální přestavbu IgK (VK-JK) a biklonální přestavbu IgK (VK-KDE) a biklonální přestavbu v případě IgL. V následném vyšetření kostní dřeně byla histologicky zastižena minimální nodulární infiltrace kostní dřeně lymfomem typu B-CLL; průtoková cytometrie detekovala infiltraci buňkami s profilem B-CLL (0,7% z celku) a molekulární vyšetření prokázalo monoklonální přestavbu IgH VH/FR1-JH a VH/FR2-JH a biklonální přestavbu IgK VK-KDE. Pro sledování minimální diseminované nemoci jsme molekulárně odlišili dvě populace B lymfomů. Kombinací diagnostických a následných klinických vyšetření v rámci stagingu onemocnění byl nález

hodnocen jako kompozitní lymfom: kolize lymfomu z marginální zóny (MZL)- postižení kůže lbi, klinické stádium I.A- a malobuněčný B lymfom typu B-CLL/SLL s nodulární infiltrací kostní dřeně, klinické stádium IV. A, FLIPI I. Podporováno grantem: MZ ČR 00064203

#### P13 / 1389.

##### **Lymfomy orbity, retrospektivní analýza OKH, FNKV Jankovská Milada, Krásný Jan, Kozák Tomáš (OKH FNKV, Praha; Oční klinika FNKV, Praha)**

Úvod. Lymfomy orbity jsou relativně vzácné, tvoří asi jen 1% všech lymfomů a 5-15% extranodálních lymfomů. Většinou jsou to indolentní lymfomy, lymfom marginální zóny-MALT, pouze 15% tvoří DLBCL a jen 5% MCL. Infiltrují slznou žlázu, spojivku, oční víčko nebo periorbitální tkáň. Postižení může být jedno i oboustranné. Pacienti a metody. V retrospektivní studii od r.1999 jsme analyzovali 15 pacientů s primárním postižením orbity, u jednoho pacienta se objevil lymfom víčka při relapsu onemocnění. Charakteristika pts.: median věku 69 let /44-77/, poměr 9M:6Ž, histologický typ 11xMALT-73%, 2xDLBCL-13,5%, 2xMCL-13,5%. Ve všech případech bylo postižení jednostranné. Klinické stadium I mělo 66,5% pacientů, KSII 13,5% a KSIV 20%. Ve 3 případech /20%/ byly pts jen sledovány, 9 pts / 60%/ mělo chemoterapii, a 3pts / 20%/ bylo léčeno radioterapií. Median sledování je 48 měsíců. Výsledky. Kompletní remise dosáhlo 14 pts, jedna pacientka zemřela po prvním cyklu chemoterapie. Zrelabovalo 5 pacientů. Závěr. V diagnostice má nezastupitelné místo přesná histologická verifikace, jak ukazují dvě kazuistiky. Kládeme důraz na mezioborovou spolupráci oftalmologa a hematologa. Cílem terapeutické strategie je nejen dosažení kompletní remise, ale zároveň i minimalizovat poškození funkce oka, snížení vizu, což má podstatný vliv na kvalitu života pacientů.

#### P14 / 1553.

##### **Úspěšná léčba alemtuzumabem a následnou alogenní transplantací u nemocné s refrakterním CD5-negativním lymfomem z pláštěvých buněk a delecí 17p13**

Smolej Lukáš, Belada David, Rusínová Marie, Kučerová Lenka, Peková Soňa, Krejsek Jan, Nová Markéta, Soukup Jan, Kodet Roman, Hrudková Monika, Lánská Miriam, Zavřelová Alžběta, Žák Pavel (*II.interní klinika, oddělení klinické hematologie, FN a LF UK, Hradec Králové; Hematologicko-transfuzní oddělení, Masarykova městská nemocnice, Jilemnice; Oddělení lékařské genetiky, FN a LF UK, Hradec Králové; Laboratoř molekulární diagnostiky, Laboratoře CHAMBON a.s., Praha; Ústav klinické imunologie a alergologie, FN a LF UK, Hradec Králové; Fingerlandův ústav patologie, FN a LF UK, Hradec Králové; Ústav patologie a molekulární medicíny, 2. lékařská fakulta UK a FN Motol, Praha*)

Lymfom z pláštěvých buněk (MCL) je klinicky agresivní Ne-Hodgkinův lymfom (NHL) charakterizovaný translokací t(11;14)(q13;q32) vedoucí k nadměrné expresi cyklinu D1. U 20-45 % nemocných je přítomna delecce 17p13 - vysoce nepříznivý faktor z hlediska odpovědi na léčbu a celkového přežití. Vzácně může být MCL CD5-negativní. Popisujeme případ 63-leté ženy léčené od listopadu 2007 pro lymfoproliferaci s masivní splenomegalií, těžkou anémií a hyperleukocytosou. Imunofenotyp svědčil nespécificky pro B-buněčnou lymfoproliferaci (CD19/20/79b/sIgM pozitivní, CD5/CD10/CD23 negativní). Vzhledem ke stejnému nálezu v histologii dřeně a absenci lymfadenopatie umožňující histologický závěr byla diagnóza stanovena jako blíže nespécifikovaný B-buněčný NHL a podány 4 cykly R-CHOP, avšak bez léčebné odpovědi. Terapie byla změněna na režim FCR a po 2 cyklech na R-ESAP, ale ani po této léčbě nedošlo k ústupu masivní splenomegalie, těžké anémie a trombocytopenie. Nemocná byla závislá na transfúzích. V této době byl dovyšetřen cytogenetický vzorek z doby diagnózy: FISH prokázala translokaci t(11;14), trisomii 12 a delecce 13q14 a 17p13. Byla také zjištěna zvýšená exprese cyklinu D1 v periferní krvi i kostní dřeni. Vzhledem k del17p byla léčba změněna na alemtuzumab, 30 mg 3x týdně v podkožních injekcích. Po 12 týdnech (červen-září 2008) bylo dosaženo kompletní úpravy anémie a trombocytopenie a velmi dobré léčebné odpovědi ve slezině. Vzhledem k agresivnímu průběhu onemocnění byla v prosinci 2008 provedena alogenní transplantace po přípravném režimu FluMel (dárce plně shodná sestra), která proběhla bez komplikací. V březnu 2009 je pacientka 100 dní od transplantace v kompletní remisi, se 100% dárcovským chimerismem ve dřeni a bez závažných infekčních komplikací či známek reakce štěpu proti hostiteli a prakticky normální kvalitou života. Kazuistika dokládá vynikající léčebnou účinnost alemtuzumabu v „off-label“ použití u refrakterního B-buněčného lymfomu s del17p, kdy selhaly 3 linie léčby včetně fludarabinového a platinového režimu. Léčba alemtuzumabem umožnila dosáhnout léčebné odpovědi a provést alogenní transplantaci, a tím nemocné zachránila život. Nelehké bylo zařadit toto onemocnění diagnosticky. V souladu s klasifikací lymfoidních malignit dle WHO 2008 jsme pro t(11;14) a zvýšenou expresi cyklinu D1 případ uzavřeli i přes negativitu CD5 jako lymfom z pláštěvých buněk. Naše použití alemtuzumabu u této jednotky je prioritní. Podpořeno výzkumným záměrem MZO 00179906 MZ ČR.

#### P15 / 1574.

##### **Restrikce repertoáru imunoglobulinových molekul u pacientů s CLL**

Plachý Radek, Papajík Tomáš, Jarošová Marie (HOK, FN a LF UP, Olomouc)

Úvod: Struktura imunoglobulinové molekuly (Ig) je určena sledem dějů během ontogeneze B lymfocytů (B Ly). Tyto molekuly získávají základní podobu během vývoje

B Ly v kostní dřeni časově cílenou přestavbou příslušných stavebních kamenů ležících na chromosomech 2, 14 a 22. Zakladní kostra Ig je pak doplněna o somatické hypermutace v důsledku kontaktu B Ly s antigeny. Možný počet kombinací Ig se může pohybovat mezi 1012 až 1015. Patologické B lymfocyty (CD5+, CD23+) pacientů s chronickou lymfatickou leukémií (CLL) vykazují výrazné omezení v pestrosti repertoáru molekul Ig. S některými strukturálními prvky se setkáváme nebývale často zatímco některé se vyskytují jen velmi vzácně. Cíl: Cílem naší prezentace je charakterizace pacientů s CLL, kteří mají ve struktuře variabilní části těžkého řetězce Ig subgen VH1-69. Materiály a metody: Z mononukleární frakce periferní krve pacientů s CLL byla vyizolována RNA, reverzně přepsána a následně pomocí multiplexové polymerázové řetězové reakce byla detekována přestavba příslušející patologickému klonu B Ly. Přímou sekvenací pak byla určena struktura variabilní části těžkého řetězce Ig. Výsledky: Struktura IgVH byla určena u 328 pacientů s CLL. U 44 pacientů (13,5%) byla identifikována přestavba obsahující subgen VH1-69. Všechny sekvence byly v nemutované konfiguraci. Ve skupině s VH1-69 v porovnání se skupinou všech pacientů s CLL byli statisticky signifikantně více zastoupeni muži ( $p=0,03$ ). Sekvence s VH1-69 měly relativně dlouhou CDR3 oblast (medián 22AK). Nápadným znakem těchto patologických IgVH byla uniformita oblastí CDR3. Nejčastěji se subgen VH1-69 vyskytoval současně se subgeny DH3-3 a JH6 (17/44 = 39%, rozsah CDR3: 19-27AK, medián 24AK) a DH2-2 a JH6 (6/44 = 14%, rozsah CDR3: 21-30AK, medián 23AK). Nejčastějšími partnery subgeny VH1-69 byly ze skupiny DH subgen DH3-3 (22/44 = 50%) a ze skupiny JH subgen JH6 (31/44 = 70%). Shrnutí: Repertoár molekul Ig u pacientů s CLL je silně omezen, což potvrzuje nespornou roli imunoglobulinových molekul při iniciaci a rozvoji choroby. Pacienti, kteří mají v přestavbě subgen VH1-69 tvoří mimořádně početnou a uniformní podskupinu s rizikovým průběhem CLL. Práce je podporována granty IGA 9484 a MSM 6198959205.

#### P16 / 1511.

##### **Extrémne vystupňovaná expresia c-Ig v bunkách chronickej lymfocytovej leukémie dokumentuje možné odblokovanie zastavenia diferenciácie nádorových buniek smerom k plazmocytom**

Plank Lukáš, Szépe Peter, Balhárek Tomáš, Barthová Martina, Marcinek Juraj, Wild Alexander, Štefániková Zdenka, Richterová K. (Ústav patologickej anatómie JLF UK a MFN, Martin, SR; Oddelenie hematológie FNŠP F.D.Roosevelta, Banská Bystrica, SR; Klinika hematológie a transfuziológie LF UK, FNŠP Bratislava, Nemocnica sv. Cyrila a Metoda, Bratislava, SR)

Nádorové lymfocyty CLL sú zrelé, ale funkčne nevyzrievajúce bunkové elementy, čo sa prejavuje aj nízkou hladinou expresie s-Ig. Napriek tomu však možno až v cca 40-50% prípadov CLL dokázať tzv. plazmocytoidnú dife-

renciáciu (Pcoid) buniek s expresiou monotypického c-Ig. Pcoid sa zväčša najľahšie dokumentuje v proliferujúcich elementoch proliferčných centier nádoru (v pseudo-folikuloch), obyčajne však býva vyznačená v obmedzenom percente buniek nádoru. V predloženej práci dokumentujeme kazuistiky 2 pacientov s CLL s vystupňovanou produkciou c-Ig. Pacient A je 51-ročný muž s masívnou generalizovanou lymfadenomegáliou, u ktorého bola laboratórne aj biopsiou kostnej drene verifikovaná Pcoid+ CLL (CD5+/CD19+/CD23+) s del13q14 a pozitívitou ZAP-70 proteínu. Vnútri CLL infiltrátov drene boli prímiešané nápadne početné plazmocytárne diferencované nádorové bunky negatívne pri imunohistochemickom dôkaze antigénu CD138 v sprievode početných Russelových teliesok. V nich a rovnako aj v plazmocytoidne diferencovaných lymfocytoch nádoru bol prítomný monotypický c-Ig typu lambda. Imunofixáciou nebol dokázaný monoklonálny Ig, v moči bolo zistené stopové množstvo BJB a diskretný gradient voľných ľahkých reťazcov. Pacient B je 55-ročný muž s takmer ročnou anamnézou chemoterapiou liečenej CLL (CD5+/CD19+/CD23+) s trizómiou 12 a del11q23. V troch biopsických vyšetreniach kostnej drene bola opakovane verifikovaná nádorová infiltrácia rôzneho stupňa, v ktorej sme imunohistochemicky verifikovali pozitívnu expresiu ZAP-70 proteínu. V každom vyšetrení v nádorovom infiltráte dominoval klon plazmocytoidne diferencovaných lymfocytov s expresiou ľahkého reťazca kappa a prítomný bol aj menej rozsiahly klon plazmocytoidne diferencovaných lymfocytov s expresiou ľahkého reťazca lambda. ELFO séra a moča nedokázali prítomnosť paraproteínu. Oba uvedené prípady predstavujú príklady zriedkavej extrémne vystupňovanej exprese monotypického c-Ig v bunkách CLL, ktoré vyžadujú dôkladné diferenciálne diagnostické odlíšenie od iných B-NHL, najmä typu lymfoplazmocytového lymfómu, resp. myelómu. Súčasne dokumentujú skutočnosť, že v časti prípadov CLL dochádza k odblokovaniu maturácie nádorových buniek a k ich vyzrievaniu smerom k plazmocytom. Podobne ako v myelóme, aj tu môže nastať diskordancia medzi syntézou a sekréciou c-Ig. Prípady dokumentované u pacienta B spĺňa kritériá tzv. biklonálnej CLL, prípad pacienta A pripomína v literatúre diskutovanú možnú transformáciu CLL do plazmocytového myelómu.

#### P17 / 1461.

##### Nezvyklá komplikácia prúbehu B-CLL

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

Klinická data: 63letý muž s B-CLL s typickým imunofenotypem, nemutovaný status IgVH genu, Binet B, abdominálny bulk. Primoterapie 4 cykly fludarabínu. Po čtvrtém cyklu chemoterapie náhlé zhoršení stavu – dušnosť, kašeľ, slabosť, bez zvýšenej teploty či bolesti na hrudi. Pri fyzikálnom vyšetrení dyspnoe a tachypnoe, výrazné oslabenie auskultácie a poklepkové zkrátenie nad dolnú polovinou

pravého hemithoraxu, minimální periferní lymfadenopatie, ostatní nález v normě. Paraklinická vyšetření: V hemogramu lymfocytosa 14.5 giga/l bez cytopenie, v biochemii séra lehká elevace CRP a hypotriacylglycerolémie, koagulační parametry v normě. RTG a CT hrudníku - rozsáhlý pravostranný fluidotorax bez mediastinální lymfadenopatie či jiné hrudní patologie (CT provedeno po punkci). Při pleurální punkci evakuováno 1200 ml mléčné zbarvené tekutiny. Cytologie a flowcytometrická imunofenotypizace prokazuje dominující lymfocytární populaci s imunofenotypem typickým pro B-CLL, biochemická analýza deteguje zvýšenou hodnotu bílkoviny a výrazně zvýšenou hodnotu TAG 6.24 mmol/l, cholesterol v normě. Nález hodnocen jako chylotorax. Terapie: Další léčba zahrnovala opakované pleurální punkce s evakuací recidivujícího chylotoraxu s rozvojem malnutrice a dále inefektivní intrapleurální aplikaci cyklofosfamidu a Corynebacterium parvum. Výrazný léčebný výsledek teprve po chemické pleurodézě s užitím intrapleurální aplikace talku (výkon proveden na hrudní chirurgii FN). Dokončení chemoterapie fludarabinem (celkem 6 cyklů léčby) s dosažením parciální remise B-CLL, bez recidivy chylotoraxu. Závěr: Chylotorax jako nezvyklá komplikace B-CLL byl efektně řešen chemickou (talkovou) pleurodézou.

#### P18 / 1449.

##### Záchyt CD8+ u B-chronické lymfatické leukémie

Martinek Jan, Zuchnická Jana, Wrobel Marek, Leváková Veronika, Kutějová Kamila, Gumulec Jaromír, Kučerová Marcela, Brejcha Martin (Onkologické centrum J. G. Mendela, Klinické laboratoře, Laboratoř imunologie, Nový Jičín; Ústav klinické hematologie FN, Ostrava; Onkologické centrum J. G. Mendela, hematologické oddělení, Nový Jičín; Ústav klinické hematologie FN, Ostrava)

Pro B-CLL je při imunofenotypizačním vyšetření charakteristická exprese těchto znaků: CD19, CD20, CD23, CD5 a negativita FMC7. Expresie T lymfocytárních antigenů (mimo CD5) u B-CLL je velmi vzácná. Ve velkých souborech pacientů se pohybuje kolem 0,5%. Prezentujeme nález CD19+CD8+ na B lymfocytech u pacienta – muž 70 let: Onemocnění bylo diagnostikováno v únoru 2009 během hospitalizace pro flegmonu kůže na krku – do té doby byl pacient zcela bez potíží. Vyšetřením byla prokázána chronická lymfatická leukémie – klinické stadium III dle Raie se vstupní lymfocytózou 47x10<sup>9</sup>/l, anemií a velkou nádorovou masou v dutině břišní. Vstupní infekce – flegmona kůže na krku – byla zvládnuta intravenózními antibiotiky. V současné době je pacient léčen chemoterapií (indikací pro započítí léčby je klinické stadium III dle Raie a velká nádorová masa v dutině břišní). Expresie znaků v kostní dřeni je: CD19, CD20, CD5, CD23 a CD8. Znak CD10, CD38, CD22, CD79b a FMC7 jsou negativní. Prokázána kappa klonalita s nízkou expresí. Znak CD8+ na CD19+ byl exprimován jak v kostní dřeni, tak i v periferní krvi. Měření proběhlo opakovaně (dva odběry), pro diagnostiku CD8+ buněk byly použity různé kombinace

a klony protilátek: CD8-FITC(Clon B9.11)/CD4-PE/CD3-PC5, CD3-FITC/CD8-PE(Clon B9.11) a tetrachrome CD45-FITC/CD4-RD-1/CD8-ECD (Clon SFC121Thy2-Dr)/CD3-PC5. Další T lymfocytární znaky: CD2, CD3, CD4, CD7 byly negativní.

### P19 / 1433.

#### Zmnožení oblasti krátkých ramen chromozómu 2, rekurentní chromozómová aberace u B-CLL

Sobotka Jiří, Brejcha Martin, Holubová Vladimíra, Brychtová Yvona, Dřevojánková Bronislava, Tovaryšová Alena, Stoklasová Martina, Czekajová Aneta, Heinzová Vladimíra, Urbánková Marie, Wróbel Marek, Živná Jarmila, Radina Martin, Mayer Jiří (*Onkologické centrum J.G. Mendela, Nový Jičín; Interní hematologická klinika FN Brno; Slezská nemocnice, Opava; Šumperská nemocnice; Nemocnice Hranice*)

Úvod: Chromozómové aberace jsou významným prognostickým faktorem u B-CLL. Zlepšením klasického cytogenetického vyšetření u pacientů s B-CLL metodou kultivace se stimulací CpG oligonukleotidy a IL-2, byly identifikovány další chromozómové aberace, zejména nevyvážené translokace a komplexní změny karyotypu, které můžou modifikovat prognózu pacienta stanovenou I-FISH analýzou. Recentně byla u B-CLL identifikovaná další rekurentní aberace - zmnožení oblasti krátkých ramen chromozómu 2 (Pfeifer 2007, Haferlach 2007). Pacienti a metody: Cytogenetickým a následně molekulárně-cytogenetickým vyšetřením jsme ve skupině 189 pacientů identifikovali 10 pacientů se zmnožením krátkých ramen chromozómu 2. Zmnožení oblasti 2p jsme identifikovali klasickou cytogenetickou analýzou, metodou kultivace buněk periferní krve se stimulací s CpG oligonukleotidy a IL-2. I-FISH analýza byla u pacientů provedena použitím setu DNA sond na identifikaci delecí 17p, 11q a 13q, trizomie 12 a přestavby IgH genu. Zisk 2p byl potvrzen metodou FISH s DNA sondami ALK a N-MYC, metodou M-FISH a rozsah duplikace byl stanoven metodou M-BAND. Výsledky: Cytogenetickým vyšetřením u 189 pacientů s B-CLL bylo zmnožení oblasti krátkých ramen chromozómu 2 identifikováno u 10 pacientů (5,3%). I-FISH analýza detekovala aberace u 9 z nich, u 6 pacientů byla detekovaná izolovaná delece 13q, u dvou pacientů delece 11q a 13q a u jednoho delece 11q s trizomií 12. Cytogenetickou a M-FISH analýzou bylo u 6 pacientů zjištěno zmnožení 2p formou nevyvážené translokace s jiným chromozómem (1,4, 15, 18 a 20), u dvou pacientů jako přímá duplikace na 2p, v jednom případě byly přítomny jak klony s přímou duplikací, tak klony s translokací s různými chromozómy a klon s izochromozómem 2p. U 9 pacientů byly cytogenetickým vyšetřením identifikovány další aberace, nejčastěji vyvážené a nevyvážené translokace, u jednoho pacienta byla duplikace 2p součástí komplexního karyotypu. V práci bude diskutována souvislost zmnožení 2p s dalšími klinickými a biologickými parametry. Závěr: Metoda kultivace buněk se stimulací CpG oligonukleotidy a IL-2 je vhodnou metodou pro

kvalitní cytogenetické vyšetření u pacientů s B-CLL. Metoda zvyšuje výtěžnost cytogenetického vyšetření a zvyšuje se i záchyt chromozómových aberací. Detekuje další abnormality, jako je i prezentovaná aberace-zmnožení 2p. Detekce dalších chromozómových změn může poskytnout důležité prognostické informace a přinést tak větší heterogenitu do subklasifikace B-CLL.

### P20 / 1390.

#### Senzitivizace CLL buněk na fludarabin monoklonální protilátkou rituximab – identifikace zodpovědných genů

Ročňová Ludmila, Tichý Boris, Čejková Soňa, Potěšil David, Brychtová Yvona, Pospíšilová Šárka, Mayer Jiří, Trbušek Martin (*Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematologická klinika FN a LF MU, Brno; Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta MU Interní hematologická klinika FN a LF MU, Brno*)

Chronická lymfocytární leukémie (CLL) stále patří mezi nevyléčitelná onemocnění s vysoce variabilním průběhem. Moderní léčebné prostředky, hlavně kombinované režimy monoklonálních protilátek a klasické chemoterapie, však mohou u části pacientů prodloužit dobu přežití a/nebo dobu bez progresu nemoci. V naší poslední publikované práci (Čejkova et al., Eur J Haematol, 2009;82:133-42) jsme ukázali, že monoklonální protilátka rituximab senzitivizuje významnou část CLL vzorků in vitro na fludarabin a že tato senzitivizace nezávisí na přítomnosti „high risk“ genetických abnormalit, aberací v tumor supresorových genech ATM a TP53 (primární odpověď na fludarabin však přítomnost těchto aberací významně ovlivňuje). Cílem naší práce proto bylo určit odlišně exprimované geny u CLL kultur senzitivizovaných a nesenzitivizovaných rituximabem pro fludarabin. Takto vybrané geny by mohly sloužit jako potenciální markery senzitivity (nebo rezistence) a následně pomoci objasnit mechanismus účinku rituximabu v CLL buňkách. Otestovali jsme 60 CLL kultur in vitro pomocí metabolického testu buněčné viability WST-1. Fludarabin byl na buňky aplikován po dobu 48 h ve čtyřech koncentracích (25; 6,25; 1,6 a 0,4  $\mu$ g/ml), a to buď samostatně nebo po předšetření buněk rituximabem (10  $\mu$ g/ml, 72 h). 21 vzorků bylo rituximabem významně senzitivizováno ( $p < 0,01$ ). Pro čipovou analýzu (Agilent Technologies, 4x44K microarray) jsme použili 7 nejvíce senzitivizovaných vzorků a 8 vzorků nesenzitivizovaných. Na čipu jsme u každé kultury hodnotili změnu genové exprese ošetřených buněk vztahenou k neošetřené kontrole. Pozorovali jsme snížení exprese některých genů u senzitivizovaných vzorků a zároveň zvýšení exprese těchto genů u vzorků nesenzitivizovaných. Opačný efekt překvapivě nebyl pozorován. Z nejvíce rozdílně exprimovaných genů mezi senzitivizovanými a nesenzitivizovanými vzorky se jako zajímavé jeví tyto: metallothionein 2A (MT2A), který má vliv na eflux chemoterapeutik z buňky, M2 podjednot-

ka ribonukleotid reduktázy (RRM2), která je spojována s rezistencí na chemoterapii, a topoizomeraza II alfa (TOP2A), která ovlivňuje odpověď na terapii. Získaná data ukazují na velmi zajímavé geny, které mohou být zodpovědné za pozorovaný senzitivizační efekt rituximabu. Jejich významnost chceme v nejbližší době ověřit na větším souboru vzorků s využitím metody qRT-PCR. Podporováno grantem IGA MZ č. 9301-3/2007.

#### P21 / 1387.

##### **Chromosomální změny detekované metodou array komparativní genomické hybridizace u 50 pacientů s B-buněčnou chronickou lymfocytární leukémií**

Urbánková Helena, Holzerová Milena, Plachý Radek, Pikalová Zuzana, Papajík Tomáš, Indrák Karel, Jarošová Marie (HOK, FN a UP, Olomouc)

B-buněčná chronická lymfocytární leukémie (B-CLL) je nejčastější leukémií dospělých. Pokrok v molekulárně-genetické charakterizaci B-CLL potvrdil prognostickou roli mutačního statusu IgVH, stejně jako význam chromosomálních abnormalit určovaných molekulárně-cytogenetickými metodami. Kromě chromosomálních změn se známým prognostickým významem, jako jsou např. delecce 6q, 11q (ATM), 13q a 17p (TP53) detekovaných rutinně, se u pacientů s B-CLL vyskytují také další cytogenetické změny. V současnosti není známo, zda mají tyto další aberace vliv na prognózu a vývoj onemocnění. Abychom tyto změny běžně unikající rutinnímu vyšetření metodou FISH (fluorescenční in-situ hybridizace) detekovali, provedli jsme array komparativní genomickou hybridizaci (arrayCGH) u 50 pacientů s B-CLL diagnostikovaných na naší klinice. Cílem této studie bylo určit oblasti se ztrátami a zmnožením genetického materiálu, které mohou obsahovat kandidátní tumor-supresorové geny a onkogeny zapojené v patogenezi tohoto onemocnění. ArrayCGH odhalila kvantitativní změny u 43 z 50 vyšetřených pacientů. Kromě již známých abnormalit jako jsou delecce 6q (7 pacientů), 11q (13 pacientů), 13q (28 pacientů), 17p (5 pacientů) a trisomie chromosomu 12 (5 pacientů), jsme detekovali také další nenáhodné chromosomální změny jako např. zmnožení 2p (11 pacientů) a 8q (4 pacienti), delecce 14q (3 pacienti), abnormality chromosomu 18 (9 pacientů) a další. Případy s delecí v oblasti 6q byly dále vyšetřeny s použitím arrayCGH čipu specifického pro chromosom 6. Určili jsme nejmenší společnou deletovanou oblast v pruhu 6q21 o velikosti 1,4 Mb. Podle literatury je delecce 6q u pacientů s B-CLL spojena s nepříznivou prognózou, předpokládáme proto, že v této oblasti leží neznámý tumor-supresorový gen, který by mohl být zapojen v patogenezi B-CLL. V naší práci budeme prezentovat výsledky klasického cytogenetického vyšetření, metody FISH a arrayCGH u 50 pacientů s B-CLL a hodnotit klinický význam nalezených změn. Tato práce je podporována granty NR 9484 and MSM 6198959205.

#### P22 / 1562.

##### **Nové metody standardizace a optimalizace sběru periferních kmenových buněk**

Fátorová Ilona, Bláha Milan, Vokurková Doris, Vroblová Vladimíra, Malý Jaroslav (II. interní klinika - OKH FN a LF UK, Hradec Králové; ÚKIA, Hradec Králové; I. interní klinika – OKH, Hradec Králové)

Úvod: Kvalita štěpu periferních kmenových buněk (PBSC) pro následnou transplantaci závisí na výtěžku CD34+ buněk v tomto štěpu. Počet CD34+ buněk se obvykle stanovuje průtokovou cytometrií podle tzv. ISHAGE protokolu a cut off hodnota pro zahájení separace je 20 CD34+ buněk/κl. Tato metoda je však časově i finančně náročná. Cíl práce: Zjistit, zda lze tuto metodu nahradit dalšími perspektivními metodami. a) Porovnávali jsme ji s metodou stanovení hematopoetických progenitorových buněk (HPC) na analyzátoru Sysmex XE-2100, která je rychlá a levná. Stanovili jsme i specifitu a senzitivitu pro různé cut off hodnoty HPC a zjišťovali jsme optimální počet pro zahájení separace PBSC. b) Dále jsme metodu stanovení CD34+ porovnávali se stanovením enzymu aldehyddehydrogenázy (ALDH) a CD133+ buněk na průtokovém cytometru. Metodika: V období 8/2007 až 12/2008 jsme vyšetřili 54 osob (M 30, Ž 24; věk: 20 – 67 let, medián 56 let) a provedli 159 leukaferéz (r=3/osobu). Jednalo se o soubor pacientů s mnohočetným myelomem, leukemiemi a lymfomy. Vyšetření jsme provedli vždy z periferní krve (PB) před separací a z buněčného koncentrátu (CC) po separaci. Výsledky: Korelace CD34+ vs. HPC (R=0,592) a CD34+ vs. ALDH (R=0,574) v PB byla dobrá, korelace CD34+ vs. CD133+ (R=0,971) a CD34+ vs. CD34+/CD133+ (R=0,915) v PB byla velmi dobrá. Korelace v CC byla velmi dobrá v případech CD34+ vs. ALDH (R=0,865), CD34+ vs. CD133+ (R=0,971) a CD34+ vs. CD34+/CD133+ (R=0,972), korelace CD34+ vs. HPC (R=0,244) byla slabá. Zjistili jsme, že senzitivita se vzrůstajícím počtem HPC ve vzorku klesá a specifita stoupá. Závěry: Všechny výše uvedené metody při vyšetření PB před separací velmi dobře korelují se stanovením CD34+ buněk. Metody ALDH a CD133+ jsou s CD34+ metodou srovnatelné i z hlediska ekonomického a časového. Pro nás je nejprůnosnější stanovení HPC (výsledek je rychle k dispozici) a je i finančně nenáročná. Jako optimální cut off hodnota pro zahájení separace PBSC se jeví počet 30 HPC/κl (senzitivita 78,1%, specifita 64,2%) a vyšší. Hodnota 10 HPC/κl (senzitivita 91,8%) a nižší je limitem, kdy není nutné vyšetřovat CD34+ buňky a není vhodné ani zahajovat separaci (následná malá výtěžnost). Při hodnotách HPC mezi 10 – 30/κl doporučujeme současně vyšetřovat i CD34+ buňky. Metoda HPC není vhodná pro stanovení počtu PBSC z CC (slabá korelace). Ostatní metody lze pro stanovení PBSC z CC využít. Práce byla podpořena z Výzkumného záměru MZO 00179906/9802

**P23 / 1496.****Zastoupení subpopulace BB9+ v populaci CD34+ buněk u pacientů stimulovaných filgrastimem ke sběru periferních kmenových buněk**Novák Martin, Juránová J., Procházka V., Pikalová Z., Indrák K. (*HOK FN, Olomouc*)

Autologní transplantace hematopoetických krevních buněk umožňuje podání vysoce dávkované chemoterapie s následnou restitucí krvetvorby. Hematopoetické krevní buňky schopné obnovy krvetvorby jsou v rutinní praxi identifikovány pomocí markeru CD34. Dle recentních prací je však schopnost diferenciacie do všech krevních řad a tedy označení periferní hematopoetické krevní buňky sensu stricto vyhrazena pouze minoritní subpopulaci těchto buněk, které mimo pozitivitu CD34+ exprimují i marker BB9. Cílem naší práce bylo metodou vícebarevné průtokové cytometrie určit procentuální zastoupení CD34+/BB9+ populace u nemocných v přípravě k autologní transplantaci periferních hematopoetických krevních buněk. Bylo provedeno celkem 35 vyšetření u 17 nemocných (6x mnohotný myelom, 5x difúzní veľkobuněčný lymfom, 2x anaplastický veľkobuněčný lymfom, 2x Hodgkinův lymfom, 1x Sézaryho syndrom, 1x periferní T-Nehodgkinův lymfom) Vzorky periferní krve byly vyšetřeny metódou lyse-wash na průtokovém cytometru BD FACSCalibur za použití protilátek anti-CD45 PerCP, anti CD34 APC a anti BB9 PE. Jako gate byla zvolena populace CD34+ a bylo napočítáno vždy minimálně 1000 CD34+ buněk. Analýza byla provedena v programu Cell Quest Pro. Medián procentuálního zastoupení periferních hematopoetických krevních buněk sensu stricto, tedy CD34+ / BB9+, byl 39,44%. Zbývajících 60,56% buněk neslo imunofenotyp CD34+ / BB9-. Je tedy zřejmé, že CD34+ / BB9+ tvoří pouze subpopulaci všech CD34+ buněk, vyplavených po primingu do periferního oběhu nemocných. Lze očekávat, a práce je takto i dále plánována, že zastoupení BB9+ subpopulace bude rozdílné u jednotlivých diagnóz a pravděpodobně i u různých metod primingu. Dedikace: Výzkum byl podpořen grantem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy MSM 6198959205.

**P24 / 1587.****Koľko buniek potrebujeme na úspešnú regeneráciu krvotvorby po autológnej transplantácii?**Hrubíško Mikuláš, Pribulová Hana, Jánošová Oľga, Zwiwka Michal, Hapalová Jolana, Bojtárová Eva, Mistrík Martin (*Klinika hematológie a transfúziológie FN sP Bratislava, Nemocnica sv. Cyrila a Metoda Petržalka, Bratislava*)

Dostatočný počet krvotvorných buniek (KB) v štepe je základným predpokladom úspešnej transplantácie. Na rýchlu orientáciu slúži vyšetrenie CD34 pozitívnych (CD34+) buniek, avšak lepšiu informáciu o kvalite KB podá až vyšetrenie koloniformných jednotiek (CFU). Li-

terárne údaje o týchto parametroch sa líšia. Naším cieľom bolo vyhodnotiť skúsenosti s odbermi a kontrolou kvality KB z hľadiska vzájomnej súvislosti oboch parametrov a ich dostatočnosti na obnovu krvotvorby po autológnej transplantácii KB. Metodiky: Cytofluorometricky sme vyšetřili 210 transplantátov periferných KB od 121 pacientov s hematologickými malignitami na obsah CD34+ buniek. Metódou kultivácie in vitro sme vyšetřili aj obsah CFU. Regeneráciu krvotvorby sme stanovili na základe dňa dosiahnutia hodnôt leukocytov (Le) >1,0 G/l a trombocytov >20 G/l. Výsledky: Podľa obsahu CD34+ buniek bolo 51 štepov nedostatočných (hodnoty CD34+ buniek >1,0x10<sup>6</sup>/kg podľa literatúry) a 47 hraničných (hodnoty >1,0 a >2,0x10<sup>6</sup>/kg). V takýchto prípadoch sme štandardne indikovali aj druhý (v troch prípadoch i tretí) zber PKB. Nedostatočné hodnoty CFU (>20x10<sup>4</sup>/kg – hodnota určená podľa našich vlastných skúseností s regeneráciou krvotvorby po transplantácii) sme zaznamenali len v 22 prípadoch z 51 nedostatočných na základe počtu CD34+ buniek. V odberoch hraničných na základe CD34+ buniek bolo len 9 nedostatočných aj podľa vyšetřenia CFU, zatiaľ čo väčšina (38) zo 47 hraničných štepov bola podľa hodnôt CFU dostatočná. Zo 112 odberov PKB s obsahom CD34+ buniek >2,0x10<sup>6</sup>/kg len v 2 prípadoch nebol odber na základe počtu CFU dostatočný, v ostatných 110 štepoch bol obsah CFU dostatočný dokonca na 2-50 (!) transplantácií. Transplantovali sme len pacientov so ziskom CFU >20x10<sup>4</sup>/kg a u všetkých došlo k regenerácii Le do 19 dní. Záver: Korelácia výsledkov vyšetřenia CD34+ buniek a CFU je dobrá (korelačný koeficient R = 0,654), nie je však dokonalá. Normy CD34+ buniek sú v niektorých prípadoch nepresné a na základe tohto vyšetřenia by mohlo dôjsť k zbytočnému vyradeniu transplantátu, ktorý je inak na základe hodnôt CFU dostatočný. Na druhej strane, v oboch prípadoch, keď vyšetřenie CD34+ bb. poukazyvalo na dostatočný štep, avšak hodnoty CFU boli nedostatočné, išlo o chorých, ktorí neboli v remisii a pozitivita znaku CD34 mohla určovať aj blastickú populáciu. Naše výsledky poukazujú na to, že vyšetřenie CD34+ buniek a CFU nie sú len dva pohľady na to isté, ale každé vyšetřenie zachytáva mierne odlišnú populáciu buniek.

**P25 / 1438.****Klinické a histologické charakteristiky reakce štěpu proti hostiteli v oblasti dutiny ústní po alogenní transplantaci krvetvorných buněk po přípravě s fludarabinem a melphalanem (FLU/MEL)**Vokurka Samuel, Boudová Ludmila, Svoboda Tomáš, Karas Michal, Koza Vladimír (*Hematologicko-Onkologické odd., FN, Plzeň; Šiklův patologicko-anatomický ústav, FN, Plzeň*)

Úvod: Chronická reakce štěpu proti hostiteli (GVHD) je významnou komplikací alogenních transplantací krvetvorných buněk (SCT). Sliznice dutiny ústní (DÚ) může být postižena jak při GVHD akutní, tak především chro-

nické u 54-80% pacientů. Histopatologické literatury o GVHD DÚ je málo. Nejsou zkušenosti s GVHD DÚ po SCT s předtransplantační přípravou fludarabin/melfalan 140mg/m<sup>2</sup> (FLU/MEL). Cíl: Charakterizovat klinicko-patologické rysy GVHD DÚ po SCT s přípravou FLU/MEL. Metodika: Prospektivní sledování 71 pacientů po SCT FLU/MEL. Diagnostika a tíže GVHD dle National Institutes of Health (NIH). Histologická verifikace vzorků bukalní sliznice při klinicky zřejmé GVHD DÚ. Výsledky: Akutní GVHD DÚ rozvinuta u 6/71 (8%), resp. 6/29 (21%) pacientů s akutní GVHD. Nebyl rozdíl s pacienty po Bu/CY2 (8% vs. 4%, p=0,67). Rozvoj postižení od dne +85 (40-140), trvání 24 (7-54) dní, ústup v den +113 (93-150) při systémové léčbě. Obtíže: suchost 67%, bolest 33%. Klinika: lichenoidní 83%, erytém 33%, defekt-pseudomembrána 17%. Oblast postižení: bukalní 100%, jazyk 33%. Chronická GVHD DÚ rozvinuta u 21/71 (29%), respektive u 21/29 (72%) pacientů s chronickou GVHD. U 17% v rámci chronické GVHD pouze izolované postižení DÚ. Nebyl rozdíl s pacienty po Bu/CY2 (29% vs. 20%, p=0,46). Rozvoj postižení DÚ od dne +230 (107-540), trvání 135 (11-665) dní, ústup v den +362 (178-835) při lokální nebo systémové léčbě. Obtíže: suchost 71%, bolest 52%, dyskomfort 29%. Klinika: lichenoidní 100%, erytém 38%, defekt-pseudomembrána 48%. Max st. postižení dle NIH: st.1- 80%, st.2- 10%, st.3- 10%. Oblast postižení: bukalní 100%, jazyk 43%, rty 33%, vše 19%. Při souhlasu u 14 pacientů odebráno 12 validních vzorků sliznice - 4x klinicky akutní a 8x chronická GVHD. Nebyly histologické vlastnosti rozlišující nesporně akutní GVHD od chronické. Závěr a diskuze: Byly charakterizovány rysy chronické a především akutní GVHD DÚ, když o tomto není dostatek literatury. Klinické a histologické charakteristiky chronické i akutní GVHD DÚ se prolínají. Odlišení forem vyžaduje hodnotit klinicko-patologický obraz u pacienta jako celku. Těžké orální GVHD jsou po FLU/MEL málo časté, ale s ohledem na délku přetrvávání (medián prakticky 3-4 měsíce) i nižších stupňů postižení se jedná o klinicky významný problém.

#### P26 / 1558.

##### WAA apheresis register – last results in the Czech Republic

Bláha Milan, Pták Jan (II. interní klinika, OKH, LF UK Hradec Králové; Transfúzní oddělení nemocnice, Frýdek-Místek)

Background: Therapeutic aphereses are important contribution of transfusion medicine to the therapy of some serious diseases. They are performed in 7 centres in Czech Republic. Two of them have been registered their procedures in WAA register. One centre (I) is located in Moravia (Ostrava/Frýdek) and the other (II) in Bohemia (Hradec Králové). We give a report on this activities. Methods: WAA is a webb-based registry. So far 205 patients (672 procedures) have been included. A median of 3,3 treat-

ments have been performed (1-26). Main indications: haematological and lipid apheresis, stem cell collection (autologous, less from donors) and neurological. Both centres are including their procedures regularly. Results: The reason of apheresis was therapeutic in 83% and retrieval of blood components in 17%. Blood access: mainly peripheral vessels (90%), central catheter through subclavia route or femoralis vein (9%) and AV fistula (in 1% only). Anticoagulant was ACD-A mainly. Replacement fluid was mainly by albumin. Advers events were registered in centre I in 3, 1%, in centre II in 5, 6% of procedures. They were clinically not relevant and no death occurred due to treatment. The connection with the leading centre in Sweden was without problems. The administrator was able to collect data to the end of each year or for the separate centres upon request. The actual version of WAA register is „user friendly“, data submission are accompanied by a clear help. To enter data of one performed procedure usually lasts about 2-3 minutes. We can summarize that there were no significant differences between the centre I and II. Conclusion: Analyses of data in WAA register enables improvement of quality of apheresis. To learn more about various indications for apheresis as well as learn about the risks and to reduce adverse events, the use of WAA register is helpful as a quality assurance measure. Supported by the grant of IGA MH CZ NS/9743-4.

#### P27 / 1555.

##### Hemorheopheresis in the treatment of microcirculatory disorders

Bláha Milan, Rencová Eva (II. <sup>nd</sup>Department of Internal Medicine, Division of Clinical Hematology, LF UK Hradec Králové; Department of Ophthalmology LF UK, Hradec Králové)

Background: The single rheopheresis treatment simultaneously eliminates an exactly defined spectrum of high-molecular weight rheologically relevant plasma proteins (i.e.  $\alpha$ 2-macroglobulin, fibrinogen, LDL-cholesterol, lipoprotein(a), von Willebrand factor (vWF), immunoglobulin M (IgM), fibronectin, and putatively multimeric vitronectin). This results in the immediate pulsed reduction of plasma viscosity as well whole blood viscosity, which with a series of treatments can lead to sustained microcirculatory recovery, and change significantly the natural course of a chronic disease. Methods and patients: In the prospective trial presented here, 41 patients were treated - severe familiar hypercholesterolemia (FH): 5 pts; non-healing lesions caused by severe ischemic diabetic foot syndrome (IDFS): 6 pts; age related macular degeneration (AMD): 20 pts; acute sensorineural hearing loss (ASHL): 5 pts; thyroid orbital endocrinopathy (TAO): 5 pts. Our own modification of rheopheresis was used: Plasma, free from cellular elements is obtained by blood cell separator (Cobe-Spectra, Denver, USA) in high-speed centrifuga-

tion. Then it is run through the „second stage“ – a rheofilter (Evaflux 4A, Kuraray) with ethylene-vinyl-alcohol hollow fibres with holes of 0,03 micrometer. Plasma flow is continuous, anticoagulation done with heparin. Basic amount of processed plasma (calculated by Cobe computer) is 1,5 of body volume. The size of holes in the filter enables to retain the above mentioned high-molecular elements. Haematological, biochemical and haemorheological parameters were measured before and after procedures and after the finishing of therapeutic series (AMD 8 procedures, IDFS 10, ASHL 3, TAO 10). Results: Rheological procedures resulted in significant decreases of pathologically effective substances: alfa2-macroglobulin 57,6%, fibrinogen 68,6 %, IgM 61,5 %, LDL-cholesterol 75,0 %, apolipoprotein B 76,0 %, lipoprotein(a) 63,2 %. It resulted in blood/plasma viscosity decrease (14,13/12,5 %). Diabetic foot ulcers were healed in 4 of 6 pts. No progression from dry to wet form of AMD has been observed during 2 years. Side effects: 6,3 %. Conclusions: Hemorheopheresis appears to be a method suitable adjunct therapy for diseases involving severe disturbance of microcirculation, especially when previous therapeutic options were not sufficiently effective or invasive procedures cannot be applied. Supported by the research task of IGA MH CZ MZO 00179906.

#### P28 / 1420.

##### Je léčebná výměnná plazmaferéza přijatelnou alternativou v hemorheoterapii?

Ptáček Jan, Kretková Renata, Sitek Petr (*Hematologicko-transfuzní odd. Nemocnice, Frýdek Místek, Interní oddělení, Frýdek Místek; Chirurgicko-traumatologické oddělení, Frýdek Místek*)

Hemorheoterapie jako léčebná metoda je popisována řadou autorů při léčbě poruchy periferního prokrvení (Borberg 2001, Koll 2002, Klingel 2003, 2005, Bláha 2008) především u náhlé ztráty sluchu, diabetické nohy a degenerativní makulopatie. Princip léčby spočívá ve snížení viskozity plazmy (krve) opakovanou redukcí hladin plazmatických složek s velkou molekulou (fibrinogen, IgM, alfa-2-makroglobulin, cholesterol, Lp(a), vW faktor, fibronectin a vitronectin) a tím zlepšení prokrvení v mikrocirkulaci a podpoře regeneračních procesů v periférii. Při této léčbě je možno využít buď selektivní eliminaci fibrinogenu s použitím imunoabsorpční techniky nebo eliminace více plazmatických složek s velkou molekulou s použitím speciálního filtru. Tyto metody jsou ekonomicky velmi náročné, vyžadují speciální přístrojové vybavení, filtry a adsorpční kolony jsou pouze na jedno použití a metoda není hrazena ze všeobecného zdravotního pojištění. Výhodou je absence náhradního roztoku. Obdobného účinku lze dosáhnout i opakovanou klasickou výměnnou plazmaferézou, jejíž provedení však vyžaduje použití náhradního roztoku. Prezentace popisuje hemaferetický způsob léčby výměnnou plazmaferézou

3 mužů s diabetes mellitus 2. typu léčený insulinem s dlouhodobě (24-26 měsíců) se nehojícími kožními defekty na nohách v rámci těžkého neuropatického syndromu diabetické nohy při dosavadní neúspěšné chirurgické léčbě. Pacienti byli zařazeni do hemorheoterapeutického programu na základě doporučení diabetologa a chirurga podiatrické ambulance. Podmínkou zahájení léčby byl odpovídající periferní žilní přístup, normální hodnoty krevního obrazu, normální hodnoty hladin plazmatických imunoglobulinů a CRP. Léčba spočívala v provedení série 10 výměnných plazmaferéz s výměnou 1 plazmatického objemu, prováděných v prodlužujících se intervalech během 8-9 týdnů. Výkony byly prováděny ambulantně z periferních žilních přístupů na separátoru COBE-Spectra. Pro substituci byl použit 5% albumin (2/3) a fyziologický roztok (1/3), jako antikoagulant byl standardně použit roztok ACD-A. U všech pacientů se podařilo docílit zhojení defektů kůže a podkoží. Nebyly zaznamenány žádné komplikace této léčebné metody. Jako vedlejší účinek léčby hodnotíme pokles hladiny hemoglobinu vlivem opakovaných ztrát krve v separačním setu a pokles hladiny imunoglobulinu IgG jako nezbytný průvodní jev při použití této neselektivní eliminační metody.



#### P29 / 1386.

##### Dlouhodobé sledování dárců po mobilizaci periferních kmenových buněk-zkušenosti Aferetického oddělení ÚHKT

Bhuiyan Ludvíková Zdeňka, Gašová Z., Böhmová M. (*ÚHKT Praha Aferetické oddělení, Praha*)

Periferní kmenové buňky se používají k alogenním transplantacím již řadu let. Získávají se od příbuzných i nepříbuzných dárců po stimulaci růstovým faktorem G-CSF, jehož dlouhodobé účinky zatím nejsou známy. Na našem pracovišti se periferní kmenové odebírají více než 10 let. V naší práci jsme se zaměřili na dlouhodobé sledování dárců kmenových buněk po stimulaci G-CSF. Hodnotili jsme jejich zdravotní stav, laboratorní parametry před stimulací a dlouhodobě po stimulaci. Všichni dárce byli před stimulací interně vyšetřeni a byli jim provedeny laboratorní odběry (KO, mineralogram, jaterní testy, základní koagulace, moč a sediment, RTG S+P, markery doporučených infekcí). Na zá-

kladě výsledků byli dárči indikováni k stimulaci G-CSF s následnou separací PBPC. K mobilizaci byl používán Filgrastim s.c.v jedné večerní dávce 8,5-17,7 ug/kg denně (medián 11,2 ug/kg). Většina dárců podstoupila stimulaci bez výraznějších potíží, 43 dárců (28 %) popisovalo nežádoucí účinky G-CSF ve formě flu-like syndromu. Separace byly zahajovány 5.den podávání růstového faktoru. Ve většině případů jsme použili periferní žilní přístup. Pouze u 13% dárců byl použit žilní přístup centrální. Ve všech případech bylo dosaženo požadované transplantační dávky s nutností různého počtu leukaferéz. Jednu separaci podstoupilo 42 % dárců, 2 separace 49 % a 3 separace 9 % dárců. Po ukončení sběrů byli dárči pozváni ke kontrole za týden (pouze KO), poté za 4,8,12 měsíců a dále jedenkrát za rok po dobu 10-ti let. (KO, FW, biochemie, jaterní testy, ELFO, moč). Ke kontrole se dostavilo 78 % všech dárců. Mobilizace zdravých dárců periferních kmenových buněk byla provedena bezpečně bez výraznějších nežádoucích účinků stimulace. Při dlouhodobém sledování dárců jsme nepozorovali závažnější patologické nálezy v souvislosti se stimulací růstovým faktorem G-CSF.

### P30 / 1503.

#### Prevalence HLA protilátek u dárek krve s graviditou v anamnéze

Bolcková Hana Tereza, Matějková Eva, Gašová Zdenka, Žlabová Jana, Vlachová Alena (ÚHKT, Praha; TO FNKV, Praha)

Mezi dárči krve se vyskytují také ženy s jednou nebo více graviditami v anamnéze. V průběhu těhotenství může dojít, zejména u multipar, k aloimunizaci paternálními antigeny plodu, vzniklé protilátky pak mohou být příčinou potransfuzních reakcí. Mezi nejzávažnější potransfuzní reakce způsobené pasivním přenosem protilátky v transfuzním přípravku patří TRALI (Transfusion Related Acute Lung Injury). Tato vzácná reakce bývá velmi těžká a může být i fatální. Za hlavní příčinu TRALI jsou považovány antileukocytární protilátky, jak specifické granulocytární, tak i HLA protilátky I. a/nebo II. třídy. Vyšetřování HLA protilátek u dárců s imunizačním podnětem v anamnéze by mohlo být jednou z cest, jak riziko TRALI snížit. V období od srpna do prosince 2008 jsme prováděli vyšetřování HLA protilátek u dárek ÚHKT a TO FNKV, které měly v anamnéze alespoň jednu graviditu. Pro detekci HLA protilátek jsme použili LCT test a ELISA kity firmy GTI: QuikScreen [GTI] pro detekci HLA protilátek I. třídy a B-Screen [GTI] pro detekci HLA protilátek II třídy. Celkem jsme takto vyšetřili 105 dárek. Prevalence HLA protilátek v této skupině byla 15,24% (16/105 případů) detekovaných pomocí ELISA kitů versus 4,76% (5/105 případů) detekovaných pomocí LCT testu. Z 16ti ELISA pozitivních vzorků bylo 9 (56.25%) anti-HLA protilátek I. třídy, 2 (12.5%) byly II. třídy a v 5ti případech (31.25%) byla detekována směs HLA

protilátek I. i II. třídy. Mezi 16ti pozitivními ženami 4 měly v anamnéze jednu graviditu, 12 jich bylo gravidních vícekrát (2-7x). Dárkyně s pozitivními HLA protilátky byly dočasně vyloučeny z dárcovství, hladina jejich HLA protilátek bude dále sledována. Tato práce vznikla za podpory grantu CEZ 237360001 UHKT

### P31 / 1414.

#### Incidence erytrocytární aloimunizace u těhotných žen

Lubušký Marek, Holusková Iva, Procházka Martin, Vornáčková Kateřina (Porodnicko-gynekologická klinika FN a LF UP, Olomouc; Transfúzní oddělení FN, Olomouc; 1. chirurgická klinika LF UP a FN, Olomouc)

Cíl studie: Zjistit u těhotných žen incidenci klinicky významných antierytrocytárních aloprotilátek, které mohou způsobit závažné hemolytické onemocnění plodu a novorozence. Metodika: Na Transfúzním oddělení FN Olomouc bylo letech 2000-2008 vyšetřeno celkem 33818 těhotných žen. U všech byl na začátku těhotenství proveden screening nepravidelných antierytrocytárních protilátek + event. identifikace aloprotilátky. Výsledky: Klinicky významné antierytrocytární aloprotilátky byly diagnostikovány ve 482 případech. Nejčastější příčinou mateřské aloimunizace byl antigen E s incidencí 5,1‰ (172/33818), dále antigeny D 3,8‰ (127/33818), M 1,4‰ (46/33818), C 1,3‰ (44/33818), K 1,2‰ (41/33818), c 0,6‰ (20/33818), S 0,4‰ (15/33818), Jka 0,2‰ (7/33818), PP1pk (Tja) 0,1‰ (3/33818) a antigen Fya 0,1‰ (2/33818). Závěr: I při provádění profylaxe D aloimunizace podáváním anti-D imunoglobulinu D-negativním ženám v těhotenství a po porodu D pozitivního dítěte představuje D antigen stále 2. nejčastější příčinu erytrocytární aloimunizace matky. Zbývající klinicky významné aloimunizace jsou způsobeny non D antigeny systému Rh, antigeny systému Kell a vzácně se vyskytujícími antigeny v krevních systémech MNS a Kidd. V olomouckém regionu v posledních čtyřech letech byla incidence Rh (D) aloimunizace u těhotných žen 5š. Předpokládáme-li v České republice podobné výsledky tak se jedná při 100.000 porodech asi o 500 Rh (D) aloimunizovaných těhotných žen ročně. Pokud dvě třetiny z nich budou mít D-pozitivní plod tak můžeme předpokládat asi 333 ohrožených plodů ročně. Všem případům Rh (D) aloimunizace však lze teoreticky zabránit profylaktickým podáním anti-D gamaglobulinu v potřebné dávce při každé potenciálně senzibilizující události. V olomouckém regionu v posledních deseti letech byla incidence Kell (K) aloimunizace u těhotných žen 1,2š. Předpokládáme-li v České republice podobné výsledky tak se jedná při 100.000 porodech asi o 120 Kell (K) aloimunizovaných těhotných žen ročně. Při 5% pravděpodobnosti, že budou mít K-pozitivní plod tak můžeme předpokládat asi 6 ohrožených plodů ročně. V České republice není ženám před ukončením reprodukčního období při transfuzi podávána vždy Kell (K) kompatibilní nebo Kell (K) negativní krev.

**P32 / 1536.****Oportunní neuroinfekce *Toxoplasma gondii*, komplikace imunosupresivní léčby pacienta s idiopatickou trombocytopenickou purpurou**

Urbanová Renata, Hluší Antonín, Raida Luděk, Pecůchová Marie, Papajík Tomáš, Indrák Karel (*HOK FN, Olomouc*)

Přestože se v každodenní praxi u hematologických pacientů setkáváme s infekčními komplikacemi, zejména u některých oportunních infekcí zůstává správná diagnostika a včasná terapie obtížná. Popisujeme kazuistiku 43letého muže rok léčeného pro idiopatickou trombocytopenickou purpuru (ITP) kombinací kortikoterapie a cyclosporinu A. Na HOK FN Olomouc byl přijat pro tři dny trvající subfebrilie, bolesti hlavy, poruchu vidění, amenní stav a dezorientaci. Magnetická rezonance (MR) mozku prokazuje rozsáhlou arachnoideální cystu vpravo bez známek expanze, která se však od počátku nejevila být příčinou pacientových obtíží. V diferenciativní diagnostice neutroptropních infekcí bylo od počátku pomýšeno na toxoplazmovou infekci, proto byla bezprostředně po přijetí nasazena cílená kombinovaná terapie antibiotiky zahrnující cotrimoxazol a dalacin. Čtvrtý den od zahájení terapie došlo ke zmírnění bolesti hlavy, zlepšena orientace pacienta. Vyšetření likvoru zahrnující biochemické vyšetření, kultivaci, imunofenotypizaci, PCR diagnostiku neutroptropních infekcí včetně *Toxoplasma gondii*, stejně jako serologická vyšetření negativní. Proto byla ukončena terapie dalacinem, následně recidiva potíží pacienta, nauzea, kontinuální bolesti hlavy. Na MR mozku byl nově popsán nález vícečetných drobných ložisek supratentoriálně postkontrastně se sytících prstenčitým lemem (ring enhancing), rentgenologem vysloveno podezření na parazitární postižení mozku, zahajujeme proto kombinovanou terapii dalacin, cotrimoxazol a pyrimethamin, současně byl pacient léčen terapeutickou dávkou antimykotik. Stereotaktická biopsie ložiska mozku diagnosticky nepřínosná, histologicky prokázána pouze glióza. Postupně na kombinované antibiotické léčbě dochází ke stabilizaci klinického stavu pacienta, regresi nálezu na MR mozku. Spolehlivé definitivní potvrzení reaktivace *Toxoplasma gondii* je obtížné, senzitivita PCR diagnostiky je <50%. U imunokompromitovaných pacientů může mít infekce *Toxoplasma gondii* fatální průběh, se zahájením léčby nelze tedy váhat. Používá se proto v praxi u těchto pacientů s klinickým podezřením na toxoplazmovou infekci empirická terapie metodou terapeutického pokusu. V případě správně indikované léčby je popisován promtní efekt terapie, což dokumentuje také naše pozorování.

**P33 / 1437.****Bezpečnost intratékálních aplikací depotního cytosin-arabinosidu DepoCyt**

Vokurka Samuel, Svoboda Tomáš, Hrabětová Marcela, Mohammadová Leka, Karas Michal, Koza Vladimír (*Hematologicko-Onkologické odd. FN, Plzeň*)

Úvod: profylaktické intratékální (i.t.) aplikace cytosin-arabinosidu (Ara-C) a metotrexátu jsou konvenční a důležitou součástí léčby pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií (ALL) a vysoce agresivními lymfomy. K zajištění adekvátní koncentrace cytostatik a s ohledem na krátký poločas jejich rozpadu jsou i.t. aplikace doporučovány v intervalu až 2-3x týdně. Depocyte - depotní liposomální forma Ara-C - může být s ohledem na prodloužený poločas rozpadu aplikován v intervalu minimálně 2 týdny a jeho efekt byl již opakovaně prokázán. Cíl: zhodnotit bezpečnost aplikací Depocyte u pacientů indikovaných k profylaktické nebo léčebné i.t. aplikaci Ara-C. Metodika: prospektivní nesponzorované sledování. Depocyte 50mg injekce byl aplikován za aseptických kautel i.t. v intervalu 14 dní. Pacienti současně léčeni systémovou chemoterapií (2x s imatinibem při Ph+ ALL), antiemetiky a zajištění kortikoidy. Výsledky: v 6-10/2008 byl lék aplikován celkem 9 konsekutivním pacientům (7x B-ALL, 1x T-ALL, 1x T-lymfoblastický lymfom) s mediánem věku 40 (20-60) let, 4 ženy a 5 mužů. Celkem aplikováno 19 dávek Depocyte s mediánem dvou dávek podaných na pacienta (min. 1, max. 6). V rámci profylaxe podáno celkem 10 dávek 6 pacientům bez cerebrospinálního (CNS) postižení. 3 pacienti s CNS postižením malignitou byli léčeni celkem 9 dávkami (min.1, max.6). Nežádoucí účinky vztažené na aplikaci dávky: cephaléa 16%, nauzea 10%, vertigo 10%, zvracení 5%, lumbální bolest 5%, meningismus 0, zmatenost nebo somnolence 0, infekce 0, jiné 0. S mediánem sledování 7 (5-9) měsíců žije 5/6 pacientů bez původního CNS postižení (1 zemřel na relaps ALL) a 1/3 s původně CNS postižením (úmrtí na relaps ALL a lymfoblastomu). Závěr a diskuze: s ohledem na omezený počet pacientů, heterogenitu souboru a konkomitantní systémovou léčbu nemůžeme zodpovědně hodnotit léčebný efekt Depocyte, nicméně zkušenosti ukazují na jeho příznivý bezpečnostní profil a velmi dobrou tolerovatelnost. Limitem širšího využití je cena léku (38 000 Kč). Poskytovaná možnost omezení četnosti i.t. aplikací by byla přínosem pro rizikové trombocytopenické a neutropenické pacienty.

**P34 / 1394.****Léčba relapsu akutní promyelocytární leukemie – zkušenosti jednoho centra**

Szotkowski Tomáš, Hubáček Jaromír, Faber Edgar, Indrák Karel (*HOK FN, Olomouc*)

Úvod Akutní promyelocytární leukemie (APL) je v éře all-trans-retinové kyseliny vyléčitelná u velké většiny nemocných. Relapsy jsou málo časté a doporučení pro jejich léčbu nejsou, vzhledem k malému počtu těchto nemocných, zatím jednotná. Metody V naší práci jsme retrospektivně zhodnotili výsledky léčby relapsů APL v souboru nemocných léčených na našem pracovišti od roku 1993. Výsledky Do konce února 2009 byla stanovena diagnóza APL 45 nemocným. 40 (88,9%) dosáhlo kompletní remise onemocnění. U 5 nemocných (12,5%)

došlo k relapsu, přičemž u 3 šlo o relaps hematologický a u 2 o relaps molekulární. První 4 nemocní (všichni s pozdním relapsem, tj. po déle než rok trvající kompletní remisi) byli léčeni stejnou léčbou, jaká byla použita v primoterapii – tedy kombinací ATRA a chemoterapie podle GIMEMA/EORTC protokolu. 1 nemocná byla navíc léčba doplněna následnou autologní transplantací krvetvorných buněk. U 1 nemocného byla léčba výrazně redukována pro jeho nespoupráci. Ostatní 3 nemocní žijí v dlouhotrvající 2. kompletní remisi (trvající 15, 6 a 5 let). U poslední nemocné šlo o časný relaps sekundární APL, krátce po dokončení konsolidační léčby na udržovací léčbě ATRA, což svědčilo pro pravděpodobný rozvoj rezistence k tomuto léku. Podle aktuálně platných doporučení (rok 2008) byla indikována a podána léčba oxidem arsenitým, která bez významných komplikací a nežádoucích účinků vedla k dosažení 2. molekulární remise. Nemocná byla následně alogenně transplantována. Podrobné informace budou prezentovány. Vypracováno s podporou grantu IGA MZ ČR NR 9481-3 a VZ MŠMT ČR 6198959205.

### P35 / 1377.

#### An 'intention-to-treat' factor in 299 AML patients – single center experience

Szotkowski Tomáš, Mužík Jan, Chroust Karel, Indrák Karel (HOK FN, Olomouc; IBA MU, Brno)

Initial intention of AML patients' treatment is not always kept during the course of therapy. There are many factors influencing the clinicians' decision-making about changes of intended treatment. Neither these changes nor their effect on patients' survival have been analyzed generally. The aim of analysis was to compare the initially intended option of consolidation treatment (Tx) with subsequently realized one and explore the effect of this decision and its parity or disparity with realized Tx on its outcomes. Data of 299 consequently curatively treated AML patients (1996-2008; APL were excluded) in Olomouc were analyzed; M:F = 45.5% : 54.5%; 50.5% of pts were younger (<55); cytogenetic risk distribution : good 10.7%, intermediate 48.5%, poor 31.4% (9.4% NA). 55.9% of pts were intended to be consolidated with chemotherapy (CH), 10% of pts with autologous transplantation (autoSCT) and 34.1% of pts with allogeneic transplantation (alloSCT). There was significantly higher proportion (87.9%) of younger pts in groups intended to be transplanted when compared with patients intended to be consolidated with CH (21%;  $p < 0.001$ ). We found significant difference in distribution of cytogenetic risk among groups of pts according to intention-to-treat. An intended treatment has been kept in comparable proportion of pts (48-56%) of all groups. Both the highest incidence of changes in treatment course and the best survival were found in the group of pts intended to be treated with autoSCT. However, there was the highest pro-

portion of pts with good cytogenetic prognosis and younger pts in this group, too. The treatment outcome and survival were worse in pts intended to be treated both with CH and alloSCT. The pts both intended to and treated with autoSCT did have comparable survival with pts intended to be treated with autoSCT and treated with another treatment option subsequently. The pts both intended to and treated with alloSCT did have better survival when compared with pts intended to be treated with alloSCT and consolidated with another treatment option finally. The pts both intended to and treated with (any) SCT did have better survival when compared with pts intended to be transplanted and consolidated with CH. The worst outcome we found in pts intended to be treated with alloSCT and consolidated with CH only. Supported by IGA MZ ČR NR/9481-3 and VZ MSMT ČR 6198959205.

### P36 / 1529.

#### Případ raritní nádorové duplicity - Hodgkinova lymfomu a malobuněčného plicního karcinomu (kazuistika)

Šmardová Lenka, Král Zdeněk, Tomášková Marcela, Babičková Lenka, Vášová Ingrid, Mayer Jiří, Skříčková Jana (Interní hematologická klinika a Klinika nemocí plicních a TBC, Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty Masarykovy univerzity Brno)

Úvod: Nádory plic patří mezi nejčastější sekundární malignity u pacientů léčených pro Hodgkinův lymfom (HL). Jejich incidence stoupá výrazně po 15. roce od ukončené terapie a za hlavní rizikové faktory je považována radioterapie a kouření cigaret. Vzhledem k obvykle nízkému věku pacientů v době diagnózy HL se s nádorovou duplicitou prakticky nesetkáváme. Materiál: 60letý pacient, dlouholetý těžký kuřák, byl od prosince 2007 vyšetřován na plicním oddělení spádové nemocnice pro horečky, výrazné pocení a váhový úbytek (> 10%). Při objektivním vyšetření byla zjištěna lymfadenopatie na krku a v pravém nadklíčku a CT vyšetřením dále mediastinální a hilová lymfadenopatie s infiltrací apikodorzálního segmentu pravé plíce. Bronchoskopie opakovaně neprokázala přítomnost nádorových buněk, z biopsie nadklíčkové uzliny byla stanovena diagnóza klasického HL (typ smíšená buněčnost) a pacient byl proto v únoru 2008 předán k léčbě na naše pracoviště. Navrhované histologické došetření plicního nálezu pacient vstupně odmítl. Výsledky: S přihlédnutím k věku, klinickému stavu a obtížné spolupráci pacienta jsme zahájili léčbu režimem ABVD (adriamycin, bleomycin, vinblastin, dacarbazin). Systémové příznaky ustoupily, průběh léčby však byl komplikován opakovanými infekcemi dýchacích cest. Při CT restagingu po podání IV. cyklu chemoterapie ABVD v červenci 2008 došlo sice k vymizení krční lymfadenopatie, infiltrát v oblasti S1-2 pravé plíce a plicního hilu však zprogreboval, zužuje hlavní bronchus a deviuje jícnem.

Pacient nyní s invazivním došetřením souhlasí, punkční biopsií plicního infiltrátu byl prokázán malobuněčný plicní karcinom (SCLC). Od září 2008 byl pacient léčen na Klinice nemocí plicních a TBC FNB s ohledem na limitované stadium onemocnění chemoterapií ve složení cisplatina a etoposid (celkem 4 cykly). Kontrolní CT vyšetření bohužel prokazuje další progresi a pro zhoršující se bolesti hrudníku byla plánovaná zevní radioterapie s paliativním záměrem. Vzhledem k dalšímu zhoršení klinického stavu (neurologické symptomatologii při pravděpodobném metastatickém postižení mozku) však tato léčba nebyla zahájena a pacient byl předán k symptomatické léčbě na lůžko paliativní péče – 6 měsíců od zahájení onkologické léčby pro SCLC. Závěr: V kazuistice prezentujeme raritní případ nádorové duplicity, jedná se o druhé sdělení popsané v literatuře. Neobvyklé extranodální postižení u pacientů s lymfomem je vhodné histologicky verifikovat.

### P37 / 1517.

#### **Nové kardiální biomarkery v diagnostice kardiotoxicity hematoonkologické léčby – naše zkušenosti**

Horáček Jan M., Jebavý Ladislav, Tichý Miloš, Ulrychová Martina, Žák Pavel, Malý Jaroslav (*FVZ UO Hradec Králové, Katedra válečného vnitřního lékařství, Hradec Králové; Ústav klinické biochemie a diagnostiky, FN a LF UK, Hradec Králové; II. interní klinika – oddělení klinické hematologie, FN a LF UK, Hradec Králové*)

Cíl: Sledování kardiotoxicity hematoonkologické léčby pomocí sady kardiálních biomarkerů – myoglobin, CK-MB mass, kardiální troponin T a I (cTnT, cTnI), glykogenfosforyláza BB (GPBB) a kardiální typ proteinu vázajícího mastné kyseliny (H-FABP). Poslední 2 uvedené biomarkery nebyly v této indikaci dosud studovány. Soubor a metodika: Ve studii bylo celkem 43 pacientů s nově dg. akutní leukemií – 24 pacientů léčených konvenční chemoterapií (CHT) obsahující antiracykliny (celková kumulativní dávka  $463,2 \pm 114,3$  mg/m<sup>2</sup>) a 19 pacientů léčených vysokodávkovanou CHT (ablativní přípravný režim BuCy2 nebo TBI/Cy) s následnou transplantací krvetvorných buněk (TKB). Biochemické markery byly v 1. skupině stanoveny před zahájením léčby (před CHT), po 1. cyklu CHT s antiracykliny (po 1. CHT), po posledním cyklu CHT s antiracykliny (po posl. CHT) a s odstupem 6 měsíců po ukončení léčby (6 měsíců po CHT). Ve 2. skupině byly biochemické markery stanoveny před zahájením přípravného režimu (před PR), po podání přípravného režimu (po PR), po převodu štěpu krvetvorných buněk (po TKB) a s odstupem 14 dní po TKB (14 dní po TKB). Koncentrace biochemických markerů diagnostické pro kardiotoxicitu onkologické léčby nebyly dosud přesně stanoveny. Ve studii byly za zvýšené považovány koncentrace nad horní mez referenčního rozmezí doporučenou výrobcem (Roche Diagnostics pro myoglobin,

CK-MB mass, cTnT; Randox Laboratories pro cTnI, GPBB, H-FABP). Výsledky: Výsledky a horní mez referenčního rozmezí pro jednotlivé biomarkery jsou přehledně zobrazeny v tabulce 1 a 2. Závěr: Naše dosavadní zkušenosti naznačují, že stanovení GPBB by mohlo být užitečné pro časnou diagnostiku kardiotoxicity konvenční CHT obsahující antiracykliny i vysokodávkované CHT s následnou TKB. Z kardiálních troponinů se cTnI zdá být lepší než cTnT pro časnou detekci kardiálního poškození spojeného s léčbou antiracykliny. U asymptomatických pacientů jsou abnormální kardiální nálezy, včetně elevace kardiálních biomarkerů, považovány za projev subklinické kardiotoxicity a vyžadují další sledování v čase. Další prospektivní studie na větších počtech pacientů budou nezbytné k potvrzení našich předběžných výsledků a vymezení role nových cirkulujících biomarkerů při hodnocení kardiotoxicity v hematoonkologii. Podpořeno z výzkumného záměru MO 0FVZ0000503 a MZO 00179906.

Tabulka 1. Elevace biomarkerů kardiálního poškození v souvislosti s chemoterapií antiracykliny (n=24)

kardiální biomarkery	před CHT	po 1. CHT	po posl. CHT	6 měsíců po CHT
myoglobin nad 76,0 µg/l	0	0	0	0
CK-MB mass nad 4,80 µg/l	0	0	0	0
cTnI nad 0,01 µg/l	0	0	0	2 (8,3 %)
cTnI nad 0,40 µg/l	0	2 (8,3 %)	2 (8,3 %)	3 (12,5 %)
H-FABP nad 4,50 µg/l	0	0	0	0
GPBB nad 7,30 µg/l	0	4 (16,7 %)	5 (20,8 %)	5 (20,8 %)

Tabulka 2. Elevace biomarkerů kardiálního poškození v souvislosti s transplantací krvetvorných buněk (n=19)

kardiální biomarkery	před PR	po PR	po TKB	14 dní po TKB
myoglobin nad 76,0 µg/l	0	0	0	0
CK-MB mass nad 4,80 µg/l	0	0	0	0
cTnI nad 0,01 µg/l	0	0	0	0
cTnI nad 0,40 µg/l	0	0	0	0
H-FABP nad 4,50 µg/l	0	0	0	0
GPBB nad 7,30 µg/l	0	5 (26,3 %)	5 (26,3 %)	1 (5,3 %)

### P38 / 1519.

#### **Pneumocystová pneumónia (PCP) na Internej hematoonkologickej klinike FN Brno a LF MU v rokoch 1999-2008**

Tošková Martina, Lengerová Martina, Volfová Pavlína, Kocmanová Iva, Mayer Jiří (*IHOK, Brno; Centrum molekulární biologie a genové terapie IHOK, FN, Brno; Oddělení klinické mikrobiologie, FN, Brno*)

Úvod: Napriek tomu, že horúčka, dušnosť, bilaterálne intresticiálne infiltráty na pľúcach sú typické pre PCP, nie sú špecifické. Diagnóza PCP môže byť postavená až na dôkaze *Pneumocystis jirovecii* z bronchoalveolárnej laváže, eventuálne spúta a výnimočne z biopsie pľúc. Metódy: Retrospektívna analýza všetkých prípadov (PCP) na Internej hematoonkologickej klinike (IHOK) FN Brno v rokoch 1999-2008 s cieľom zistiť vývoj počtu prípadov, rizikové faktory, prínos jednotlivých diagnostických metód na stanovenie diagnózy a efekt použitej liečby. Výsledky: V sledovanom období bolo bronchoalveolárnou lavážou vyšetrených celkom 429 pacientov, z toho pozitívnych na *Pneumocystis jirovecii* bolo 46 (11%) pacientov (22 mužov, 24 žien) vo veku 18 – 73 rokov (medián 57 rokov). Počet prípadov sa v priebehu rokov nemení (1-8 prípadov za rok). 87% (40) pacientov malo hematologickú malig-

nitú, 11% (5) systémové ochorenie spojiva a 2% (1) autoimunitnú hemolytickú anémiu. PCP bola u 15% diagnostikovaná zároveň so základnou diagnózou, u 41% behom terapie zákl. ochorenia, u 29% v dobe progresie ochorenia, u 8,5% po transplantácii kostnej drene (auto-, alebo alo-génnej) a u 6,5% pacientov v remisii zákl. ochorenia. 61% pacientov užívalo v dobe diagnózy kortikoidy. Profylaxiu PCP užívali len 2 pacienti, jeden inhalačne Pentacarinát (pentamidin) 1x mesačne, druhý Biseptol 480mg/den (sulfametoxazol – trimetoprim), 95,5% bolo bez profylaxie. Auskultačný pľúcny nález malo len 34% pacientov, nález na RTG pľúc v dobe dg. malo až 93% (40/43) pacientov (dominovalo bilaterálne postihnutie pľúc 90%, 36/40). HRCT pľúc bolo indikované u 52% a všetci mali pozitívny nález (prevládalo postihnutie interstícia a obraz mliečneho skalenia 71%, 17/24). Diagnostika PCP sa opierala o dôkaz P. jiroveci PCR metódou (100%). Imunofluorescencia z bronchoalveolárnej tekutiny bola pozitívna iba u 10% (3/28). 87% pacientov bolo liečených vysokodávkovaným sulfametoxazolom-trimetoprimom 100mg/kg, 6,5% (3) pre alergiu dostávali primaquine + klindamicin a 6,5% pre včasný exitus liečbu nedostalo. Exitovalo 41% pacientov (19), z nich v príčinnej súvislosti na PCP 63% (12), na sekundárnu infekciu 26% (5) a progresiu základného ochorenia 11% (2). Záver: Z našej analýzy vyplýva, že PCP je závažná infekčná komplikácia imunokompromitovaných pacientov. Zlepšenie prežívania pacientov môže priniesť dôsledná profylaxia a včasná diagnostika a liečba.

#### P39 / 1539.

##### **Vývoj incidence a spektra kandidových kolonizácií a invazívnych infekcií v súvislosti se spotrebou flukonazolu na IHOK FN Brno v letech 2000 - 2008**

Weinbergerová Barbora, Kocmanová Iva, Ráčil Zdeněk, Winterová Jana, Tošková Martina, Mayer Jiří (*IHOK FN, Brno; Oddělení klinické mikrobiologie FN, Brno*)

Metody: Provedli jsme retrospektivní analýzu vývoje incidence a spektra izolátů *Candida* spp. jako kolonizačních kmenů a původců invazívnych infekcií na IHOK FN Brno v letech 2000–2008. Nálezy jsme korelovali se spotřebou flukonazolu na naší klinice v tomto období. Výsledky: Od roku 2000 do roku 2008 jsme měli celkem 47 pacientů s invazívní kandidózou na IHOK. Zaznamenali jsme klesající trend incidence této invazívní mykotické infekce (12 epizod v roce 2000 vs. 4 epizody v roce 2008). Ve všech případech se jednalo o izolaci *Candida* sp. z hemokultur, tedy o invazívní kandidémiie. Poměr *Candida albicans* vs. *nonalbicans* je ve sledovaném období stabilní, v průměru lehce ve prospěch kmenů *nonalbicans* (57% vs. 43%). Zastoupení potenciálně flukonazol-rezistentních kmenů kandid – *Candida glabrata* a *krusei* – zůstává stabilní po celé období, okolo 30%. Mezi kolonizačními kmeny mírně převažovala *Candida albicans* nad *nonalbicans* kmeny kandid (55% vs. 45%), z nichž nejčastěji

zastoupené byly *Candida krusei*, *glabrata*, *parapsilosis* a *tropicalis*. Rovněž v kolonizátech jsme nezaznamenali stoupající trend procentuálního zastoupení potenciálně flukonazol-rezistentních kandid, tyto tvořily v průměru kolem 30% všech kolonizačních kmenů. Vzhledem k nárůstu počtu pacientů s hematologickými malignitami a používání agresivnějších režimů vedoucích k hlubokým a prolongovaným neutropeniím u takto léčených nemocných dochází na naší klinice k výraznému lineárnímu nárůstu spotřeby azolového antimykotika - flukonazolu - ve sledovaném období (v PDD/1000LD: 190 v roce 2000 vs. 390 v roce 2008). Závěr: I přes dvojnásobný nárůst spotřeby flukonazolu, používaného na naší klinice v profylaktické antimykotické léčbě po celé sledované období, nedochází ke změnám v poměrném zastoupení potenciálně flukonazol-rezistentních kmenů kandid ani v kolonizátech ani v hemokulturách. Incidence invazívní kandidové onemocnění se na naší klinice v uvedeném období snižuje, což kopíruje uvedený trend spotřeby flukonazolu.

#### P40 / 1407.

##### **Implementácia cytogenetických a molekulárných markerov pri sledovaní detských pacientov s AML v klinickej praxi**

Ilenčíková Denisa, Slamka Tomáš, Nováková Petra, Píáčková Barbara, Ružbacký Rastislav, Čermák Martin, Ďurovčíková Darina (*Oddelenie onkologickej genetiky NOU a Katedra klinickej genetiky SZU, Bratislava*)

Úvod: AML je veľmi agresívne, fenotypicky a geneticky heterogénne klonálne ochorenie hematopoetických progenitorových buniek s veľkou variabilitou patogenézy na molekulárnej úrovni. Nová WHO klasifikácia (Bloomfield et al. 2008) rozdeľuje de novo AML na základe cytogenetických a molekulárných genetických nálezov, ktoré slúžia ako významné a možné prediktívne a prognostické markery. V súčasnosti prebiehajú klinické štúdie, ktoré sa zameriavajú na identifikáciu významných genetických markerov pre sledovanie prognózy detí s AML a ich praktické využitie v liečbe. Cieľom našej práce bolo identifikovať prognosticky významné molekulárne markery u detských pacientov s primárnou AML, stratiť pacientov s normálnym karyotypom a monitorovať priebeh ochorenia na základe genetického nálezu. Metodika: V období rokov 2005-2008 sme na našom oddelení vyšetřili vzorky KD a PK z doby stanovenia diagnózy u 22 detí s AML (12 chlapcov a 10 dievčat). Bola zrealizovaná konvečná cytogenetika, FISH vyšetřenie a arrayCGH, molekulovo-genetické vyšetřenie mutácií v génoch FLT3, MLL, NPM1, exóne 14 génu c-Kit a hladiny exprese génov BAALC a WT1. Výsledky: V celkovom súbore 22 detských pacientov s AML, z toho s normálnym karyotypom/bez vyšetřenia karyotypu bolo 9/22 (40,9%). Doplnením arrayCGH sme u dvoch pacientov potvrdili ďalšie genetické aberácie, tj. počet pacientov s normálnym karyotypom sa znížil na 7/22

(31,8%). U 3/22 (13,6%) sme identifikovali mutácie génu FLT3 ITD, u 3/22 (13,6%) FLT3 TDK, u 2/22 (9,09%) NPM1, u 1/22 (4,5%) MLL PTD, u žiadneho mutáciu v exóne 17 génu c-Kit a u 5/22 (22,7%) zvýšenú expresiu génu BAALC, u 12/22 (54,54%) zvýšenú expresiu WT. U pacientov s normálnym karyotypom 5/7 (71,4%) sme identifikovali jeden alebo viac molekulárnych markerov. Koreláciu genetických nálezov s priebehom ochorenia bude sumarizovaný a prezentovaný v našom príspevku.

#### P41 / 1493.

##### **Průkaz JAK2 V617F mutace alelově specifickou PCR a pomocí alelické diskriminace**

Kovářová Petra, Maľušková Alena, Lhoťanová Tamara, Paulišková Monika, Čermáková Zuzana (*Krevní centrum, Fakultní nemocnice, Ostrava*)

Myeloproliferativní poruchy jsou charakterizovány nadbytečnou produkcí krevních buněk. U velké části pacientů s Ph- myeloproliferativními poruchami je nalezena získaná bodová mutace V617F v JH2 pseudokinázové doméně cytoplazmatické Janus tyrozin kinázy 2 (JAK2). Tato mutace, vedoucí k záměně valinu za fenylalanin v pozici 617 aminokyselinového řetězce, způsobuje konstitutivní aktivaci JAK2 a aktivaci signální kaskády JAK/STAT. JAK2V617F mutace je diagnostickým vyšetřením v souladu s požadavky WHO klasifikace z r. 2008 u pacientů s Polycytemia vera (PV) a u pacientů s MPO s trombocytémií patří mezi jeden z nejdůležitějších rizikových faktorů trombózy. Během prvního roku (11/2007 – 11/2008) testování JAK2V617F mutace jsem vyšetřili 57 pacientů. DNA pacientů byla izolována z náběru z periferní krve. Přítomnost/nepřítomnost mutace JAK2V617F jsme detekovali alelově specifickou (AS) PCR a metodou alelické diskriminace pomocí real time PCR, kitem firmy Ipsogen. Paralelně oběma způsoby jsem vyšetřili 49 (86%) pacientů, 8 na JAK2V617F mutaci pozitivních pacientů bylo testováno pouze AS PCR. Soubor tvoří 8 pacientů s PV (z toho bylo na JAK2V617F mutaci pozitivních 75%), 4 pacienti s esenciální trombocytémií (z toho 50% pozitivních), 10 pacientů s chronickým myeloproliferativním onemocněním (z toho 80% pozitivních) zbylých 35 jedinců tvořili pacienti s jinými diagnózami (nejčastěji vadou koagulace) z této skupiny bylo pozitivních 17%. Výsledky testování oběma metodami se shodovali v 86% (47/49). U dvou pacientů byla přítomnost JAK2V617F mutace potvrzena pouze real time PCR. Přestože jsme zatím vyšetřili pouze nevelký soubor pacientů, výsledky naznačují, že metoda detekce JAK2V617F mutace pomocí alelické diskriminace s využitím PCR v reálném čase, je při námi použitým postupu citlivější než AS PCR a proto všechny negativní či nejasné výsledky vyšetření AS PCR ověřujeme i druhou zmíněnou metodou.

#### P42 / 1484.

##### **Průběžná validace klíčových reagentů pro HLA genotypizace v souladu se standardy EFI a ČSN EN ISO 15189**

Nazarová Sara, Filuková Jitka, Vraná Milena, Dobrovolná Marie (*ÚHKT, Praha*)

HLA systém (Human Leukocyte System) je hlavní histokompatibilitní systém člověka. Geneticky se mapuje na krátké raménko 6. chromosomu. Určení přesného genotypu HLA u pacienta a jeho dárce je jednou ze základních podmínek pro úspěšnost allogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk. V současné době provádíme rutinně genotypizaci nejdůležitějších transplantačních lokusů HLA I. a II. třídy: HLA -A, -B, -C, -DRB1, -DQB1. V roce 2008 jsme přijali ke zpracování v laboratoři 1076 primárních vzorků Typizace je prováděna dvěma molekulárně-genetickými metodami: PCR se sekvenčně specifickými primery (PCR-SSP) a přímým sekvenováním (SBT). K typizaci jsou využívány komerční kity od firmy GenoVision a Abbott. Podle mezinárodních standardů European Foundation for Immunogenetics (EFI a norem ČSN EN ISO 15189) je vyžadována validace všech klíčových reagentů používaných metod včetně komerčních kitů. Podle těchto standardů je validována (ověřováno) každá nová šarže i nová dodávka kitů. Za rok 2008 jsme v naší laboratoři validovali 147 nově dodaných PCR-SSP kitů od firmy GenoVision Z toho bylo 16 kitů pro stanovení alelických skupin HLA (LR= Low Resolution Typing Kits) a 131 kitů pro stanovení konkrétních HLA alel v rámci alelických skupin (HR= High Resolution Typing Kits). Při těchto validacích bylo 96 % testů zcela vyhovujících. U všech čtyř kitů DQB1\*03 high resolution byla zaznamenána slabá amplifikace specifických pozitivních reakcí. Tento problém je dlouhodobý a v laboratoři je řešen přidáním většího množství DNA. Další nedostatky jsme zaznamenali u jedné dodávky HR kitu B\*08 šarže 24E. Tato dodávka byla na základě výsledků validace reklamována. Byla provedena validace 63 kitů pro SBT a 1 skupinově specifický kit HARP. Z toho bylo 5 validací HLA-A, 2 validace HLA-A2, 6 validací HLA-B, 2 validace HLA-C, 2 validace HLA-DRB1 a 3 validace HLA-DQB1. V roce 2008 nebyly zaznamenány žádné problémy s kvalitou těchto kitů. Díky průběžné validaci dodávaných kitů jsme snížili potřebu opakování testů z důvodu jejich špatné kvality a jsme schopni pomocí porovnání s výsledky validací lépe rozlišit specifické reakce v případech nejasností při testování vzorků pacientů a dárců HSCT, což je smyslem tohoto postupu a vede k vyšší kvalitě vydávaných výsledků.

**P43 / 1443.****Přetrvávající cytogenetické klony po chemoterapeutické léčbě u pacientů s akutní myeloidní leukémií**Dvořák Pavel, Hrubá Martina, Šubr Ivan (*Ústav lékařské genetiky LF UK a FN, Plzeň*)

Cílem naší práce bylo vyhledat pacienty s diagnózou AML, u kterých byly po absolvování chemoterapeutické léčby nadále prokazovány patologické klony při cytogenetickém vyšetření, a tuto skupinu podrobit bližšímu rozboru. Vycházeli jsme ze souboru 320 pacientů, jimž bylo v letech 2000-2008 na našem pracovišti provedeno cytogenetické vyšetření vzorku kostní dřeně pro diagnózu AML. Z pohledu druhu aplikované chemoterapie i počtu podaných cyklů je náš soubor velmi heterogenní. Soustředili jsme se proto na pacienty, kterým byla v 1. cyklu aplikována indukční chemoterapie "7+3" následovaná ve 2. cyklu chemoterapií "HiDAC", což je v současné době nejpoužívanější léčba první linie u pacientů s AML do 60 let věku. Nalezli jsme 16 pacientů, u nichž po zmíněných dvou cyklech chemoterapeutické léčby byly nadále detekovatelné patologické cytogenetické klony. U 4 pacientů nebyla dosažena ani parciální remise AML dle Chesona, současně nedošlo ani k minimální redukci cytogenetických klonů a onemocnění bylo klasifikováno jako rezistentní AML. Zbývajících 12 pacientů dosáhlo alespoň parciální remise AML. V této skupině se velikost patologických cytogenetických klonů po léčbě pohybovala od klonů na hranici detekčních možností cytogenetických metod (G-pruhování, FISH) až po téměř 100% klony. Zajímavou podskupinu tvoří pacienti s "AML with multilineage dysplasia" dle WHO klasifikace z roku 2001, kteří dosáhli morfologické remise AML, ale při cytogenetickém vyšetření stále přetrvávaly výrazné patologické klony (4 případy). V příspěvku jsou pro 16 uvedených pacientů s přetrvávajícími cytogenetickými klony prezentovány bližší výsledky cytogenetických vyšetření, jejich korelace s vyšetřeními cytologickými, flowcytometrickými a molekulárně genetickými a dostupné výsledky léčby. Naše informace jsou také krátce zasazeny do kontextu publikovaných odborných prací zabývajících se podobnou problematikou.

**P44 / 1556.****Výskyt chromozomálních aberací v endoteliálních buňkách pacientů s mnohočetným myelomem**Němec Pavel, Pour Luděk, Šváchová Hana, Almáši Martina, Burešová Ivana, Muthu Raja Karthick Raja, Roman Hájek (*University Research Centre - Czech Myeloma Group, MU, Brno; Interní hematologická klinika, FN Brno*)

Výskyt specifických chromozomálních aberací v plazmatických buňkách pacientů s mnohočetným myelomem je považován za významný prognostický faktor. Zisk chromozomální oblasti 1q21 (CKS1B gen), ztráty lokusů 13q14

(RB1 gen), 17p13 (TP53 gen) a translokace t(4;14) v plazmatických buňkách bývá spojena s výrazně kratším celkovým přežíváním pacientů s MM. Bylo popsáno, že některé z těchto aberací, zvláště del(13)(q14) se vyskytují nejen u plazmatických buněk (CD138+), ale byly pozorovány i u prekurzorů buněk endoteliálních (CD34+) u pacientů s MM. Existuje hypotéza, že genetické postižení endoteliálních buněk může podporovat angiogenezi a přispívat tak k progresi onemocnění (Rigolin a kol. 2006). Cílem práce je potvrzení přítomnosti genetických změn u CD34+ endoteliálních kmenových buněk v kostní dřeni pacientů s MM pomocí fluorescenční in situ hybridizace. Materiál a metody Vzorky kostní dřeně pacientů s MM, se známým molekulárně cytogenetickým nálezem byly použity k izolaci endoteliálních kmenových buněk pro vyšetření chromozomálních aberací del(13)(q14), del(17p)(13), gain1q21, t(4;14) metodou fluorescenční in situ hybridizace (FISH). Endoteliální kmenové buňky CD34+ byly izolovány z CD138- frakce (získané při standardní imunomagnetické separaci mononukleárních buněk kostní dřeně (MACS)) pomocí flow-cytometru vybaveného sortovacím zařízením (FACS). Pro FISH vyšetření del(13)(q14), del(17p)(13) a t(4;14) byly použity komerční lokus specifické DNA sondy (Abbott Vysis). Jako DNA sonda pro vyšetření gain1q21 byl použit fluorescenčně značený BAC klon RP11-205M9 hybridizující v oblasti 1q21. Výsledky U pacientů s postižením gain1q21 v plazmatických buňkách jsme zjistili výskyt této aberace i u endoteliálních kmenových buněk CD138- CD34+. Toto zjištění může poukazovat na původ této genetické změny u společného prekurzoru plazmatických a endoteliálních buněk a poukazovat také na velmi časný výskyt této změny v genezi onemocnění. Výskyt ostatních chromozomálních aberací je nyní zkoumán. Podrobnější výsledky u většího počtu nemocných budou budou prezentovány. Podpora Podporováno granty LC06027 MU Brno a granty MSM0021622415, MSM00-21622434 MŠMT ČR a grantem IGA NR/9317-3 MZ ČR.

**P45 / 1545.****Výsledky léčby AL amyloidózy pomocí vysokodávkované chemoterapie – zkušenosti pracoviště**Špička Ivan, Vacková Blanka, Ryšavá Romana, Straub Jan, Kořen Jan, Trněný Marek (*Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, 1. interní klinika – klinika hematologie I. LF a VFN, Praha*)

Primární – AL amyloidóza (AL) je nejčastější formou systémové amyloidózy v západních zemích. Z celé skupiny monoklonálních gamapatií má nejhroší prognózu, i když medián přežití stoupá v posledních letech na cca 40 měsíců, proti původním 13-15, kdy byla jedinou možností léčby kombinace melfalanu a kortikoidů. Jednou z možných příčin je zavedení vysokodávkované terapie s podporou kmenových hemopoetických buněk. Ta vede častěji k remisi, včetně kompletní hematologické remise, je však zatížena značnou mortalitou. Proto je úloha ATKD stále nejasná a její přínos nepotvrdila ani nedávná randomizovaná studie. Indikační kritéria pro ATKD u pacientů s amyloidó-

zou byla před několika lety podstatně zpřísněna jak celosvětově, tak na našem pracovišti. Předkládáme výsledky léčby u nemocných s AL léčených tímto postupem na našem pracovišti v letech 1998-2008. Soubor zahrnuje 14 pacientů, 8 mužů a 6 žen, ve věku 32-65 let (průměr 52,1). Z nich u 11 byla prokázána samostatná diagnóza AL, u 3 AL spolu s mnohočetným myelomem. Rozložení izotypů monoklonálního proteinu bylo: 2xIgA lambda, 1xIgG lambda, 2xIgG kappa, 3xLC kappa, 3x LC lambda, 3x byla imunofixace a stanovení FLC (pokud bylo k dispozici) negativní. U všech pacientů jsme kromě vyšetření ev. přítomnosti myelomu provedli tzv.amyloidový staging, zaměřený jak na časté, tak na suspektně postižení lokalizace. U osmi pacientů jsme prokázali postižení jednoho orgánu, u 5 orgánů dvou a v jednom případě jsme k transplantaci přistoupili i přes postižení 5 orgánů (nikoli srdce). Nejčastější bylo postižení ledvin- to se manifestovalo 6 jako samotný nefrotický syndrom a 6x jeho kombinací s renální insuficiencí/selháním. U dvou pacientů jsme transplantaci provedli i přes znalost o amyloidóze myokardu (v jednom případě biopticky prokázáném s jen lehkými změnami dle Echo). Při hodnocení výsledků terapie jsme ve skupině nemocných se samotnou AL prokázali dosažení orgánové kompletní remise (KR) 3x (27,3%), parciální remise (PR) 3x (27,3%) a stabilizace (SD) 4x (36,4%). Při hodnocení celé skupiny (tj. včetně kombinované dg.AL+MM) byla procenta remisí: KR – 21,4%, PR- 28,6%, SD- 42,9%. Jeden nemocný zemřel v důsledku komplikací ATKD – mortalita v našem souboru byla 7,1%. Práce podporována grantem IGA: NR 9225-3.

#### P46 / 1525.

##### **Prognostický význam morfoloického hodnocení nádorových buněk u mnohočetného myelomu**

Al-sahmani Mohammed, Trnavská Irena, Antořová Monika, Antořová Libuše, Jilasová Jarmila, Adam Zdeněk, Pour Luděk, Krejčí Marta, Zahradová Lenka, Buliková Alena, Penka Miroslav, Hájek Roman (*Interní Hematoonkologická klinika FN a LF MU, Brno; OKH FN, Brno; Univerzitní výzkumné centrum - Česká myelomová skupina, ILBIT, LF MU, Brno; (Laboratoř experimentální hematologie a buněčné imunoterapie FN, Brno)*)

Úvod: Mnohočetný myelom (MM) je druhé nejčastější krevní nádorové onemocnění způsobené klonální proliferací elementů konečné vývojové fáze B-lymfocytární linie. Morfoloického hodnocení, respektive stanovení počtu plazmatických buněk (PB) patří mezi základní diagnostická kritéria i v době moderních genomických analýz. Cílem práce bylo stanovení prognostického významu morfoloických podtypů plazmocytů ve vztahu k celkové léčebné odpovědi, dlouhodobému přežití a definování jeho vztahu k jiným konvenčním prognostickým parametrům. Pacienti a metody: Bylo analyzováno 139 diagnostikovaných pacientů s MM, kteří podstoupili autologní transplantaci v rámci klinických studií 4W a CMG 2002. Bylo hodnoceno procentuální zastoupení podtypů PB v kostní dřeni na základě

progresivní analýzy nukleolu, chromatinu a nukleocelulárního poměru (N/C). Kombinace těchto tří prvků vytváří osm podtypů P000-P111 a čtyři subklasifikace. Výsledky: Zralé PB (P000, P001) byly nalezeny u 42,4% pacientů; plazmocyty I (P010, P011, P100) u 38,1% pacientů a plazmocyty II (P101, P110) u 19,4% pacientů. Pacienti podstupující autologní transplantaci mají statisticky významný vztah mezi subtypem P000 a celkovou léčebnou odpovědí ( $p = 0,032$ ). Skupina pacientů s hodnotou P000 < 10% má mnohem nižší medián přežití než skupina pacientů s hodnotou P000  $\geq 37\%$  (46,8 měsíců vs. 77,8 měsíců;  $p = 0,020$ ). Při analýze TTP u skupiny pacientů s hodnotou P110 < 3% je mnohem delší medián progresu než u skupiny pacientů s hodnotou P110  $\geq 31\%$  (medián 54,6 měsíců vs. 22,4 měsíce;  $p=0,045$ ). Při hodnocení PFS je u skupiny pacientů s hodnotou P110 < 3% mnohem vyšší medián přežití než u skupiny pacientů s hodnotou P110  $\geq 31\%$  (34,8 měsíců vs. 21,5 měsíců;  $p=0,039$ ). Korelace s ISS prognostickým indexem ukázala statisticky signifikantní vztah mezi subtypem P100 a všemi stupni ISS ( $p = 0,047$ ). U skupiny pacientů s ISS 1+2 byly mnohem nižší hodnoty parametru P010 než u skupiny pacientů s ISS 3 (medián přežití 11,5 vs. 23,0). Závěr: Numerické hodnocení PB v preparátech kostní dřene patří mezi základní diagnostické kritéria. Další hodnocení morfoloických podtypů plazmocytů dle naší práce přináší další prognostické informace a korelace s jinými prognostickými faktory, ve vztahu k celkové léčebné odpovědi a celkovému přežití u souboru nemocných s MM, kteří podstoupili autologní transplantaci kostního dřene. Podpořeno projektem MŠMT LC06027, MZCR NR9225-3. a IGA NR9225-3

#### P47 / 1523.

##### **Separace plazmatických buněk z kostní dřene pacientů s monoklonálními gamapatiemi metodou fluorescenčního třídění**

Burešová Ivana, Karthick Raja Muthu Raja, Kyjovská Draha, Moravcová Jana, Rycová Marcela, Hanáková Božena, Hájek Roman (*Univerzitní výzkumné centrum - Česká myelomová skupina (URC-CMG), LF MU, Brno; LEHABI, OKH FN, Brno; Interní hematoonkologická klinika, FN a LF MU, Brno)*)

Úvod: Vysoká čistota plazmatických buněk (PB) je základním předpokladem pro uplatnění cytogenetických, molekulárně biologických a proteomických aplikací ve výzkumu mnohočetného myelomu (MM) a monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS). Obohacení vzorků PB je na našem pracovišti prováděno dvoukrokově – po separaci mononukleární frakce (MNF) metodou gradientové centrifugace na Histopaque 1077 jsou vzorky s infiltrací PB nad 5% separovány imunomagneticky (MACS), vzorky s infiltrací PB do 5% jsou tříděny na buněčném sorteru (FACS). Práce představuje výsledky separací PB pomocí metody FACS po prvních 6 měsících jejího rutinního používání. Pacienti a metody: Od září 2008 do konce února 2009 bylo provedeno celkem

114 odběrů kostní dřeně u pacientů s monoklonálními gamapatiemi. U 46% (53/114) odběrů byla po separaci MNF nalezena infiltrace PB pod 5% a následovala separace na buněčném sorteru FACS Aria. K označení PB byla použita monoklonální protilátka proti syndecanu 1 (CD138); separovány byly CD138+ a CD138- frakce. Medián vstupní infiltrace byl 0,7% (0,05-4,3%) PB; medián zpracovaného celkového počtu buněk 23,8 x 10<sup>6</sup> (1 – 116 x 10<sup>6</sup>). Čistota získaných buněčných populací byla kontrolována pouze průtokovou cytometrií. Výsledky: Medián čistoty CD138+ frakcí byl v uvedeném období 96,1% (62 - 99,8%). Čistota ≥ 70% byla dosažena u 94% (50/53) zpracovaných vzorků, čistota ≥ 90% u 87% (46/53) vzorků. Čistota CD138- frakcí byla de facto absolutní – při 30000 analyzovaných buněk v každém vzorku bylo zastoupení CD138+ buněk vždy 0,0 %. Vysoká čistota buněk je provázána ztrátami, které se při nízkých infilracích a nízkém celkovém výtěžku obtížně hodnotí. Na 25 vzorcích CD138- frakce bylo možno zhodnotit výtěžnost třídění („recovery“ = poměr počtu cílových buněk ve vytríděném vzorku a buněk indikovaných sortrem); její medián byl 40,9% (19,4-90,8%). Závěr: Buněčný sorter FACS Aria umožňuje získat velmi čisté populace PB i ze vzorků kostní dřeně se vstupní infilrací pod 5%. Výzkumným týmům se tak otevřela cesta k výzkumu v oblasti MGUS, což bylo doposud nemožné. Dále probíhá optimalizace metod separace s cílem zlepšit poměr mezi požadovanou čistotou, maximální výtěžností a minimálními ztrátami. Práce byla podpořena granty MŠMT LC06027 a MSM0021622434.

#### P48 / 1470.

##### **Imunoterapie s využitím dendritických buněk u mnohočetného myelomu – průběžné výsledky klinické studie fáze II**

Zahradová Lenka, Macková Klára, Očadlíková Darina, Kovářová Lucie, Kyjovská Drahomíra, Vidláková Petra, Moravcová Jana, Kryukov Fedor, Hájek Roman, Michálek Jaroslav (*IHOX FN, Brno; Univerzitní centrum buněčné imunoterapie MU, Brno; Univerzitní výzkumné centrum-Česká myelomová skupina, MU, Brno; I. dětská interní klinika, FN a LF MU Brno*)

Úvod: Nádorové buňky mají imunogenní povahu, proto je protinádorová imunoterapie jednou z možností ovlivnění průběhu onemocnění. V červnu 2006 byla na našem pracovišti zahájena klinická studie fáze II zaměřená na podání protinádorové vakcíny pacientům s mnohočetným myelomem (MM). V květnu 2008 bylo dokončeno vyhodnocení imunitní a klinické odpovědi u 7 pacientů. Vakcína obsahovala dendritické buňky (DB) pacienta naložené autologním monoklonálním imunoglobulinem (MIg) produkovaným myelomovými buňkami. Metody a soubor pacientů: Bylo vakcinováno 7 pacientů s MM se stabilním či mírně aktivním onemocněním bez nutnosti systémové léčby. Každému pacientovi bylo podáno 6 vakcín v měsíčních intervalech. Vakcína připravená podle pod-

mínek správné výrobní praxe obsahovala dendritické buňky kultivované z mononukleárních buněk periferní krve pacienta naložené 6.den kultivace autologním Id-proteinem. Po provedení testů bezpečnosti a jakosti byla vakcína splňující kritéria pro podání aplikována pacientovi. Funkční charakteristika DB byla prokázána imunofenotypizací na průtokovém cytometru, imunologická odpověď byla hodnocena metodou ELISpot a kožním testem hypersenzitivity. Klinická odpověď byla sledována pomocí koncentrace MIg. Po ukončení vakcinace byli pacienti sledováni (imunomonitoring, kožní test a hodnocení klinické odpovědi) dalších 6 měsíců. Výsledky: Bylo připraveno 48 vakcín, z nichž 87,5% (42/48) vyhovovalo výstupním kritériím a bylo podáno nemocným. Funkční charakteristika DB pomocí imunofenotypizace prokázala v den podání 92,9% HLADR/CD86 pozitivních DB (32,10–99,30%), medián (min–max). Po podání vakcín nebyla zaznamenána závažná reakce 2-4 stupně. Lokální reakce (zarudnutí, indurace se vyskytla u všech pacientů a vymizela v mediánu 4(2-7)dnů. Metodou ELISpot byla zaznamenána imunologická odpověď u 71% (5/7) pacientů, kožní test byl pozitivní u 42,9% (3/7) pacientů. Hladina monoklonálního imunoglobulinu kolísala po celých 12 měsících sledování, avšak nepřesáhla 25% pokles pro dosažení minimální odpovědi. V průběhu dosavadní doby sledování – medián 32 měsíců (16-32) nebylo dosud nutné zahájení systémové léčby u 57,1% (4/7) pacientů. Závěr: Vakcína na bázi DB je bezpečnou léčebnou strategií bez závažných vedlejších účinků. Imunologická odpověď byla zaznamenána u 5/7 pacientů, přičemž u 4/7 pacientů dosud nedošlo k významné progresi choroby s nutností zahájení systémové léčby. Podpořeno grantem MSMT LC06027, MZCR NR8945-4, MSMT NPVII 2B06058 a MZCR NR9225-3.

#### P49 / 1489.

##### **Vzácné kožní změny způsobené čí provázející monoklonální gamapatie**

Adam Zdeněk, Krejčí Marta, Pour Luděk, Křivanová Andrea, Křižalkovičová Viera, Zahradová Lenka, Hájek Roman (*Interní hematologická klinika LF MU a FN, Brno*)

Situace, kdy monoklonální imunoglobulin způsobuje patologické kožní změny v organismu, jsou velmi vzácné. Ve výjimečných případech však tyto kožní změny mohou být prvním klinickým příznakem monoklonální gamapatie. Cílem sdělení bude ukázat tři formy kožního postižení souvisejícího s monoklonální gamapatií a přispět tak k jejich časné diagnostice. Schnitzlerův syndrom je definován přítomností monoklonálního IgM, kopřivkových změn, bolestmi kostí či kloubů s osteolyticko-osteosklerotickými změnami a trvalým zvýšením hodnot CRP a dalších zánětlivých markerů. Excelentní léčebné odpovědi s kompletním vymizením morf jsme dosáhli pravidelnou aplikací anakinry. IgM pemfigus podobný subkorneálním pustulárním dermatóze je puchýřnaté kožní onemocnění,

způsobené vazbou monoklonálním imunoglobulinu na strukturu dermis s následujícími změnami vedoucími k tvorbě vesikul a pustul. Pro léčbu tohoto kožního onemocnění není definována optimální léčba. Kombinací bortezomibu, cyklofosfamidu a dexametazonu jsme dosáhli kompletní remise mnohočetného myelomu a úplné vymizení těchto kožních morf. Nekrobiotický xantogranulom je termín pro vznik žlutých kožních morf, způsobených proliferací histiocytárních buněk s tukovými inkluzemi, a přítomnost monoklonálního imunoglobulinu. Patofyziologická souvislost mezi kožními projevy a monoklonálním imunoglobulinem je zde méně jasná u předchozích dvou. Změny provázející nekrobiotický xantogranulom také demonstrujeme na obrázcích, zatím však nemáme vyhodnocenu léčebnou odpověď. Klíčová slova: Schnitzlerův syndrom, IgA pemfigus, subkorneální pustulární dermatóza, nekrobiotický xantogranulom.

#### P50 / 1468.

#### Vysocedávkovaná chemoterapie s podporou autologního štěpu stírá prognostický význam sérových hladin volných lehkých řetězců i kappa/lambda indexu u mnohočetného myelomu

Pika Tomáš, Faber Edgar, Minařík Jiří, Bačovský Jaroslav, Schneiderka Petr, Šlézar Jiří, Langová Kateřina, Indrák Karel, Ščudla Vlastimil (III. interní klinika, LF UP a FN, Olomouc; Hemato-onkologická klinika FN, Olomouc; Oddělení klinické biochemie, FN, Olomouc; Hematologická ambulance, Středomoravská nemocniční a.s., Odštěpný závod Prostějov; Ústav lékařské biofyziky, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého Olomouc)

Úvod: Stanovení sérových hladin volných lehkých řetězců (sVLŘ) a jejich poměru (K/L index) se za několik let stalo součástí základního algoritmu vyšetření v diagnostice a sledování mnohočetného myelomu (MM). Několik studií potvrdilo vliv hladin sVLŘ i K/L indexu na přežití nemocných s MM. Cíl: Cílem studie bylo srovnání vlivu hladin sVLŘ i K/L indexu na přežití nemocných léčených konvenční terapií (KT) nebo vysocedávkovanou terapií s podporou autologního štěpu (ASCT). Metody: Soubor tvořilo 169 nemocných vyšetřených v období 2/2004-8/2008, 47 nemocných bylo léčeno ASCT, 122 pacientů KT. Sekrece kappa byla zastoupena u 105 (62%), lambda u 64 nemocných. Hladiny sVLŘ byly stanovovány systémem Freelite TM, hladiny sVLŘ byly dle terciálů hodnoceny separátně pro skupinu kappa a lambda, hodnoty indexu K/L byly rozděleny dle mezí: <0,02;3,2>, <0;0,02) a (3,6;...); <0,03;32>, <0;0,03) a (32;...). Pro statistické vyhodnocení bylo použito LogRank testu. Výsledky: Ve skupině kappa u nemocných léčených KT byly zjištěny rozdíly v přežití dle terciálů (medián 45 vs. 15 vs. 25 měsíců), u nemocných léčených ASCT nebylo prozatím dosaženo mediánu přežití, nebyl zatím zaznamenán vliv hladin sVLŘ na míru přežití nemocných. Ve skupině lambda u nemocných léčených KT byly zjištěny rozdíly v přežití dle terciálů (medián 48 vs. 32 vs. 10 měsíců), u ne-

mocných léčených ASCT medián přežití byl shodný pro 1 a 2 terciál (medián 46 měsíců), medián 3 terciálu nebyl zatím dosažen. Při zhodnocení přežití nemocných dle hodnot K/L indexu <0,02;3,2>, <0;0,02) a (3,6;...) byly zjištěny rozdíly v přežití nemocných léčených KT (medián 45 vs. 17 měsíců), u nemocných léčených ASCT byl trend zcela opačný (medián 48 měsíců u nemocných s rozmezím <0,02;3,2>, u nemocných s hodnotami K/L indexu <0;0,02) a (3,6;...) medián přežití nebyl zatím dosažen (p=0,042). Při zhodnocení přežití nemocných dle hodnot K/L indexu <0,03;32>, <0;0,03) a (32;...) byly zjištěny rozdíly v přežití nemocných léčených KT (medián 30 vs. 18 měsíců), u nemocných léčených ASCT doposud medián přežití nebyl dosažen, průměr přežití však byl shodný pro obě skupiny (48 vs. 49 měsíců). Závěr: ASCT u MM mění prognostický význam mnoha faktorů, jenž mají vliv na hodnocení prognózy nemocných léčených klasickou terapií. Dle výše uvedené předběžné analýzy se jeví využití hladin sVLŘ a K/L indexu k hodnocení prognózy nemocných léčených ASCT jako nepřínosné. Definitivní zhodnocení bude možné až v delším časovém odstupu. S podporou IGA MZ CR NR/9500-3, MSM 6198959216.

#### P51 / 1463.

#### Vztah sérových hladin vybraných biologických ukazatelů a cytogenetických změn u mnohočetného myelomu

Pika Tomáš, Balcárková Jana, Holzerová Milena, Minařík Jiří, Budíková Marie, Langová Kateřina, Bačovský Jaroslav, Jarošová Marie, Ščudla Vlastimil (III. interní klinika, LF UP a FN, Olomouc; Hemato-onkologická klinika, LF UP a FN Olomouc; Oddělení klinické biochemie, FN Olomouc; Ústav lékařské biofyziky, LF UP Olomouc)

Úvod: Mnohočetný myelom (MM) je zhoubné hematologické plazmocelulární onemocnění vyznačující se produkcí monoklonálního imunoglobulinu detekovatelného v séru a/nebo v moči a přítomností různého stupně orgánového postižení. Prognóza pacientů se stanovuje na základě biochemických parametrů, biologických vlastností onemocnění a nalezených chromosomových změn. Některé méně obvyklé biochemické parametry se jeví nejen jako možné ukazatele neoplastické transformace, ale rovněž jako ukazatele pokročilosti, progresu a léčebné odezvy u nemocných s MM. Cíl: Srovnání sérových hladin 12 vybraných biologických ukazatelů a cytogenetických změn u 128 nemocných s MM vyšetřených v době diagnózy nemoci. Metody: K určení chromosomových změn byla použita klasická cytogenetická analýza a metoda FICTION s lokusově specifickými sondami 1q21/1p36 (Kreatech, MP Biomedicals, CA, USA), IgH, RB1, t(4;14), t(11;14) a centromerickými sondami pro chromosomy 7, 9, 11, 15 a 17 (Abbott-Vysis, Downers Grove, IL, USA). Složitější chromosomové přestavby byly analyzovány pomocí metod M-FISH a CGH (MetaSystems, Altusheim, Německo) Hladiny vybraných biologických pa-

rametrů v séru byly stanoveny následujícími metodami: radioenzymatickou esejí (thymidinkináza), ELISA ( $\beta$ 2-mikroglobulin), radioimunoanalýzou (ICTP, PINP), enzymoimunoesejí (sIL-6R, sVCAM, sICAM-1, sOPG) a kvantitativní enzymatické imunoesejí (sHGF, sVEGF, syndecan-1/CD138 a sFas). Statistická analýza byla provedena pomocí Mann-Whitney testu. Výsledky: U pacientů s komplexním karyotypem byly prokázány významně vyšší hladiny  $\beta$ 2-mikroglobulinu ( $p=0,010$ ). Zmnožení oblasti 1q21 signifikantně korelovalo s vyššími hladinami sIL-6R ( $p=0,038$ ), naopak signifikantně nižší hladiny sIL-6R ( $p=0,009$ ) byly zjištěny u pacientů s t(11;14). Nižší hladiny OPG byly asociovány s delecí RB1 genu ( $p=0,013$ ), stejně tak nižší hladiny PINP s t(4;14) ( $p=0,031$ ). Nebyla prokázána korelace mezi vybranými biochemickými parametry a polyploidií. Závěr: Výše uvedená analýza ukázala, že cytogenetické změny mají vliv na jednotlivé složky cytokinové sítě u MM, zejména pak na jeden z klíčových faktorů (sIL-6R), který je významně zapojen do patogeneze MM. Významné prognostické ukazatele jako sHGF a syndecan-1/CD138 nebyly v našem souboru nemocných nalezenými cytogenetickými změnami ovlivněny. Práce je podporována granty IGA MZ CR NR/9500-3, MSM 6198959205, MSM 6198959216.

#### P52 / 1454.

##### Nízká hladina trombospondinu koreluje s nedostatečnou odpovědí na léčbu bortezomibem

Almáši Martina, Pour Luděk, Šváchová Hana, Králová Dana, Němec Pavel, Adam Zdeněk, Krejčí Marta, Sandecká Viera, Křivanová Andrea, Al Sahmani Mohamed, Penka Miroslav, Kuglík Petr, Hájek Roman (URC-CMG LF MU, Brno; IHOK FN a LF, Brno; OKH FN, Brno; Odd. genetiky a molekulární biologie, Ústav experimentální biologie, PŘF MU, Brno; LEHABI OKH FN, Brno)

Úvod Angiogeneze hraje významnou roli v patogenezi mnohočetného myelomu (MM). Úloha aktivátorů angiogeneze je velmi dobře objasněna. Role inhibitorů angiogeneze zůstává doposud nejasná. Za nejdůležitější inhibitor angiogeneze je považován trombospondin. Naše předchozí výsledky již potvrdily spojitost mezi nízkou hladinou trombospondinu a špatnou potransplantační odpovědí u MM. Cílem této studie bylo určit význam trombospondinu v plazmě kostní dřevě (PKD) u pacientů s MM podstupujících léčbu bortezomibem. Metody Sledovali jsme hladinu trombospondinu u 55 pacientů s MM léčených bortezomibem (30 M/ 25 Ž; medián věku 65,1 let; medián sledování 18,8 měsíců). Hladina trombospondinu v PKD byla měřena u 25 % (14/55) pacientů s MM v době stanovení diagnózy, u 35 % (19/55) pacientů s MM v době prvního relapsu a u 40 % (22/55) pacientů s MM v období druhého a následujících relapsů pomocí metody ELISA. Vybraní pacienti byli rozděleni do 3 skupin podle léčebné odpovědi: skupina (A) 42 % (21/50) pacientů, kteří dosáhli alespoň velmi dobré parciální remise (VGPR), zahrnující 24 % (12/50) pacientů, kteří dosáhli

kompletní remise (CR); skupina (B) 26 % (13/50) pacientů, kteří dosáhli parciální remise (PR); skupina (C) 34 % (17/50) pacientů, kteří nedosáhli ani parciální remise (PR). Spojitost mezi hladinami trombospondinu a léčebnou odpovědí byla statisticky zhodnocena pomocí t-testu a Anova. Výsledky Statisticky významné rozdíly byly nalezeny mezi skupinou (A) ( $n = 21$ ; medián = 582,0 pg/ml; 232-816) skupinou (B) ( $n = 13$ ; medián = 400 pg/ml; 103-672) a skupinou (C) ( $n = 17$ ; medián = 285,0 pg/ml; 96 – 572)  $P < 0,001$ , při srovnání pomocí Anova. Koncentrace trombospondinu je významně vyšší u skupiny (A) oproti ostatním ( $n = 30$ ; medián = 337 pg/ml; 103 – 672)  $P < 0,001$ . Hladina trombospondinu je významně vyšší i u pacientů s kompletní remisí ( $n = 12$ ; medián = 573,0 pg/ml; 406 – 816) ve srovnání ostatními ( $n = 39$ ; medián = 400 pg/ml; 103 – 612)  $P = 0,002$ . Závěr Výsledky ukazují, že nízká hladina trombospondinu před léčbou u pacientů s MM léčených bortezomibem je spojena s nepříznivou odpovědí. To znamená, že u pacientů s kompletní remisí a velmi dobrou parciální remisí dochází k větší inhibici angiogeneze oproti ostatním pacientům. Léčebná odpověď je výrazný prognostický faktor a je úzce spjata s hladinou trombospondinu v plazmě kostní dřevě v čase diagnózy. Podporováno: MSMT0021622434, LC06027

#### P53 / 1453.

##### Odpověď na léčbu bortezomibem koreluje s hladinou HGF v periferní plazmě na počátku léčby u pacientů s mnohočetným myelomem

Šváchová Hana, Pour Luděk, Králová Dana, Němec Pavel, Adam Zdeněk, Krejčí Marta, Sandecká Viera, Křivanová Andrea, Al Sahmani Mohamed, Penka Miroslav, Kublík Petr, Hájek Roman (URC-CMG LF MU, Brno; IHOK FN a LF MU, Brno; OKH FN, Brno; Odd. genetiky a molekulární biologie, Ústav experimentální biologie, PŘF MU, Brno, LEHABI OKH FN, Brno)

Úvod Angiogeneze je zahrnuta ve vývoji a progresi mnohočetného myelomu (MM). Za klíčové faktory v indukci neovaskularizace MM jsou považovány angiogenní aktivátory, mezi které se řadí i hepatocytární růstový faktor (HGF). Předchozí studie potvrdily zvýšenou hladinu HGF v séru pacientů s MM jako negativní prognostický znak. Bortezomib je velmi účinný v léčbě MM pacientů a vedle silné protinádorové aktivity má i přímý nebo nepřímý antiangiogenního účinek. Cílem této studie bylo určit hladinu HGF v periferní plazmě (PP) pacientů s MM na počátku léčby bortezomibem a její vliv na léčebnou odpověď. Metody Hladiny HGF byly měřeny ve vzorcích PP od celkem 58 MM pacientů léčených bortezomibem (32M/26Ž, věk-medián: 65,1 let). Měření HGF v PP bylo prováděno metodou ELISA u pacientů s MM v prvním relapsu 34%(20/58), ve druhém a dalším relapsu 41%(24/58) a v čase diagnózy 25%(14/58). Po 18,8 měsíční době sledování (rozsah 0,5-44,6) byli pacienti rozděleni dle léčebné odpo-

vědi na skupiny: A) 38%(20/52) pacientů, kteří dosáhli alespoň velmi dobré parciální remise (VGPR) včetně kompletní remise (CR u 21%(11/52) pacientů); B) 25%(13/52) pacientů, kteří dosáhli parciální remise (PR) a skupina C) 37%(19/52) pacientů, kteří nedosáhli ani parciální remise (PR). Korelace mezi hladinou HGF a léčebnou odpovědí byla hodnocena pomocí Mann-Whitney testu a Kruskal-Wallis Anova. Výsledky Statisticky významné rozdíly byla nalezeny mezi skupinou A (n=20; medián=1155 pg/ml; rozsah 6-6000), skupinou B (n=13; medián=2670 pg/ml; rozsah 355-6000) a skupinou C (n=19; medián=2980 pg/ml; rozsah 763-6000)  $p=0,042$  (Anova). Také hladina HGF v PP u pacientů s CR (n=11; medián=1260 pg/ml; rozsah 6-1860) je významně nižší než u ostatních (n=41; medián=2430 pg/ml; rozsah 30,2-6000)  $p=0,014$ . Významné rozdíly v hladinách HGF na počátku léčby a v relapsu nebyly prokázány. Závěr Naše výsledky nasvědčují, že vysoké hladiny HGF v PP pacientů s MM před léčbou bortezomibem jsou spojeny s nepříznivou odpovědí. Předchozí studie označily HGF jako vhodného kandidáta pro monitorování angiogeneze, jelikož je možné jeho hladiny sledovat v PP. Léčebná odpověď je významný prognostický faktor a naše měření potvrdila, že hladiny HGF v PP na počátku léčby těsně korelovaly s léčebnou odpovědí. Z výsledků vyplývá, že HGF v PP se může stát jedním z pomocných prediktivních markerů při léčbě bortezomibem a možná i obecně prognostickým faktorem. Práce vznikla za podpory grantů: VC MŠMT ČR LC06027 a MSM 0021622434.

#### P54 / 1441.

##### **Delece 14q zahrnující IGH gen u pacientů s mnohočetným myelomem**

Balcárková Jana, Urbánková Helena, Pika Tomáš, Holzerová Milena, Ščudla Vlastimil, Bačovský Jaroslav, Indrák Karel, Jarošová Marie (*Hemato-onkologická klinika FN a LF UP, Olomouc; III. Interní klinika FN a LF UP, Olomouc*)

Translokace zahrnující IGH gen (14q32) jsou řazeny mezi jedny z nejčastějších chromosomálních změn u pacientů s mnohočetným myelomem (MM). V současnosti se ukazuje, že IGH gen u B-buněčných malignit nemusí být zahrnut jen v translokacích ale i v delecích postihujících chromosom 14. Delece v IGH genu zjištěné metodou FISH mohou být rozděleny do 3 skupin: delece zahrnující celý IGH gen, delece zahrnující IGVH oblast (telomerické) a delece oblastí přilehlých k 3' konci IGH genu (centromerické). Delece telomerických částí IGH genu jsou považovány za fyziologické a vznikají v důsledku VDJ rekombinace v průběhu vývoje B-lymfocyty. Předpokládá se, že delece sekvencí v blízkosti 3' konce IGH genu mohou vznikat jako ztráta celého derivovaného chromosomu 14, která nastane velmi brzy po vzniku translokace zahrnující IGH gen zejména t(4;14) nebo jako důsledek

intersticiální delece 14q. Cílem naší práce bylo zjistit frekvenci a typ delece IGH genu pomocí molekulárně cytogenetických metod v souboru 200 pacientů s MM. Metodou FICTION s lokusově specifickou sondou LSI IGH (Abbott-Vysis, Downers Grove, IL, USA) jsme zjistili deleci IGH genu u 42 (21 %) z 200 pacientů. Delece byly rozděleny do 3 skupin: 1. delece celého IGH genu (15 pacientů) 2. delece IGVH oblasti (14 pacientů) 3. delece sekvencí přilehlých k 3' části IGH genu (13 pacientů) Delece IGH genu byla jako jediná změna nalezena u 13 pacientů. U 29 pacientů byly delece v IGH genu nalezeny společně s delecí RB1 genu. Monosomie chromosomu 13 byla prokázána u všech pacientů s delecí celého IGH genu a delecí RB1 genu (12 pacientů). U 11 pacientů s delecí celé jedné kopie IGH genu byla prokázána pomocí specifických sond 14qTEL (Abbott-Vysis) a TCR A/D (14q11) (Dako, Stockholm, Sweden) monosomie chromosomu 14. Terminální delece 14q, která nezahrnovala TCR A/D lokus byla nalezena u 4 pacientů. Translokace byla prokázána u 7 ze 13 pacientů s delecí sekvencí přilehlých k 3' části IGH genu- t(4;14) u 5 pacientů a t(11;14) u 2 pacientů. U 2 ze 13 pacientů byla prokázána delece 14q zahrnující sekvence přilehlé k 3' části IGH genu pomocí metod CGH/arrayCGH. Naše výsledky potvrzují, že delece nalezené v IGH genu mohou být důsledkem monosomie chromosomu 14, translokace zahrnující IGH gen nebo delece 14q a velmi často se vyskytují společně s monosomií chromosomu 13. Práce je podporována grantem MSM 6198959205

#### P55 / 1431.

##### **Rizikové faktory časně první progresse nebo relapsu u pacientů s mnohočetným myelomem po autologní transplantaci periferních krvetvorných buněk**

Jungová Alexandra, Vokurka Samuel, Schützová Miroslava, Koza Vladimír (*Hematologicko onkologické oddělení FN, Plzeň*)

Vysokodávkovaná chemoterapie s melfalanem zajištěná autologní transplantací periferních krvetvorných buněk (APSCT) je standardní léčbou první linie pro únosné pacienty s mnohočetným myelomem (MM). Transplantací lze prodloužit dobu do první progresse/relapsu, ale u některých pacientů tato doba remise trvá poměrně krátce. Cíl: ověřit možné faktory ovlivňující délku doby do prvního relapsu/progrese (TTP) u pacientů s MM. Metodika: Retrospektivní analýza, pacienti s relapsem/progresí po ukončené první linii léčby 4x VAD a melfalan 200mg/m<sup>2</sup> s APSCT a s možnou následnou udržovací léčbou (interferon, chemoterapie CED). TTP = doba od APSCT do relapsu/progrese. Riziková cytogenetika = komplexní aberace, del 13, -13, t(4;14). Soubor: 68 pacientů splňujících kriteria metodiky a s dobou primoléčby v 1/97-6/2007. Výsledky: medián TTP celého souboru 13 (1-64) měsíců. Dále byla porovnána skupina „A“ (TTP ≤12m) vs. „B“ (TTP

> 12m): n= 32 vs. 36 pacientů, medián TTP 6 ( 1-12) vs. 27 ( 13-64), věk 58 ( 42-70) vs. 60 ( 38-69), ženy 40% vs. 27%, st.III. dle S-D 81% vs. 75%, st.III. dle ISS 48% vs. 44%, risk cytogenetika 29% vs. 7%, risk cytogenetika včetně del13q FISH 42% vs. 25%, stav rezistence nebo progresie před APSCT 25% vs. 6 %, dávka melfalan 4,6(2,3-6,7) vs. 4,8(3,1-6,2), žádná udržovací léčba 60% vs. 72%. Závěr: Skupina pacientů s krátkým TTP (do 12měsíců od APSCT) měla zřetelně vyšší zastoupení prognosticky nepříznivých genetických změn, zřetelně četnější stav rezistence nebo časně progresie před APSCT a tendenci k pokročilejší nemoci podle stádia dle S-D a ISS. Pro přesnější posouzení pozorovaných rozdílů bude nutné doplnit analýzu statistické signifikance.

#### P56 / 1430.

##### **Progresia mnohobuněčného myelómu s raritným postihnutím CNS - kazuistika**

Pizurová Renáta, Hudeček Ján, Hollý Pavol, Chudej Juraj, Fedorová Jana, Kočíšová Mária (*KHaT MFN, Martin; KHaT MFN a JLF UK, Martin; Onkorádioterapeutické odd. MFN s JLF UK, Martin*)

Mnohobuněčný myelóm je nádorové ochorenie, vyznačujúce sa klonálnou nekontrolovanou proliferáciou a akumuláciou neoplasticky transformovaných elementov B-bunkovej línie charakteru plazmocytov, produkujúcich monoklonálny imunoglobulín, ktorý je dokázateľný v sére alebo v moči. Plazmocelulárna proliferácia a jej produkty vedú väčšinou k osteolytickému postihnutiu skeletu, k hyperkalcémii, anémii, niekedy až pancytopénii, k postihnutiu obličiek event. i ďalších orgánov. Postihnutie CNS u mnohobuněčného myelómu je veľmi nezvyčajné. Presná incidencia nie je známa, v odbornej literatúre je popísaných celkovo len niekoľko desiatok prípadov – väčšinou len malé súbory pacientov event. kazuistiky. Odhaduje sa, že takýchto prípadov nie je viac ako 1% všetkých pacientov s myelómom. V dostupnej odbornej literatúre bola popisovaná od autorov Schluterman a spol. retrospektívna analýza pacientov liečených pre myelóm v University Arkansas Medical Centre, kde z cca 2000 pacientov zistili 23 prípadov postihnutia CNS. Predpokladá sa možnosť lokálnej invázie nádoru alebo hematogénny rozsev, dochádza tu buď k infiltrácii meningov event. intracerebrálnym mts. Postihnutie CNS sa môže objaviť u ktoréhokoľvek pacienta s myelómom, ale častejšie sa objavuje u rozvinutého ochorenia alebo u relapsu ochorenia, len výnimočne bola infiltrácia CNS opísaná ako prvý príznak choroby. Prognóza pacientov je veľmi nepriaznivá, typická je rýchlá progresia ochorenia a rezistencia na liečbu, priemerná doba prežívania / podľa viacerých autorov / je 1,5 mesiaca od stanovenia diagnózy, najviac 4-5 mesiacov. Liečba je kontroverzná, väčšinou individuálne postupy / vzhľadom k malému počtu pacientov /, využíva sa systémová chemoterapia, i.th. terapia,

rádioterapia, autológna transplantácia kmeňových buniek, neurochirurgia, resp. kombinácia jednotlivých postupov. Opisovaný je prípad 49-ročnej pacientky s diagnostikovaným mnohobuněčným myelómom, u ktorej sa ochorenie po I. cykle chť schémy CAD junior / 5 kúr / sprogredovalo, bol zahájený ďalší cyklus chemoterapie v kombinácii bortezomid + cyclophosphamid + kortikoid, kde po 1. kúre došlo k úprave v laboratórnych parametroch, ale bola dokázaná raritná progresia ochorenia v oblasti CNS. Liečba bola kombinovaná – celková chemoterapia, i.th. terapia, rádioterapia.

#### P57 / 1425.

##### **Optimalizace imunomagnetické separace plazmatických buněk z kostní dřené pacientů nemocných mnohočetným myelomem**

Čumová Jana, Kyjovská Drahomíra, Suská Renata, Moravcová Jana, Rycová Marcela, Perutka Tomáš, Hanáková Božena, Králová Dana, Burešová Ivana, Kovářová Lucie, Kryukov Fedor, Penka Miroslav, Hájek Roman (*URC-CMG, LF MU, Brno; LEHABI, OKH FN, Brno; IHOK FN, Brno*)

Úvod: Vysoká čistota plazmatických buněk (PB) je základním předpokladem pro uplatnění cytogenetických, molekulárně biologických a proteomických aplikací ve výzkumu mnohočetného myelomu (MM) a monoklonálních gamapatií nejasného významu (MGUS). Obohacení vzorků PC je na našem pracovišti prováděno pomocí metod fluorescenčního třídění (FACS) a imunomagnetické separace (MACS). Práce představuje výsledky separací PB pomocí metody MACS s využitím přednastavených programů (possels a posseld2) separátoru autoMACS a nastavení optimální separační strategie pro získání populace PB s čistotou >90%. Pacienti a metody: V letech 2007 - 2008 bylo provedeno celkem 276 separací vzorků KD získaných od 250 pacientů nemocných MM (145 mužů a 105 žen) mediánu věku 66 let (28 - 87). U 23 pacientů byl v průběhu onemocnění v různém datu proveden odběr kostní dřene 2x (n = 20) a 3x (n = 3). Plazmatické buňky byly separovány z frakce mononukleárních buněk kostní dřene (MNKD) pomocí značení buněk monoklonální protilátkou konjugovanou s paramagnetickou partikulí (CD138 MACS MicroBeads). Čistota separovaných frakcí byla stanovena morfologicky a flowcytometricky. Získané CD138+ frakce byly následně využity k výzkumným účelům týmu URC-CMG nebo byly zamrazeny v kryokonzervantu a poté uloženy do myelomové banky vzorků. Výsledky: Zhodnocení účinnosti MACS separace s využitím programů possels a posseld2 shrnuje tabulka. Statistické zhodnocení pomocí ROC křivek z dostupných flowcytometrických dat (n = 133) stanovilo pro program possels nejlepší hodnotu vstupní infiltrace PB v MNKD frakci >12% (p<0,001) pro získání populace PB s čistotou >90%. U programu posseld2 (n = 103) byla stanovena hodnota vstupní infiltrace >5,1% (p<0,001). Zhodnocení z dostupných morfologických dat (n = 138) pro program possels stanovilo nejlepší

hodnotu vstupní infiltrace PB v MNKD frakci  $>7,2\%$  ( $p<0,001$ ), pro program posseld2 ( $n = 32$ ) hodnotu  $>4,6\%$  ( $p<0,001$ ). Závěr: Čistota separované frakce, stejně tak jako výtěžek závisí na kvalitě vzorku a zvolených parametrech separace, které se odvíjí od požadavků na separované buňky. Proto volíme různý separační program separátoru autoMACS pro vzorky různých vstupních infiltrací PB ve frakci MNKD. Program posseld2 využíváme pro separace vzorků MNKD, u nichž je stanovená vstupní infiltrace PB 5-10%, program possels pro vzorky se vstupní infiltrací  $>10\%$ . Pro vzorky s infiltrací  $<5\%$  používáme buněčný sorter FACSaria. Práce byla podpořena granty MŠMT LC06027 a MSM0021622434.

	Possels	Posseld <sub>2</sub>
Flowcytometrické hodnocení CD138 znaku	medián (rozmezí)	
Čistota PB v MNKD frakci - vstupní infiltrace (%)	17,0 (0,2-81,5)	4,3 (0,2-54,0)
Čistota CD138+ frakce (%)	82,8 (0,5-99,5)	83,1 (14,3-99,7)
Čistota CD138- frakce (%)	6,4 (0,0-70,2)	2,6 (0,0-19,2)
Počet získaných PB po separaci ( $\times 10^6$ )	2,4 (0,0-51,2)	0,1 (0,0-10,1)
Celková ztráta PB ( $\times 10^6$ )	2,6 (0,0-105,2)	0,9 (0,0-11,8)
Ztráta PB v CD138- frakci ( $\times 10^6$ )	0,7 (0,0-59,7)	0,3 (0,0-7,9)
Ztráta PB v separační koloně ( $\times 10^6$ )	1,6 (0,1-99,6)	0,3 (0,0-11,3)
Faktor obolaceni	4,1 (0,4-76,0)	17,9 (1,7-277,5)
Návratnost PB (TCR %)	34,5 (0,0-210,3)	13,7 (0,0-385,4)

#### P58 / 1424.

##### Detekcia chromozómových abnormalít pri mnohopočetnom myelóme metódou I-FISH s využitím imunomagnetickej separácie plazmatických buniek

Ružbacký Rastislav, Messingerová L., Rotíková L., Žáková A., Kasabová L., Szabová Ž., Ballová V., Illenčíková D. (Národný onkologický ústav, Oddelenie onkologickej genetiky, Bratislava)

Úvod: Mnohopočetný myelóm (MM) je charakterizovaný akumuláciou monoklonálnych plazmatických buniek v kostnej dreni (KD). Výsledkom je prítomnosť malígnych plazmatických buniek (PB) deliacich sa nekontrolovane a interagujúcich s mikroprostredím KD. MM je zodpovedný za približne 20% úmrtí pri hematologických malignitách. Cieľom našej práce bolo porovnanie početnosti chromozómových aberácií z kultivovaných konvenčných vzoriek KD a z populácie buniek získaných metódou MACS. Metódy: 24-(RPMI-1640) a 96-(BoneMarrowGrow) hodinová kultivácia kostnej drene, cytogenetické spracovanie a následná I-FISH s použitím následovných sond: LSI D13S319 pre 13q14 (orange)/13q34 (green), LSI IGH 14q32 dual color break apart, SRD 1p36 (red)/ON 1q21(green), LSI p53(17p13.1) spectrum orange/cep 17 spectrum aqua. Separácia plazmatických buniek z čerstvých vzoriek KD (1-2ml) pomocou mini-MACS separátora a následná fixácia vyseparovanej bunkovej suspenzie pre I-FISH. Výsledky: V rokoch 2007 až 2009 sme vykonali 16 úspešných imunomagnetickej separácií myelómových PB od pacientov s potvrdenou diagnózou MM. 54 separácií bolo neúspešných z dôvodu nepotvrdennej diagnózy MM alebo nízkej infiltrace KD plazmatickými bunkami. Následná I-FISH na týchto separovaných malígnych PB nám potvrdila podstatne vyšší a presnejší percentuálny záchyt chromozómových aberácií oproti výsledkom získaných I-FISH po klasickej kultivácii KD. Záver: V našom príspevku sú uvedené prvé

skúsenosti s metódou imunomagnetickej separácie (MACS) myelómových buniek CD 138+ na OOG NOÚ. Potvrdili sme, že MACS separácia PB umožňuje podstatne senzitivnejšie sledovanie výskytu chromozómových aberácií pomocou I-FISH na separovaných PB v porovnaní s konvenčnými vzorkami KD.

#### P59 / 1573.

##### Molekulárna heterogenita akútnej myeloidnej leukémie s normálnym karyotypom – prehľad výsledkov jedného centra

Katrincskáková Beáta, Sztokowski Tomáš, Divoká Martina, Holzerová Milena, Hubáček Jaromír, Mužík Jan, Dušek Ladislav, Indrák Karel, Jarošová Marie (Hemato-onkologická klinika FN a LF UP Olomouc; Institut biostatistiky a analýz MU, Brno)

Normálny karyotyp (NK), najčastejší cytogenetický nález (40-50 %) u akútnej myeloidnej leukémie (AML) v dobe diagnózy, zahŕňa AML s heterogénnou molekulárnou bázou, ktorá ďalej stratifikuje prognózu tejto skupiny AML. Naš príspevok sumarizuje aktuálne výsledky molekulárneho monitorovania pacientov s de novo AML bez cytogenetických zmien (NK-AML) v dobe diagnózy na HOK FNOL, kde sa dlhodobo zaoberáme cytogenetickou/molekulárnou diagnostikou AML. Individuálny molekulárny profil pacientov s NK-AML a jeho prognostický význam hodnotíme na základe zmien v NPM1, FLT3, BAALC a MLL génoch, aktuálne začíname monitorovať zmeny v CEBPA a WT1 génoch. Naším cieľom je sledovať molekulárne markery, ktoré by v rámci NK-AML pomohli odlíšiť pacientov s priaznivou prognózou od pacientov s menej priaznivou prognózou. Naš súbor zahŕňa 71 pacientov (36 žien; 35 mužov; medián veku 56 rokov (22-77 rokov) diagnostikovaných v rokoch 1998 až 2009 s dostupným genetickým materiálom z doby stanovenia diagnózy. V tomto súbore predstavuje súbor kuratívne liečených, 57 pacientov (31 žien; 26 mužov; medián veku 55 rokov (22 až 72), medián doby sledovania 150 týždňov (11 – 548); medián celkového prežívania 52 týždňov (6 až 358)). Molekulárnu analýzu vykonávame na úrovni cDNA, resp. DNA metódami fragmentačnej analýzy a sekvenovania (NPM1mut, FLT3-ITD), kvantitatívnej RT-PCR (BAALC), restriktívnej analýzy PCR produktov (FLT3/D835) a konvenčnej PCR (MLL/PTD). V celkovom súbore 71 pacientov sme zachytili mutácie génu NPM1 (NPM1mut) u 55% (39/71); FLT3-ITD u 39% (28/71); FLT3/D835 u 14% (10/71); zvýšenú expresiu génu BAALC u 28% (20/71) a parciálnu tandemovú duplikáciu génu MLL (MLL/PTD) u 2 zo 71 prípadov. V súbore 57 kuratívne liečených pacientov boli sledované génové zmeny distribuované nasledovne: 54% (31/57) NPM1mut; 35% (20/57) FLT3-ITD; 12% (7/57) FLT3/D835; 32% (18/57) zvýšená expresia BAALC; 1,8% (1/57) MLL/PTD. S prihliadnutím na FLT3-ITD a NPM1mut sa v rámci NK-AML vyčlenili 4 prognos-

tický významné podskupiny: FLT3-ITD+/NPM1wt (4/57); FLT3-ITD+/NPM1mut (16/57); FLT3-ITD-/NPM1wt (15/57) a FLT3-ITD-/NPM1mut (22/57). V rámci FLT3/ITD+ souboru poukazují naše výsledky na inter-individuální heterogenitu na úrovni zastúpenia, dĺžky a počtu mutovanej FLT3-ITD alely. V našom príspevku zhodnotíme jednotlivé molekulárne podskupiny na úrovni ich incidencie a klinického významu u NK-AML. Grantová podpora: MSM 6198959205 a IGA MZ ČR NR/9481-3

#### P60 / 1544.

##### **Korelácia nadexpresie WT1 génu s chromozómovými aberáciami pri akútnych leukémiách**

Hanušová Eva, Lukačková Renáta, Marková Klaudia, Tomášová Radka, Hojsíková Ivana, Křižan Peter (*Medirex, a.s., Genetika, Bratislava*)

Úvod : Okolo 50% pacientov s akútnou myeloickou leukémiou je charakterizovaných špecifickými chromozómovými aberáciami. Často ide o komplex zmien v karyotype pacienta (numerické a štrukturálne aberácie). Druhá skupina AML pacientov s normálnym karyotypom vykazuje na molekulovej úrovni rôzne anomálie (nadexpresie regulačných génov a rôzne mutácie). Asi u 90 % pacientov s AML bez ohľadu na subtyp leukémie sa pozoruje nadexpresia WT1 génu. Tento gén kóduje jadrový DNA viažuci proteín a hrá úlohu génového aktivátora aj represora, čím priamo ovplyvňuje proliferáciu, diferenciáciu a apoptózu buniek. Metodika: Vzorky: PK a KD pacientov s AML (n=200). Karyotyp : konvenčná cytogenetika (G-prúžkovanie). FISH: sondy na špecifické aberácie (PML-RARA, AML1/ETO, CBFβ, MLL, ETV6,5q31/D5S23,7q31/CEP7). Expresia WT1 génu bola meraná metódou RTQ PCR. Výsledky: Vzorky pacientov boli vyšetrené kvalitatívnou cytogenetikou a molekulárne-genetickou analýzou (FISH) a kvantitatívne metódou RTQ-PCR. Hladina expresie WT1 génu v leukocytoch kostnej drene zdravých jedincov sa pohybuje rádovo okolo 10-2 NCN (Normalizovaný počet kópii) a v periférnej krvi je o rád nižšie, čiže 10-3 NCN alebo je nedetekovateľná. Expresiu WT1 génu sme považovali za nadexpresiu, ak jej hodnota bola 0,5-4 rády vyššia oproti fyziologickým hodnotám. Sústredili sme sa prevažne na koreláciu s markerom: PML-RARA– t(15;17), ETV6 na 12. a MLL na 11. chromozóme. Hladina nadexpresie WT1 génu presne kopírovala kvantitu jadriera s t (15;17). Skupina pacientov s aberáciou MLL alebo ETV6 génu ( translokácie, delécie a amplifikácie ) vykazovali až o 3-4 rády zvýšenú hladinu expresie WT1 oproti fyziologickým hodnotám. S postupom úspešnej liečby, jeho hladina rádovo klesala až do negativity a korelovala s cytogenetickou remisiou a klinickým obrazom pacienta. Opätovný nárast expresie WT1 génu bol signálom relapsu. Záver: Vo väčšine nami sledovaných prípadov akútnych leukémií bola zistená korelácia medzi nadexpresiou WT1 génu, cy-

togenetickým nálezom a celkovým klinickým obrazom pacienta. Cytogenetická analýza a FISH sú dôležitou súčasťou diagnostiky a predikcie ochorenia. Meranie expresie WT1 génu môže pomôcť lekárovi pri monitoringu minimálnej reziduálnej choroby a vhodnej liečebnej stratégii.

#### P61 / 1506.

##### **Význam metódy MethyLight ke sledování aberantní metylace genů u pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML)**

Hájková Hana, Benson Veronika, Schwarz Jiří, Maaloufová Jacqueline, Haškovec Cedrik (*Ústav hematologie a krevní transfúze, Praha; Mikrobiologický ústav AVČR, Praha*)

Je prokázáno, že metylace genů hraje významnou roli v patogenezi nádorů, včetně leukémií. MethyLight představuje vysoce senzitivní a specifický přístup k detekci a kvantifikaci metylace DNA metódou real-time PCR. Je založený na kombinaci metylačně špecifických primerů a sondy (TaqMan). Vysoká senzitivita a špecifita činí metódu vhodnou i pro detekci nízkých frekvenci metylace DNA jako biomarkerů onemocnění. Cílem této studie bylo analyzovat metylační status v promotorové oblasti genů CDKN2B, ESR1, ECAD, DAPK1, CALCA, ICAM1, MYOD1, SOCS1, TIMP-3 a TERT u pacientů s AML při diagnóze a vybrat nevhodnější geny pro další sledování progresu onemocnění. Analyzovali jsme 30 vzorků DNA izolované z periférní krve od pacientů AML při diagnóze, 5 vzorků DNA z remise onemocnění a 3 vzorky DNA z relapsu onemocnění. Metóda spočívá v bisulfidové konverzi genomické DNA, která umožní na základě metylačně podmínených sekvenčních změn navržení metylačně špecifických primerů a sondy. Jako referenční DNA slouží 100% metylovaná DNA dodávaná spolu s nemetylovanou DNA jako EpiTect PCR Control DNA Set (Qiagen). Jako kontrolní gen, který normalizoval vstupní množství a kvalitu bisulfidové DNA, byl použit β-actin (ACTB). Stupeň metylace je vyjadřován vzhledem k 100% metylované DNA jako PMR (percentage of methylated reference). PMR < 0.1% je považováno za negativní; PMR 0,1-3,9% slabě pozitivní; PMR 4,0-19,9% pozitivní; PMR 20,0-49,9% střední pozitivita; PMR 50,0-74,9% vysoká pozitivita; PMR ≥75% velmi vysoká pozitivita. Z našich dosavadních výsledků vyplývá následující frekvence výskytu metylací u pacientů AML při diagnóze CDKN2B 70%; ECAD 63%; CALCA 45%; DAPK1 20%; MYOD1, SOCS1 a TIMP3 15%; ESR1 10%, ICAM1 a TERT 0%. Stupně metylace dosahovaly nejvyšších hladin u genů CDKN2B, CALCA, ECAD a DAPK, u zbylých genů se až na výjimky pohybovaly v rozmezí slabé positivity. Všechny vyšetřované vzorky od pacientů v remisi vykazovaly negativitu ve všech sledovaných genech. Dva vzorky od pacientů v molekulárním relapsu onemocnění se pohybovaly na hranici slabé positivity pro gen CDKN2B, vzorek v potvrzeném relap-

su vykazoval pozitivitu pro dvojici sledovaných genů CDKN2B a ECAD. Pro pacienty AML, kteří vykazují při diagnóze pozitivitu v jednom či více ze sledovaných genů, je rozhodně zajímavé a přínosné sledovat výskyt a stupeň metylace v průběhu onemocnění a zaměřit se i na prognostický význam výskytu aberantní metylace. Podpořeno výzkumným záměrem 00023736.

#### P62 / 1479.

##### **Expresí genů WT1, PRAME, RHAMM, BAALC a vybraných "Leukemia Associated Antigens" v periferní krvi AML pacientů při diagnóze a v průběhu léčby**

Polák Jaroslav, Hájková Hana, Schwarz Jiří, Marková Jana, Maaloufova Jacqueline, Volková Zuzana, Haškovec Cedrik, Dvořáková Dana (*Ústav hematologie a krevní transfúze, Praha; FN Brno*)

Úvod: Za účelem monitorování minimální reziduální nemoci (MRN) u pacientů s AML byly sledovány exprese genů WT1, PRAME a RHAMM. Řada antigenů spojených s leukémiemi (LAA) je zvýšeně exprimována při diagnóze onemocnění. Cíl studie: Testování exprese výše uvedených genů a jejich vhodnosti jakožto markerů MRN. Metody: Expresí genů WT1 a PRAME v periferní krvi (PK) pacientů a zdravých dárců byla analyzována pomocí kvantitativní PCR v reálném čase s použitím specifických TaqMan prób. Expresí genů BAALC, RHAMM a vybraných LAA byla kvantifikována použitím TaqMan® Gene Expression Assays. Informovaný souhlas byl obdržán od všech sledovaných pacientů. Výsledky: Zvýšená exprese genu WT1 byla detekována v (PK) u 90% AML pacientů při diagnóze. U pacientů AML s přítomností fúzního genu AML1/ETO byla exprese WT1 nižší než u zbytku pacientů při diagnóze ( $P=0,0004$ ). Velmi nízká exprese genu WT1 při diagnóze byla nalezena u pacientů s přestavbou genu MLL. Zvýšená exprese genů PRAME a RHAMM byla nalezena u pacientů s AML při diagnóze (u 65% a 70%),  $P<0,0001$ . Expresí genu PRAME je vyšší u pacientů s AML a s přítomností fúzního genu AML1/ETO ve srovnání s zbylými AML při diagnóze,  $P=0,0029$ . Analogicky, exprese genu BAALC byla signifikantně zvýšena u pacientů s translokacemi t(8;21) a inv.16 (CBF leukémie),  $P<0,0001$ . Na druhé straně, exprese genu BAALC byla nízká u pacientů s přítomností translokace t(15,17) a v buňkách 13 leukemických buněčných liniích. Sledované LAA: ST18, XAGE1, MSLN, CSPG4 a CA9 byly zvýšeně exprimovány v 56%, 25%, 24%, 41% a 43% vzorcích z periferní krve pacientů s AML v době diagnózy. U několika pacientů s přítomností přestavby genu MLL byla sledována exprese vybraných LAA v průběhu léčby. Závěry: Na základě našich předběžných výsledků lze doporučit jako alternativní nespecifické markery MRN geny PRAME a BAALC a to zejména u pacientů s nízkou expresí WT1 při diagnóze. Vysoká exprese genu BAALC (negativní prognostický faktor u AML s normální cytogenetikou) byla rovněž neočekávaně zjištěna u pacientů s CBF leukémiemi, které jsou považovány za

skupinu s dobrou prognózou onemocnění. K zjištění statusu MRN lze rovněž u některých pacientů použít monitorování exprese vybraných LAA. Studie byla podpořena IGA MZ CR grantem: NR 8748-3

#### P63 / 1471.

##### **Neobvyklá přestavba genu PML/RARa detekovaná u pacienta s akutní promyelocytární leukémií - kazuistika**

Ježíšková Ivana, Gazdová Jana, Kořístek Zdeněk, Rázga Filip, Jurček Tomáš, Mayer Jiří, Dvořáková Dana (*Centrum molekulární biologie a genové terapie, IHOK FN a LF MU, Brno*)

Úvod: Akutní promyelocytární leukémie (APL) je stavem nejvyšší hematologické urgencye. Onemocnění může vést během několika hodin k úmrtí pacienta. Z tohoto důvodu je nutno APL diagnostikovat co nejrychleji a v případě suspekce na APL zahájit terapii ATRA, která snižuje riziko časného úmrtí, než bude dokončena přesná diagnostika stavu. U většiny nemocných s APL je detekována specifická t(15;17). Dostupnou metodou molekulární diagnostiky, která je zároveň schopna definovat typ zlomového místa v genu PML (bcr 1, 2, 3), je RT-PCR. Kvantitativní RQ-PCR pak představuje vhodnou metodu pro sledování minimální reziduální nemoci (MRN) pomocí nejčastějších typů transkriptů genu PML/RARa (dlouhé - L, variantní - V a krátké S - formy). Pro rychlost získání výsledku a dostatečnou citlivost ji lze úspěšně použít i jako metodu diagnostickou pro vstupní vyšetření. Cíl: Demonstrovat na zajímavé kazuistice pacienta s APL možnosti současné diagnostiky a ukázat na význam přesné specifikace zlomové oblasti. Pacient a metody: U 55 letého pacienta se suspekci na APL byla standardizovanou metodou RQ-PCR podle EAC protokolu (Gabert et al., Leukemia, 2003) prokázána pozitivita pro zlomovou oblast bcr 3 fúzního genu PML/RARa. Detekovaná pozitivita však byla na hranici citlivosti zvolené metody. Z tohoto důvodu byla provedena kontrolní analýza RNA jednkolovou RT-PCR s mírně odlišnou lokalizací primerů, která sice znovu potvrdila pozitivitu odpovídající uvedené oblasti, ale analýza PCR fragmentů na gelu ukázala atypickou délku amplikonu (480 vs. 320 bp). Amplikon byl podroben přímé sekvenční analýze. Výsledky: V PML/RARa genu pacienta byla identifikována neobvyklá pozice zlomového místa ve 4. intronu genu PML a dále přítomnost 85 nukleotidů dlouhé inserce, z čehož prvních 9 nukleotidů je neznámého původu a následujících 76 nukleotidů pochází z nepřekládané oblasti genu RARa. RQ-PCR podle EAC protokolu pro S - formu PML/RARa genu (bcr 3) navrhuje primery lokalizované do exonu 3 genu PML a exonu 3 genu RARa. V námi popisovaném případě však došlo změnou typu zlomu a insercí k prodloužení amplikonu o 156 nukleotidů, což vedlo k výraznému snížení amplifikační účinnosti a k detekci positivity na hranici citlivosti metody. Nezbytným předpokladem pro sledování MRN u našeho pacienta je navržení TaqMan systému specifického pro tento typ přestavby. Závěr: Uve-

dený příklad ukazuje na význam přesné specifikace molekulárního markeru pro sledování MRN.

#### P64 / 1455.

##### **Expresia bcl-xl a ABC transportných bielkovín vo vzťahu k citlivosti leukemických myeloblastov na cytostatiká *in vitro***

Račay Peter, Hatok Jozef, Chudej Juraj, Chudý Peter, Holý Pavol, Jurečeková Jana, Dobrota Dušan (*Ústav lekárskej biochémie JLF UK, Martin; KHaT MFN a JLF UK, Martin*)

Rezistencia na chemoterapiu predstavuje hlavný problém obmedzujúci efektívnosť protinádorovej terapie. Medzi najčastejšie molekulové mechanizmy rezistencie nádorových buniek patria: a) indukcia špecifických bielkovín podieľajúcich sa na odstraňovaní cytostatík z bunky (napr. ABC transportné bielkoviny) a biotransformácii cytostatík (napr. glutatión S transferázy) b) mutácie génov kódujúcich cieľové efektorové molekuly (napr. mutácie p53) c) nadprodukcia ochranných bielkovín (napr. antiapoptotických bielkovín BCL2 rodiny, enzýmov opráv DNA) d) represia efektorových (napr. tumor-supresorových a apoptotických) bielkovín. V našich experimentoch sme pozorovali významnú variabilitu hladín mRNA antiapoptotickej bielkoviny bcl-xl ako aj bielkovín z rodiny ABC transportérov (MDR1, MRP a BCRP) v leukemických myeloblastoch izolovaných z krvi pacientov s potvrdenou diagnózou akútnej myeloblastovej leukémie. Cieľom našej práce bolo zistiť či má hladina mRNA uvedených bielkovín vplyv na chemosenzitivitu leukemických myeloblastov stanovenú *in vitro*. Po vykonaní MTT testu a stanovení citlivosti myeloblastov na vybrané cytostatiká sme korelovali získané hodnoty LC50 s hladinou mRNA pre sledované bielkoviny stanovenou pomocou RT-PCR. Korelačná analýza ukázala, že medzi hladinou mRNA bcl-xl a citlivosťou leukemických myeloblastov na cytozín-arabinozid existuje štatisticky významný pozitívny vzťah ( $R=0,4477$ ,  $p=0,0283$ ). U ostatných vyšetovaných cytostatík (daunorubicín, mitoxantrón, etopozid a vinblastín) sme však nepozorovali štatisticky významné vzťahy. V prípade ABC transportných bielkovín sme nepozorovali štatisticky významné vzťahy medzi citlivosťou na vyšetované cytostatiká a hladinou mRNA sledovaných bielkovín. Naše výsledky naznačujú, že v prípade akútnej myeloblastovej leukémie je citlivosť buniek na Ara-C čiastočne modulovaná hladinou antiapoptotickej bielkoviny bcl-xl.

#### P65 / 1410.

##### **Sledovanie priebehu ochorenia u detských a dospelých pacientov s AML a MLL aberáciami v rokoch 2005-2008**

Mikulášová Zuzana, Illeňčíková Denisa, Slamka Tomáš, Džubasová Martina, Štrbová Dagmar, Čermák Martin, Ďurovčíková Darina (*Oddelenie onkologickej genetiky NOU, Bratislava; Oddelenie onkologickej genetiky NOU a Katedra lekárskej genetiky SZU, Bratislava*)

Úvod: Svetová zdravotnícka organizácia (WHO) navrhla špecifikovať 11q23+/MLL+ akútnu myeloblastovú leukémiu (AML) ako samostatnú jednotku vrámci AML s opakujúcimi sa cytogenetickými translokáciami (Vardiman a kol., 2002). 11q23+/MLL+ AML predstavuje 3% - 4% zo všetkých AML prípadov. Častejšie sa vyskytuje u dojcíat ako u dospelých a zvyčajne sa prejavuje AML M4/M5 fenotypom (Haferlach a kol., 2002). Incidencia MLL+ u AML závisí na metóde detekcie (MLL je relatívne častým cieľom kryptických prestáv). Prognóza je zlá, premenlivá podľa typu translokácie, fenotypu, a veku AML pacienta. Metódy: Cieľom našej práce bolo zistiť incidenciu jednotlivých prognosticky významných aberácií MLL génu u pacientov s diagnózou AML pomocou kombinácie cytogenetickej analýzy, FISH (split- signál FISH) a špecifických RT-PCR metód / PMRT PCR a identifikácia zriedkavých fúzných partnerov v spolupráci s Inštitútom Farmaceutickej Biológie/ZAFES/ Diagnostické Centrum Akútnej Leukémie, Univerzita vo Frankfurte nad Mohanom, Nemecko. Výsledky Zostavili a analyzovali sme súbor AML pacientov s cieľom zachytiť jednotlivé aberácie MLL génu. V rokoch 2005 až 2008 sme na oddelení onkologickej genetiky, NOÚ vyšetrili 105 dospelých (48 žien a 57 mužov v rozpätí od 19-79 rokov) a 22 detských pacientov (10 dievčat a 12 chlapcov v rozpätí od < 1-17 rokov) s diagnózou AML. U 5/22 detí s AML sme zistili nasledovné aberácie génu MLL: prestavbu a translokáciu MLL u 3/22, MLL PTD 1/22, gain MLL 1/22. U 14/105 dospelých s AML sme zistili nasledovné aberácie génu MLL: prestavbu a translokáciu MLL u 3, MLL PTD 5, gain MLL 4, amplifikácia 2 pacientov s AML. U pacientov sme sledovali prežívanie v korelácii s genetickým nálezom.

#### P66 / 1384.

##### **Zvýšená exprese genu ERG (homologu onkogenu v-ets viru E26 spôsobujúceho erytroblastózu u ptákov) a genu MN1 (meningioma 1) vedle ďalších prognostických faktorů u pacientů s akutní myeloidní leukémií**

Fuchs Ota, Provazníková Dana, Kostečka Arnošt, Břežinová Jana, Polák Jaroslav, Nováková Ludmila, Kouba Michal (*ÚHK, Praha*)

Analýzovali sme skupinu 65 pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML) převážně normálního karyotypu. Exprese genů ERG, MN1 a EVI1 ("ecotropic viral integration site 1") jsme stanovili pomocí kvantitativní PCR v reálném čase. Potřebné vzorky cDNA byly připraveny z celkové RNA, izolované z mononukleárních buněk získaných z kostní dřeně nebo periferní krve pacientů s AML, pomocí reverzní transkriptázy (SuperScript II, Invitrogen Corp.). Kontrolní vzorky cDNA byly získány z kostní dřeně a periférie zdravých jedinců odpovídajícího stáří. Exprese uvedených genů byla vztažena na expresi kontrolního "housekeeping genu" –glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázy (GAPDH) a považována za zvýšenou při překročení pěti-

násobné hladiny příslušných mRNA ve srovnání s průměrem kontrolních vzorků. V souboru 65 pacientů s AML jsme našli 23 pacientů se zvýšenou expresí genu MN1, 15 pacientů se zvýšenou expresí genu ERG a 5 pacientů se zvýšenou expresí genu EVI1. Devět pacientů z tohoto souboru mělo současně zvýšenou expresi genu MN1 i genu ERG a zároveň 2 pacienti z uvedených 9 pacientů měli současně zvýšenou expresi genů MN1, ERG i EVI1. U 8 z této skupiny 9 pacientů jsme současně prokázali částečné tandemové duplikace genu MLL (MLL-PTD). Potvrdili jsme, že současně zvýšená exprese genů MN1 a ERG je spojena s rezistencí na indukční léčbu a horším celkovým přežitím (celkové přežití u 5 pacientů, kteří ze skupiny 9 pacientů zemřeli, činilo v průměru 4,56 měsíců). Jeden z těchto pacientů měl dokonce dvojitou mutaci v genu CEBPA, která je považována za příznivý prognostický faktor a neměl MLL-PTD. Zbývá 3 pacienti absolvovali nedávno alogenní transplantaci kostní dřeně a 1 pacient s AML M2 po myelodysplastickém syndromu (MDS) je zatím již 8 měsíců úspěšně léčen decitabinem, který působí depleci metylcytosinu a hypometylaci cílových genových promotorů. Děkujeme všem dalším klinickým pracovníkům, kteří se podíleli na shromáždění uvedeného souboru vzorků.

#### P67 / 1478.

##### **AIHA s chladovými protilátkami zjištěná při vyšetření KO**

Dvořáková Barbora, Zapletal Ondřej (*OKH Dětská nemocnice, FN, Brno*)

Autoimunitní hemolytická anémie (AIHA) je hemolytický stav způsobený protilátkami namířenými proti vlastním erytrocytům organismu. Protílátky jsou nejčastěji tepelné povahy (IgG) - reagují při teplotě 37°C. Méně častá je AIHA s chladovými protilátkami (IgM) - reagují např. při 28-32°C. Rozlišujeme: 1. AIHA s tepelnými protilátkami 70% 2. AIHA s chladovými protilátkami 16% 3. Paroxysmální chladová hemoglobinurie 2% 4. Léky indukované hemolytické stavy 12% Základním vyšetřením při podezření na AIHA je přímý AGH test (PAT), jehož pozitivita svědčí pro přítomnost protilátek navázaných na erytrocytech a tedy o imunitní etiologii hemolýzy a následně určení specifity případné protilátky (NAT). Na přítomnost chladových protilátek může při hodnocení KO upozornit kromě sníženého Hb, abnormálně vysoká hodnota MCV způsobená tím, že při teplotě nižší, než je teplota těla, dochází ke shlukování (aglutinaci) erytrocytů a následnému odečtu shluků analyzátozem. AIHA s chladovými protilátkami může provázet např. infekční mononukleozu nebo pneumonii způsobenou mycoplasmaty, popsán je i vznik polékové AIHA s chladovými protilátkami. ZÁVĚR: Při rutinním vyšetření krevního obrazu byly zjištěny nesrovnalosti v naměřených hodnotách červené krevní řady, které nás vedly k pátrání po příčinách tohoto nálezu. Ve spolupráci s TO FN Brno byly v séru pacientky prokázány chladové pro-

tilátky ve vysokém titru (1:1000 ve zkumavkovém testu) - nález typický pro chladové AIHA. Ověření KS bylo komplikováno přítomností chladových pl. Tepelné protílátky nebyly prokázány. U pacientky, která byla zcela bez klinických obtíží byla stanovena dg. AIHA s chladovými protilátkami.

#### P68 / 1400.

##### **Izolace DNA pro účely HLA genotypizace-hodnocení některých izolačních automatů**

Klimentová Hana, Vondráčková Hana, Melková Milena, Vraná Milena, Dobrovolná Marie (*ÚHKT, odd. HLA analýzy, Praha; ÚHKT Praha*)

Základem úspěšné detekce HLA polymorfismu k určení histokompatibility pro transplantace hematopoetických kmenových buněk (HSCT) je kvalitní DNA, které je pro sekvenování či metodu PCR-SSP třeba 150-200  $\mu$ l, o minimální koncentraci 20ng/l, kdy stanovujeme koncentraci a faktor čistoty spektrofotometricky (NanoDrop) a kontrolní gelovou elektroforézou. Naše pracoviště používá automat GenoM-6 (Qiagen), jehož výhodou je čas izolace (20 min.), vysoká kvalita DNA, plně automatizovaný provoz a minimální vliv lidského faktoru. Nevýhodou je kapacita 6 vzorků a po 4 letech provozu opakovaná nutnost servisních zásahů. Vzhledem k neustálému nárůstu počtu vyšetření (meziročně o 20%) jsme byli nuceni hledat pro rutinní i výzkumnou činnost další automat při zachování všech zmiňovaných výhod. Sledovaná kritéria výběru byla: princip izolace, výtěžnost izolace, míra automatizace, snadnost obsluhy a kapacita přístroje. K testování jsme měli zapůjčená následující zařízení: QuickGene (FujiFilm): princip izolace spočívá v oddělení DNA pomocí porézní membrány (patent FujiFilm), avšak s nutností předchozí lýzy, kapacita přístroje je 8 vzorků s krátkou dobou izolace. Výtěžnost izolace DNA však nesplnila naše požadavky. U dalších zařízení byla principem izolace DNA vazba na paramagnetické kuličky: Maxwell 16 (Promega): poloautomatický přístroj s paralelním zpracováním 16 vzorků. Před vlastní izolací DNA je vyžadována lýza erytrocytů, což zpomaluje práci a přináší možnost lidské chyby při několikanásobném prepipetování. Magna Pure (Roche) automat paralelně zpracovávající 8 vzorků s vysokou výtěžností i kvalitou vyizolované DNA. Nevýhodou jsou velké rozměry přístroje a poměrně komplikovaný způsob obsluhy. iPrep (Qiagen), u kterého je výhodou paralelní zpracování 13 vzorků, výborná výtěžnost i kvalita DNA, malý vliv lidského faktoru a snadná obsluha. Nevýhodou je poměrně vysoká pořizovací cena. Tento způsob porovnání nabízených technologií přímo v laboratoři pro konkrétní aplikace se nám osvědčil a v případě možnosti ho hodláme používat jako univerzální metodický postup pro výběr laboratorních zařízení. Příspěvek byl podpořen výzkumným záměrem ÚHKT MZO 0002373601

**P69 / 1551.****Štúdium génových polymorfizmov pri poruchách zrážanlivosti krvi**

Kirschnerová Renáta, Dobrotová Miroslava, Babušíková Eva, Hatok Jozef, Jurečeková Jana, Dobrota Dušan (*Ústav lekárskej biochémie JLF UK, Martin; Klinika hematológie a transfuziológie MFN JLF UK, Martin*)

Hemostáza ako komplexný systém prirodzených mechanizmov organizmu slúži na jednej strane k zastaveniu krvácania a na druhej strane bráni nadmernej tvorbe krvných zrazenín. Riadená je optimálnou súhrou aktivačných a inhibičných mechanizmov plazmatických bielkovín s trombocytmi na povrchu cievného endotelu. Prirodzené inhibítory koagulácie slúžia na reštrikciu koagulačného procesu a chránia normálne cievy pred trombózou. Jedným z nich je proteín C, glykoproteín cirkulujúci v plazme v neaktívnej forme. Endotelový proteín C receptor (EPCR) je schopný viazať proteín C s vysokou afinitou, a tým zvyšovať mieru jeho aktivácie. Polymorfizmy EPCR génu sú spojené so zmenou distribúcie hladín aktivovaného proteínu C, ktorá súvisí s možným rizikom vzniku venózneho tromboembolizmu alebo naopak protektívnym účinkom a redukciovou vznikom trombózy. Stanovenie polymorfizmu 4678G/C v 3' neprekladanej oblasti EPCR génu sme uskutočnili pomocou PCR metódy. Na stanovenie možného vzťahu tohto polymorfizmu s rizikom vzniku trombózy sme určili genotypy pacientov s diagnostikovaným trombofilným stavom a kontrolnej skupiny zdrávych pacientov. U pacientov sme pozorovali signifikantne nižšiu frekvenciu výskytu genotypu 4678CC ako u kontrolnej skupiny. Výskyt C alely sa spája s vyššími hladinami cirkulujúceho aktivovaného proteínu C, pričom mechanizmus jeho narastania je zatiaľ neznámy. Genotyp 4678CC u skúmanej populácie pacientov môžeme považovať za faktor znižujúci riziko vzniku trombózy. Stanovenie polymorfizmov v EPCR géne by mohlo byť prínosom pre objasnenie porúch mechanizmu aktivácie proteínu C pomocou EPCR a pre stanovenie jeho možnej úlohy v budúcnosti slúžiť ako marker skorej identifikácie rizika vzniku trombofilných stavov. Táto práca vznikla za podpory grantu Univerzity Komenského č. 437/2008/UK.

**P70 / 1538.****Cirkulujúci mikropartikule u hemodialyzovaných pacientů**

Šimkovič Martin, Sadílek Petr, Malý Jaroslav, Dusilová Sulková Sylvie, Vrbacký Filip, Pecka Miroslav (*OKH, II. interní klinika FN a LF, Hradec Králové; Klinika gerontologická a metabolická, LF a FN Hradec Králové*)

Úvod: Prokoagulační mikropartikule jsou nedávno objevený marker endoteliální dysfunkce a kardiovaskulárních chorob. Nemocní s chronickým selháním ledvin u pravidelném hemodialyzačním programu patří do sku-

piny s nejvyšším rizikem kardiovaskulárních příhod. Proto tedy není překvapující, že u dialyzovaných bylo pozorováno zvýšení počtu mikropartikulí. Cíle: Naším cílem bylo stanovit prokoagulační aktivitu cirkulujících mikropartikulí u pacientů v pravidelném dialyzačním programu před hemodialýzou. Výsledky byly porovnány s kontrolní skupinou zdravých a hladinou solubilního P-selektinu a fibrinogenu, tedy zavedených markerů zánětu a aterosklerotických komplikací. Metodika: Prokoagulační aktivita cirkulujících mikropartikulí byla stanovena pomocí trombin generačního funkčního testu u stabilních dlouhodobě dialyzovaných pacientů (n=57) a zdravých dobrovolníků (n=20). Diabetická nefropatie byla přítomna u 23 dialyzovaných nemocných. Odběry byly provedeny bezprostředně před zahájením hemodialýzy z arteriovenózní píštěle. Hladina solubilního P-selektinu byla stanovena imunoenzymatickou reakcí. Jako marker zánětu byl sledován C-reaktivní protein. Výsledky: Prokoagulační aktivita cirkulujících mikropartikulí byla nižší u hemodialyzovaných pacientů (n=57) než-li u zdravých kontrol (n=20) ( $3,98 \pm 1,89$  vs.  $3,30 \pm 1,65$  nmol/l;  $p < 0,05$ ). Naopak solubilní P-selektin byl signifikantně vyšší u hemodialyzovaných (55,2±18.1 vs. 40.3±8,2 ng/ml;  $p < 0,001$ ). Podle očekávání byla signifikantně vyšší i hladina fibrinogenu u hemodialyzovaných nemocných ( $4,37 \pm 0,99$  vs.  $3,27 \pm 0,67$  g/l). Závěr: Na rozdíl od solubilního P-selektinu a fibrinogenu jsme nepozorovali zvýšení prokoagulační aktivity cirkulujících mikropartikulí před zahájením hemodialýzy. Práce vznikla za podpory Výzkumného záměru FNHK MZO 00179906.

**P71 / 1537.****Léčba ITP dětského věku rituximabem - první zkušenosti**

Smíšek Petr, Suková Martina, Pospíšilová Dagmar, Timr Pavel, Votava Tomáš, Hak Jiří (*Klinika dětské hematologie a onkologie, FN Motol, Praha; Dětská klinika, FN, Olomouc; Dětská klinika, Nemocnice České Budějovice; Dětská klinika, FN, Plzeň; Dětská klinika, FN, Hradec Králové*)

Imunní trombocytopenie (ITP) je nejčastější krvácivé onemocnění dětského věku. U většiny dětí s ITP se hodnota trombocytů v krátké době spontánně nebo po léčbě první volby (kortikoidy, intravenózní imunoglobuliny) normalizuje, asi ve 20% trombocytopenie přetrvává dlouhodobě. Jen malá část dětí s chronickou ITP (přibližně 5% ze všech nově diagnostikovaných ITP) vyžaduje další terapii. Indikací k léčbě je přetrvávající nízký počet trombocytů (pod  $20 \times 10^9/l$ ) a/nebo přítomnost krvácivých projevů. Vzhledem k riziku závažných akutně probíhajících bakteriálních infekcí je u dětí s chronickou ITP preferováno farmakologické ovlivnění trombocytopenie před splenektomií. Jednou z terapeutických možností je podání rituximabu. Zkušenosti s touto léčbou u dětí jsou zatím omezené. V letech 2005 – 2009 bylo ve 4 centrech dětské hematologie léčeno rituximabem celkem 9 dětí

s imunní trombocytopenií. Jednalo se o děti ve věku 4-18 let. Většina pacientů byla dlouhodobě sledována pro chronickou ITP, v jednom případě trombocytopenie trvala 4,5 měsíce a jedna dívka byla léčena pro akutní ITP. Ve všech případech byla předchozí léčba (kortikoidy, intravenózní imunoglobuliny, anti-D imunoglobulin, azathioprin) bez efektu a přetrvávala významná trombocytopenie. Rituximab (MabThera® Roche) byl podáván v dávce 375 mg/m<sup>2</sup> v týdenních intervalech, celkem 4x (v 8 případech). Dívce s akutní ITP byly podány pouze 2 dávky. Aplikace preparátu byla dobře tolerována, v souvislosti s podáním jsme nezaznamenali žádné závažné nežádoucí účinky. Na léčbu příznivě odpovědělo 7 pacientů (78%), 6 dětí zůstává v remisi ITP (hodnota trombocytů nad 150x10<sup>9</sup>/l) 2-42 měsíce od terapie. V jednom případě byl efekt jen částečný – počet trombocytů je opakovaně na bezpečné hodnotě nad 100x10<sup>9</sup>/l i když normální hodnoty (150x10<sup>9</sup>/l) dosaženo nebylo. Ve dvou případech (22%) bylo podání rituximabu zcela bez efektu, hodnota trombocytů zůstala pod 20x10<sup>9</sup>/l, obě děti byly následně indikovány ke splenektomii. Doba do normalizace počtu trombocytů byla 3 týdny až 6 měsíců od prvního podání rituximabu. U žádného z pacientů, kteří na léčbu odpověděli jsme dosud nezaznamenali relaps onemocnění. Naše zkušenosti potvrzují, že podání rituximabu dětem s chronickou ITP je vhodnou a dobře tolerovanou léčebnou alternativou, která může vést k oddálení splenektomie i ke dlouhodobé normalizaci počtu trombocytů. Podporováno VZ FNM 00064203 a výzkumným záměrem MŠMT: MSM 6198959205.

#### P72 / 1530.

##### Heparinem indukovaná trombocytopenie

Šigutová Pavla, Šlechtová Jitka, Hajšmanová Zdeňka (*hematologický úsek Ústavu klinické biochemie a hematologie FN a LF UK, Plzeň; ÚKBH FN a LF UK Plzeň*)

Úvod: S pokrokem v prevenci a léčbě trombotických stavů přichází i častější výskyt heparinem indukované trombocytopenie (HIT) jakožto život ohrožující komplikace heparinové terapie. HIT se objevuje přibližně u 0,5 – 5 % nemocných léčených heparinem, častěji po nefrakcionovaném heparinu než po LMWH. Kritéria pro diagnostiku HIT jsou 4 T: trombocytopenie (pokles destiček o 50 % původní hodnoty před léčbou heparinem), časové souvislosti (timing, pokles destiček 5. – 10. den po zahájení léčby), trombózy nebo kožní léze, vyloučení jiné příčiny trombocytopenie. Pro laboratorní diagnostiku HIT jsou k dispozici testy s rozdílnou senzivitou a specificitou: funkční (SRA - uvolnění serotoninu z destiček, agregace destiček s heparinem, zjišťování trombocytárních mikropartikulí pomocí průtokové cytometrie) a imunologické (různé modifikace stanovení protilátek proti komplexu heparin/PF4). Laboratorní testy pomáhají potvrdit či vyvrátit klinické podezření na HIT. Pro diagnostiku je nejvýhodnější kombinace senzitivního testu aktivity destiček a imunologický průkaz PF4. Vlastní kazu-

istiky: Ve FN Plzeň byl použit k diagnostice test PIFA Heparin/Platelet Factor 4 Rapid Assay. Uvádíme 2 úspěšně zvládnuté HIT: 60letou pacientku léčenou heparinem pro ileofemoropopliteokrurální trombózu levé dolní končetiny a scintigraficky prokázanou oboustrannou plicní embolizaci. 9. den po zahájení léčby heparinem došlo bezprostředně po zavedení portokaválního filtru ke kardiogennímu šoku, laboratorně prokázána trombocytopenie. Heparin vynechán, provedena celková trombolýza a pacientka léčena fondaparinuxem. Postupně pak převedena na Warfarin. V druhém případě se jednalo o 62letou polymorbidní ženu dlouhodobě léčenou Plavixem, nově podáván LMWH pro flebotrombózu pravého bérce, s akutní nutností laparotomie pro perforační divertikulitidu. 8. den po zahájení léčby LMWH se objevila trombocytopenie provázená narůstáním současné trombózy DK a zároveň krvácením do dutiny břišní bez nalezení chirurgického zdroje krvácení. Po ukončení terapie heparinem byla převedena na fondaparinux a později na Warfarin. Závěr: V případě podezření na HIT musí být okamžitě ukončena terapie heparinem a zahájena alternativní antikoagulační léčba. Nelze čekat na výsledek laboratorních testů. S rychlým nástupem nových antitrombotik, která se začínají užívat v prevenci žilní tromboembolie, bude pravděpodobně možné se v dalších letech HIT vyhnout či podstatně snížit její výskyt.

#### P73 / 1516.

##### Vliv oxidačního stresu na strukturu a funkci fibrinogenu

Štikarová Jana, Reicheltová Zuzana, Májek Pavel, Chrástínová Leona, Suttmar Jiří, Dyr Jan E. (*ÚHK, Praha*)

Fibrinogen, plasmatický glykoprotein o molekulové hmotnosti 340 kDa, patří mezi proteiny náchylné k působení oxidačního stresu. Fibrinogen hraje zásadní roli v sekundární hemostase, kdy po odštěpení fibrinopeptidů z jeho molekuly aktivovaným trombinem vzniká fibrin, který polymeruje a vytváří fibrinovou síť. Je velmi důležitý také v primární hemostáze, kde se aktivované krevní destičky váží přes povrchový receptor GPIIb-IIIa na fibrinogen. Oxidačním stresem rozumíme stav organismu, při kterém dochází k nerovnováze v zastoupení prooxidačních a antioxidantních látek ve prospěch prooxidačních. Kromě jiného dochází k tvorbě volných radikálů a jejich produktů, které mohou reagovat s biomolekulami, kdy mění jejich chemické a fyzikální vlastnosti a v důsledku mohou narušit jejich biologické funkce. V této práci byly studovány funkční i strukturální změny fibrinogenu vystaveného podmínkám oxidačního stresu. Oxidační modifikace byly vyvolány působením tří různých činidel – malondialdehyd, chlornan sodný a 3-morpholinosydnonimin. Strukturální změny byly sledovány pomocí SDS PAGE s následnou imunochemickou detekcí a metodou stanovení karbonylových skupin. Pro pozorování interakcí mezi izolovanými krevními destičkami a fibrinogenem byl použit analyzátor „Cone and Plate“. Tvorba a rozpouštění fibrinové sítě byly sledovány pomocí záka-

lových křivek. Vzhled vzniklé sítě byl sledován pomocí skenovací elektronové mikroskopie. HPLC byla použita ke sledování kinetiky odštěpování fibrinopeptidů z fibrinogenu působením trombinu. Oxidační modifikace způsobené výše zmíněnými systémy vyvolaly jak změny ve struktuře tak i ve fyziologické funkci v porovnání s kontrolním fibrinogenem. Získaná data mohou usnadnit porozumění možné role oxidativně modifikovaného fibrinogenu v atherotrombose. Tato práce vznikla za podpory grantu VZ ÚHK MZ 00002373601 a grantu AV ČR KAN200670701.

#### P74 / 1442.

##### **Kinetika odštěpování fibrinopeptidů z fibrinogenu adsorbovaného na povrchu**

Riedel Tomáš, Brynda Eduard, Houska Milan, Suttner Jiří, Dyr Jan E. (*Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha*)

Adsorpci fibrinogenu na povrch doprovázejí konformační změny, které mění povahu adsorbovaného fibrinogenu. Na rozdíl od fibrinogenu volně se vyskytujícího v krvi, adsorbovaný fibrinogen může interagovat s různými proteiny, buňkami a krevními destičkami a iniciovat tak proces vzniku trombu. V minulosti většina charakteristik fibrinogenu byla zkoumána v roztoku. Jelikož k tvorbě fibrinové sítě a aktivaci koagulační kaskády vždy dochází na povrchu, tím může být např. povrch biomateriálu, při poranění odhalený subendothel nebo poškozená cévní stěna, v této studii jsme se věnovali kinetice odštěpování fibrinopeptidů z fibrinogenu adsorbovaného na povrchu. Fibrinogen je protáhlá molekula o délce 45nm a tloušťce 5nm, kterou je možné adsorbovat na povrch ve dvou odlišných orientacích, ležící nebo stojící na povrchu, v závislosti na koncentraci výchozího roztoku. Na adsorbovaný fibrinogen jsme nechali působit trombin, enzym katalyzující odštěpování fibrinopeptidů z fibrinogenu. Kinetiku odštěpovaných fibrinopeptidů jsme stanovovali pomocí RP HPLC. Zjistili jsme, že se kinetika odštěpování fibrinopeptidů výrazně liší od kinetiky odštěpování fibrinopeptidů z roztoku. Zejména nedochází k lag-fázi odštěpování fibrinopeptidů a odštěpování fibrinopeptidů B probíhá rychleji a konečná hodnota odštěpených fibrinopeptidů B je dvakrát vyšší než fibrinopeptidů A. Orientace fibrinogenu adsorbovaného na povrchu a konformační změny, které adsorpci fibrinogenu provází, ovlivňují interakci fibrinogenu s trombinem a výrazným způsobem ovlivňují kinetiku odštěpování fibrinopeptidů. Fibrinopeptid B je znám jako silný chemoatraktant, proto usuzujeme, že přednostní uvolňování fibrinopeptidu B má fyziologický základ a slouží k přilákání buněk zánětu, hladkých svalových buněk a endotheliálních buněk do místa poranění. Změny vlastností fibrinogenu adsorbovaného na povrchu mohou přispívat k trombogennosti biomateriálů. Zvýšené hodnoty fibrinopeptidu B při trombotických stavech mohou být spojeny s pozměněnou kinetikou odštěpování fibrinopeptidů z fibrinogenu adsorbovaného na povrchu v místě vznikajících trombů. Tato práce vznikla za podpory grantu AVČR KAN200670701 a VZ MZ č.2373601.

#### P75 / 1436.

##### **Detekce S-nitrosothiolů v lidských krevních destičkách pomocí HPLC**

Pimková Kristýna, Balounová Renata, Sobotková Alžběta, Suttner Jiří, Dyr Jan Evangelista (*Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha*)

Úvod: Oxid dusnatý (NO) hraje významnou roli v řadě fyziologických procesů, účastní se hemostázy, signalizačních procesů, imunitní odpovědi organismu, odpovědi organismu na stres. Během aktivace lidských krevních destiček dochází ke stimulaci NO syntázy a následné zvýšené produkci a sekreci NO. Oxid dusnatý inhibuje aktivaci destiček. Hlavním mechanismem působení NO je aktivace rozpustné guanylát cyklázy, což vede ke vzrůstu koncentrace cGMP. Existují i jiné mechanismy, kterými NO ovlivňuje aktivitu destiček. NO může v přítomnosti rozpuštěného kyslíku reagovat za vzniku oxidu dusitého, který jako dobrý nitrosylační agens je schopen reversibilně reagovat s thiohy bílkovin za vzniku S-nitrosothiolů (RSNO). Literatura uvádí, že působení NO za vzniku RSNO může vést k posttranslačním modifikacím sulfhydrylových skupin cysteinových zbytků v proteinech. V této práci jsme sledovali hladinu S-nitrosothiolů v aktivovaných a neaktivovaných lidských krevních destičkách. Metody: Krevní destičky byly získány od zdravých dárců, kteří nejméně 14 dní neužívali léky ovlivňující aktivitu krevních destiček. Aktivace destiček byla hodnocena sledováním agregační odezvy v přítomnosti agonistů (kyselina arachidonová, kolagen a trombin) turbidimetricky. Pro stanovení RSNO v destičkách byla použita metoda HPLC s fluorimetrickou detekcí. NO<sub>2</sub> uvolněný z RSNO působením HgCl<sub>2</sub>, reaguje v kyselém prostředí s 2,3-diaminonaftalenem (DAN) za vzniku fluorescenčního barviva 2,3-naftotriazolu (NAT). Ten je fluorimetricky detekován při excitaci 365nm a emisi 425nm. Výsledky: Během aktivace krevních destiček dochází vlivem uvolňování nízkomolekulárních prooxidačních látek k modifikaci destičkových bílkovin a tím, kromě jiného, ke změně hladiny S-nitrosothiolů. Rozdíly byly zaznamenány i mezi aktivací jednotlivými agonisty. Poděkování: Tato práce vznikla za podpory grantů AV ČR KAN200670701, IGA MZ ČR NS 9636-3/2008, VZ MZ ČR 02373601.

#### P76 / 1416.

##### **Markers of endothelial activation in the prediction of subsequent development of preeclampsia**

Procházka Martin, Procházková Jana, Slavík Luděk, Úlehlová Jana, Pilka Radovan, Dhaifallah Ishraq, Měchurová Alena, Šimětka Ondřej (*Dept. of Gynecology and Obstetrics Dept. of Hemato-Oncology, Institute of Medical Genetics and Foetal Medicine, FH and MF PU, Olomouc; ÚPMD, Praha; Dept. of Gynecology and Obstetrics FH, Ostrava*)

Introduction: The hypertension and preeclampsia in pregnancy are multisystemic diseases characterized by hypertension, proteinuria and generalized systemic va-

soconstriction. The ischaemia of the fetoplacental unit cause the release of specific factors into maternal vessels and subsequent activation of the endothelium and vasoconstriction. There is a rush development of the laboratory tests and a new markers of the endothelial activation have been found. Eg. t-PA, PAI-1, vWF, EPCR, thrombomodulin and endothelial microparticules. The aim of the study: To detect of above mentioned markers of endothelial activation in healthy pregnant women compared to those with pregnancy complicated by hypertension, diabetes mellitus and preeclampsia. We suppose that plasma specimens of the women with preeclampsia and diabetes mellitus will contain a higher levels of endothelial activation markers compared to healthy pregnant. Methods: Included patients assigned an informed content. The blood sampling were taken routine way at the time of the first blood pregnancy sampling the end of the first trimester. The second specimen will be taken between 24.- 28. weeks of gestation. The following tests will be performed: t-PA – ELISA, PAI-1 – ELISA, vWF:Ag – EIA (immunologic detection by immunoturbidimetry), ePCR – ELISA, MMP-2,9 – ELISA (fluorogenic detection), endothelial microparticules – Flow cytometry. Results: The levels of vWf Ag and vW activity are significantly different ( $P = 0,02$  resp.  $0,01$ ) in group patients with diabetes in comparison with control group. The levels of TRM are significantly different ( $P = 0,03$ ) in group patients with hypertension as well as in group patients with diabetes ( $P = 0,02$ ) in comparison with control group. The levels of ePCR are significantly different ( $P = 0,04$ ) in group patients with hypertension as well as in group patients with diabetes ( $P = 0,01$ ) in comparison with control group. The levels of tPA and PAI are not significantly different in group patients with hypertension as well as in group patients with diabetes in comparison with control group. Conclusion: As expected, there were stat. Significant differences in the diabetes group in the case of vWf Ag, vWact., thrombomodulin and ePCR. Significant difference was found in the hypertension group compared to controls in ePCR. Whereas EMP, MMP-9 were not different in all groups. Supported by the Grant of Min.of Health, Czech Republic NR 9282-3/2007

#### P77 / 1415.

##### **Fetomaternální hemoragie při porodu císařským řezem**

Lubušký Marek, Ordeltová Marta, Procházka Martin, Vomáčková Kateřina (*Porodnicko-gynekologická klinika FN a LF UP, Olomouc; Oddělení alergologie a klinické imunologie LF UP a FN, Olomouc; I. chirurgická klinika LF UP a FN, Olomouc*)

Cíl studie: Zjistit incidenci fetomaternální hemoragie (FMH) při porodu císařským řezem a stanovit objem fetálních erytrocytů, které pronikají do mateřské krve. Určení těchto parametrů by umožnilo optimalizovat doporučení k pro-

vádění prevence Rh (D) aloimunizace. Pracovní hypotéza: IgG anti-D v dávce 10  $\mu\text{g}$  podané nitrosvalově by mělo pokrýt 0,5 ml fetálních Rh (D) pozitivních erytrocytů nebo 1 ml celé krve. U naprosté většiny porodů proniká do mateřské krve méně než 2,5 ml fetálních erytrocytů (5 ml plné krve, postačující dávka IgG anti-D 50  $\mu\text{g}$ ). Naopak jen ojediněle dochází při porodu k FMH, která přesahuje 5ml (10 ml plné fetální krve, postačující dávka IgG anti-D 100  $\mu\text{g}$ ). U většiny případů však není přítomen žádný rizikový faktor. Zvýšené nebezpečí prostupu červených krvinek plodu do krve matky je při porodu císařským řezem. Metodika: Celkem bylo v pilotním studii provedeno 130 vyšetření. Množství fetálních erytrocytů proniklých do oběhu matky při porodu císařským řezem bylo stanoveno průtokovou cytometrií na přístroji BDFACSCanto (Becton Dickonson International). Laboratorní zpracování: Fetal Cell Count™ kit (Diagnosis of Feto-maternal Transfusion by flow cytometry), IQ Products, IQP-379. Výpočet celkového objemu fetálních erytrocytů proniklých do oběhu matky: Scientific Subcommittee of the Australian and New Zealand Society of Blood Transfusion. Guidelines for laboratory assessment of fetomaternal haemorrhage. 1st ed. Sydney: ANZSBT, 2002: 3-12. Výsledky: Fetomaternální hemoragie (FMH)  $\leq 2,5$  ml (5ml celé krve), byla přítomna při porodu císařským řezem v 95,4% případů (124/130), postačující dávka IgG anti-D 50  $\mu\text{g}$ . FMH  $\leq 5$  ml (10 ml celé krve) v 97,7% případů (127/130), postačující dávka IgG anti-D 100  $\mu\text{g}$ . Ve zbylých třech případech byla FMH = 15,4 ml, 16,3 ml a 18,2 ml (31 ml, 33ml a 37 ml plné krve), postačující dávka IgG anti-D = 320  $\mu\text{g}$ , 330  $\mu\text{g}$  a 370  $\mu\text{g}$ . Závěr: Při porodu císařským řezem je u Rh (D) negativní ženy po porodu Rh (D) pozitivního plodu vhodné stanovit objem fetomaternální hemoragie (FMH) k upřesnění dávky IgG anti-D potřebné k prevenci Rh (D) aloimunizace. V 98% případů byla postačující dávka IgG anti-D 100  $\mu\text{g}$ , naopak ve zbývajících 2% případů se jednalo o excesivní FMH a bylo nutné podat dávku více než trojnásobnou.

#### P78 / 1401.

##### **Fibrinogen Uherské Hradiště**

Kotlín Roman, Reicheltová Zuzana, Suttar Jiří, Riedel Tomáš, Salaj Peter, Pohlreichová Viera, Geierová Věra, Dyr Jan E. (*Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha*)

Úvod: Fibrinogen je glykoprotein krevní plasmy o hmotnosti 340 kDa a je sestaven ze tří párů polypeptidových řetězců. Fibrinogen hraje klíčovou úlohu v hemostáze, účastní se angiogeneze, agregace krevních destiček a napomáhá migraci buněk. Proteolytickým odštěpováním N-koncových částí řetězců Aalfa a Bbeta dochází k odkrytí polymeračního místa a fibrinové monomery spontánně polymerují za vzniku fibrinových vláken tvořících fibrinovou síť. Vrozená dysfibrinogenemie je vzácná choroba projevující se strukturální změnou v molekule fibrinogenu vedoucí k funkční změně molekuly. Cílem této studie bylo odhalit příčinu patologického koagulačního nálezu u 36leté pacientky. Metody: Polymerace fibrinu a fibrinolýza byly sledovány turbidimetrickou meto-

dou při 350 nm. Kinetika odštěpování fibrinopeptidů byla měřena pomocí HPLC na reverzní fázi podle Suttnera et al. [1]. Sekvenování jednotlivých exonů genů FGA, FGB a FGG bylo provedeno dideoxysekvenační metodou. Skenovací elektronová mikroskopie (SEM) byla prováděna pomocí VEGA Plus TS 5135 elektronového mikroskopu [2, 3]. Výsledky: Pacientka – 36letá žena měla prodloužený trombinový čas (39.3 s) a nízkou hladinu funkčního fibrinogenu stanovenou metodou dle Clauss (0.85 g/l) a normální imunoturbidimetrickou hladinou fibrinogenu. Pacientka prodělala dva aborty v prvním trimestru gravidity spojené s výrazným krvácením. Polymerace fibrinu byla narušena a měření kinetiky odštěpování fibrinopeptidů ukázalo větší podíl odštěpených FpB oproti FpA. Genetická analýza ukázala heterozygotní bodovou mutaci v exonu 2 FGA genu způsobující záměnu Aalfa 13 Gly/Glu. Závěr: U pacientky byla nalezena mutace ve fibrinopeptidu A. Gly 13 je důležitý pro správné odštěpování FpA z molekuly fibrinogenu a jeho záměna za Glu znemožňuje trombinu katalyzovat hydrolytické odštěpení FpA, což má za následek porušenou polymeraci fibrinu, tvorbu abnormální fibrinové sítě a patologickou koagulaci. Tato práce vznikla za podpory IGA Ministerstva Zdravotnictví ČR číslo NS 9636-3/2008.

#### P79 / 1383.

##### **Analýza expresních profilů proteinů aktivovaných a klidových krevních destiček**

Reicheltovej Zuzana, Májek Pavel, Štikarová Jana, Kotlín Roman, Sobotková Alžběta, Chrastinová Leona, Suttner Jiří, Dyr Jan E. (*Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha*)

Důležitým procesem pro správnou funkci krevních destiček je jejich aktivace, která je provázána mimo jiné změnami destičkového proteomu a s ním souvisejících expresních profilů. Expresní profil proteinů je sledován na základě intenzity zabarvení spotů, resp. normalizovaného objemu spotů po zobrazení v 3D, po 2D SDS-PAGE. Pokud skupina proteinů vykazuje podobné expresní profily, existuje předpoklad, že je tato skupina podobně regulována, modifikována, exprimována, zapojena do navazujících metabolických drah nebo jsou proteiny této skupiny lokalizovány v těsné blízkosti v rámci vnitřního uspořádání destičky. Poznání takových skupin proteinů pak může přinést data, která nejsou běžnou proteomickou analýzou jednoduše dostupná. Krevní destičky zdravých dárců byly aktivovány třemi agonisty – kys. arachidonovou, kolagenem a thrombinem. Aktivace byla sledována agregometricky. Proteiny destiček byly separovány pomocí 2D elektroforezy s isoelektrickou fokusací (pH 3-10 a 4-7) v prvním směru a SDS-PAGE (gradientový gel 5-15%) v druhém. Po vizualizaci proteinů koloidní Coomassie byly gely převedeny do elektronické podoby, rozděleny do čtyř vzájemně porovnávaných skupin (neaktiv. destičky a třemi agonisty aktiv. destičky) a zpracovány pomocí softwaru Progenesis SameSpots (Nonlinear Dynamics, USA). Pomocí nanoLC-MS/MS byly pepti-

dy po štěpení trypsinem separovány na reverzní fázi (Ultimate 3000, Dionex, USA) a identifikovány hmotnostní spektrometrií na principu nanoESI-TRAP (HCT Ultra, Bruker Daltonics, USA). Porovnáním 36 gelů (pI 3-10) bylo nalezeno několik skupin proteinů s podobnými expresními profily. Vybrány byly pouze spoty, které se významně lišily ( $p < 0.05$ , ANOVA) alespoň ve dvou skupinách. Pro podrobnější analýzu bylo provedeno porovnání druhé skupiny 39 gelů v rozmezí pI 4-7. Pomocí expresních profilů byly nalezeny skupiny proteinů, které lze přiřadit k jednotlivým agonistům v rámci jejich fyziologického působení při aktivaci destiček. U dalších skupin proteinů (fibrinogen, aktin a další) existuje předpoklad pro jejich modifikaci působením reaktivních forem kyslíku a dusíku (RONS) – jejich vznik byl u aktivace destiček už prokázán. Citlivost proteinů těchto skupin k RONS byla již dříve publikována v literatuře. Některé skupiny proteinů se jeví jako potenciálně zajímavé pro další studium pochodů odehrávajících se při aktivaci krevních destiček. Poděkování: Tato práce byla podpořena granty AVČR KAN200670701 a VZ ÚHK MZ 02373601.

#### P80 / 1403.

##### **Globální hemokoagulační testy: Zkušenosti s použitím trombingeneračního testu u pacientů s trombofilii**

Hluší Antonín, Slavík Luděk, Úlehlová Jana, Krčová Věra, Indrák Karel (*HOK FN, Olomouc*)

Úvod: Podmínkou správné funkce hemokoagulačního systému je vyvážená interakce mezi systémem plasmatických koagulačních faktorů, buněčnými složkami vč. buněčných mikroparticulí a endotelem. Konvenčně užívané koagulační testy jsou založeny na in vitro měření časů srážlivosti, stanovení jednotlivých faktorů a inhibitorů, stanovení specifických mutací, příp. izolovaném vyšetření funkce trombocytů. Nepostihují však funkci hemostázy komplexně. Tento handicap postrádají vyšetření reflektující generaci trombinu, klíčového enzymu hemostatického systému. Tromboelastografické metody či waveform analýza odrážejí generaci trombinu nepřímou a jsou vhodné k rychlému základnímu posouzení poruch hemokoagulace, zvláště v urgentních oborech. Přímé monitorování vzniku trombinu pomocí trombingeneračního testu (TGT) představuje metodu laboratorně náročnější, poskytující ale detailnější informace o aktuální kapacitě hemostázy, včetně možnosti hodnocení trombofilního rizika či by-passové terapie u hemofiliků s inhibitory. Ve sdělení jsou představeny možnosti uvedených globálních vyšetřovacích metod. Dále jsou prezentovány vlastní zkušenosti s TGT u pacientů s trombofilii. Metoda: Při vyšetřování byl použit komerční kit TGT Technothrombin firmy Technoclone GmbH, založený na monitoraci fluorescence vznikající při štěpení fluorogenního substrátu trombinem. K vyšetření byla užitá plasma chudá na trombocyty. Softwarově zpracovaným výsledkem vyšetření z fluorescenčního readeru je křivka s hlavními parametry -

Lag fáze, max. koncentrace trombinu (Cmax) a endogenní potenciál trombinu (ETP). Vyšetřeny byly rovněž standardní trombofilní markery. V souboru 80 probandů s trombofilním stavem jsme hodnotili uvedené parametry ve vztahu ke klinickým projevům a standardním trombofilním markerům. Referenční skupinou byl soubor zdravých dárců krve. Výsledky: U symptomatických pacientů stejně jako u pacientů s FVL byly para-

metry Cmax a ETP vyšší v porovnání s kontrolní skupinou, naopak Lag fáze byla prodloužena u vzorků kontrolní skupiny. Závěr: TGT je novou nadějnou možností při laboratorním stanovení trombofilie, kde dosud užívané testy narážejí na své metodické možnosti. Limitací pro rutinní použití je nedostatečná standardizace a technická i ekonomická náročnost testu.