

standardně odvápňených trepanobiopických vzorků a u jednoho pacienta s LPL také na vzorku lymfatické uzliny. Panel imunohistochemického vyšetření zahrnoval primární protilátky anti-CD138, anti-kappa, anti-lambda, anti-CD79a, anti-IgM, anti-IgG, anti-IgA a duální protilátky proti těžkému/lehkému řetězci (IgGkappa, IgGlambda, IgMkappa, IgMlambda, IgA kappa). Kombinace duální protilátky proti těžkému/lehkému řetězci byla vybrána pro konkrétní vzorky podle dříve diagnostikovaného typu produkovaného lehkého řetězce. Výsledky CD138+ buňky byly ve vzorcích zastoupeny v rozmezí 30-90%. V polovině případů jsme pozorovali pozitivitu všech tří duálních protilátek, ve zbývajících čtyřech vzorcích byly pozitivní dvě duální protilátky (IgMkappa nebo IgMlambda, IgGkappa nebo IgGlambda). Při vyšetření protilátkami proti samostatným těžkým řetězcům byly ve všech vzorcích detekovány nádorové buňky s pozitivitou IgG, IgA pozitivita se vyskytovala pouze u případu IgA myelomu a IgM pozitivní buňky byly zjištěny pouze u lymfoplazmocy-

tárního lymfomu. Diskuze a závěr V pilotní studii o používání duálních heavy/light chain primárních protilátek jsme zjistili vysoké zastoupení falešně pozitivních výsledků. Vzorky od pacientů s IgG myelomem byly pozitivní také v reakci s duální protilátkou s těžkým řetězcem IgM a IgA, ačkoliv samostatné stanovení anti-IgM a anti-IgA bylo negativní. Současnou pozitivitu IgM/lehký řetězec a IgG/lehký řetězec u vyšetřených LPL nelze spolehlivě hodnotit, neboť v těchto neoplastických buňkách je exprese obou těžkých řetězců popisovaná. Jeden trepanobiopický vzorek s LPL však byl pozitivní také s anti-IgAlambda, přičemž vyšetření anti-IgA bylo negativní. Z našich výsledků vyplývá, že použití heavy/light chain protilátek u vzorků kostní dřeně je značně limitováno s předpokladem neduální „single“ vazby jedné součásti duální protilátky. Předpokládáme i možný vliv preanalytické fáze zpracování vzorků při procesu odvápňení trepanobiopických tkání. Tyto hypotézy je nutno ověřit v pokračování studie. Grantová podpora: IGA\_LF\_2016\_013.

## AKUTNÍ LEUKEMIE/ CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKEMIE

### **P16/2996. MOLEKULÁRNÍ ODPOVĚĎ JAKO PROGNOSTICKÝ FAKTOR U PACIENTŮ S AKUTNÍ MYELOIDNÍ LEUKÉMIÍ A SE ZVÝŠENOU EXPRESÍ WT1**

**Polák J., Petrboková R., Šálek C., Hájková H., Kouba M., Mertová J., Soukup P., Válková V., Cetkovský P. (Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha)**

Úvod. WT1 patří mezi antigeny spojené s leukémií. Měření jeho exprese může být využito ke sledování minimální reziduální nemoci (MRN) zejména těch pacientů, jimž nebyl identifikován specifický molekulární markér. Cíl. Posouzení prognostického vlivu míry exprese genu WT1 při diagnóze a v průběhu léčby. Pacienti a metody. Studie zahrnuje kohortu 84 pacientů (medián věku 52 let, rozpětí 21-66 let; medián doby sledování 1,9 let, rozpětí 0,6-7,1 let), kteří byli léčeni od r. 2008 do r. 2014. Pacienti měli vysokou expresi genu WT1 při diagnóze a dosáhli hematologické remise po 1 až 2 cyklech indukční chemoterapie. Konsolidační chemoterapie se skládala z 3-4 cyklů chemoterapie nebo z alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk (HSCT) v závislosti na cytogenetických a molekulárních charakteristikách a na odpovědi na první cyklus indukční chemoterapie. Pro kvantifi-

kaci exprese genu WT1 byla použita standardizovaná metodika podle doporučení Evropské leukemické sítě (ELN). Horní normální limit byl definován jako exprese  $\leq 50$  kopií genu WT1/10x4 kopií referenčního genu ABL v periferní krvi. Pro monitorování MRN byli vhodní jen pacienti s expresí genu WT1 při diagnóze větší než 500 kopií WT1/10x4 ABL. Molekulární odpověď (MR) byla definována jako pokles exprese genu WT1 pod hodnotu  $< 50$  kopií/10x4 ABL. Výsledky. Pacienti s expresí genu WT1 při diagnóze v rozmezí  $> 500$  a  $\leq 5000$  kopií WT1/10x4 ABL měli 3leté přežití (OS) 70 % a přežití bez události (EFS) 50 %, zatímco pacienti s  $> 5000$  kopiemi měli OS 50 % a EFS 25 % ( $p=0,036$  pro OS a  $0,030$  pro EFS). Nedosažení MR bylo silným prognostickým faktorem pro přežití v celkové kohortě (3leté OS 63 % vs. 27 %,  $p<0,001$ ; 3leté EFS 38 % vs. 0 %,  $p<0,001$ ); u pacientů léčených pouze chemoterapií (3leté OS 66 % vs. 34 %,  $p=0,002$ ; 3leté EFS 31 % vs. 0 %,  $p=0,009$ ); jakož i u pacientů, kteří podstoupili HSCT v první kompletní remisi (3leté OS 70 % vs. 30 %,  $p=0,009$ ; 3leté EFS 62 % vs. 12 %,  $p<0,001$ ). Medián doby do dosažení MR byl 3,0 měsíce (95%CI 2,8-3,1) a nebyl závislý na míře exprese WT1 před léčbou. Dosažení MR před započítáním konsolidační terapie nebylo prognosticky významné (3leté OS 67 % vs. 51 %;  $p=0,089$ ). Ze 43 WT1 pozitivních pacientů v tomto

časovém okamžiku jich 33 (77 %) dosáhlo MR po další fázi léčby (chemoterapii nebo HSCT). Z 27 pacientů, kteří byli pozitivní před I. konsolidací a kteří obdrželi další konsolidační cyklus, jich 22 (81 %) dosáhlo MR po II. konsolidaci. Nebyl nalezen rozdíl v přežití mezi pacienty, kteří nikdy nedosáhli MR a mezi těmi s molekulárním relapsem. Za použití vícerozměrné analýzy byly jako signifikantní prognostické faktory pro OS a EFS identifikovány hladina exprese genu WT1 při diagnóze a schopnost dosáhnout MR. Provedení HSCT v první linii léčby bylo dalším pozitivním prognostickým faktorem pro EFS. Exprese genu WT1 před provedením HSCT byla jediným signifikantním prognostickým znakem pro OS a EFS u transplantovaných pacientů. Závěr. Exprese genu WT1 při diagnóze koreluje s přežitím. Monitorování exprese WT1 je citlivým nástrojem pro sledování MRN u pacientů s jeho zvýšenou expresí při diagnóze. Neschopnost dosáhnout MR je silným indikátorem relapsu. Tito pacienti mohou profitovat z další intenzifikace léčby.

#### **P17/2984. SROVNÁNÍ SIMPLEX RT-PCR A KVANTITATIVNÍ RT-PCR PŘI SLEDOVÁNÍ HLADINY TRANSKRIPTU NUCLEOPHOSMINU NPM1 U PACIENTŮ S AKUTNÍ MYELOIDNÍ LEUKEMIÍ V HEMATOLOGICKÉ REMISI**

**Navrátilová J., Szotkowski T., Raida L., Lipert J., Indrák K., Papajík T. (Laboratoř molekulární biologie HOK FNOL, Olomouc)**

Úvod: Prognostický význam mutací genů CEBP $\alpha$ , FLT3-ITD, NPM1 či přítomnosti fúzních genů typu PML/RAR $\alpha$ , RUNX1/RUNX1T1 a některých dalších je poměrně dobře znám. Určení typu mutace podílející se na nádorové transformaci hematopoetické kmenové buňky napomáhá nejen s určením správné diagnózy, klasifikací velké a poměrně heterogenní skupiny akutních myeloidních leukemií do menších a lépe definovaných skupin, ale především se stanovením prognózy. Tyto molekulární markery umožňují také sledování minimální reziduální nemoci (MRD) u kurativně léčených pacientů. MRD je důležitým parametrem, který u některých mutací či fúzních genů umožňuje identifikovat skupinu pacientů s vyšším rizikem relapsu či počínající relaps onemocnění odhalit. Zaměřili jsme se na detekci MRD u skupiny akutních myeloidních leukemií s normálním karyotypem (NK-AML) nesoucích mutaci v nukleofosminu (NPM1). U nemocných s izolovanou mutací (bez přítomnosti interní tandemové duplikace FLT3) jde o chorobu s řazenou do podskupiny příznivou prognózou. Přítomnost MRD po terapii je podle našich zkušeností spojena s vyšším rizikem relapsu. Cíle:

Cílem práce bylo zavedení citlivější metody pro detekci MRD u NK-AML pacientů po chemoterapii a následně po alogenní transplantaci, kteří jsou v hematologické remisi onemocnění. Metodika: Jako základní metoda pro detekci a kvantifikaci mutací v genu NPM1 u NK-AML byla v Laboratoři molekulární biologie Hematoonkologické kliniky FN a LF UP Olomouc zavedena metoda jednokolové polymerázové řetězové reakce s fluorescenčně značenými primery. Výsledný PCR produkt je podroben fragmentační analýze (kapilární elektroforeze) na genetickém analyzátoru ABI3100 a elektroforetogramy jsou vyhodnoceny v programu GeneMapper. Výsledky pilotní analýzy: Otestovali jsme vzorky 3 pacientů s NK-AML s izolovanou mutací v NPM1. Dva pacienti kvůli relapsu onemocnění podstoupili alogenní transplantaci. Pro kvantitativní RT-PCR byly vybrány vzorky z období po chemoterapii, kdy byla u pacientů dosažena hematologická remise onemocnění. Zároveň jsme analyzovali vzorky po alogenní transplantaci. Všechny vzorky byly podrobeny simplex PCR a zároveň qRT-PCR (Ipsogen NPM1 MutA MutaQuant kit). U některých vzorků, kde pomocí simplex PCR nebyla MRD již zachycena, byla pomocí qRT-PCR zjištěna NPM1 pozitivita. Jde tedy o metodu vhodnější pro sledování MRD. Diskuze: Fluorescenční simplex PCR je dostatečně citlivou a spolehlivou metodou, která je vhodná pro základní detekci v době diagnózy, kdy je množství nádorových buněk vysoké. V době remise onemocnění je ovšem nezbytnou součástí panelu vyšetření citlivější metoda kvantifikace. Dnes jsou již na trhu dostupné komerčně dodávané kity pro kvantitativní RT-PCR. Proto jsme se rozhodli porovnat obě metody a kvantitativní PCR přidat do spektra nabízených vyšetření. Práce je podporována grantem IGA-LF-2016-001.

#### **P18/2955. ABERÁCIE CHROMOZÓMU 11 U AKÚTNEJ MYELOIDNEJ LEUKÉMIE /KAZUISTIKA/**

**Blahová A., Lengyelová K., Verchovodková V., Žákovičová A., Juríková K. (odd. genetiky, Medirex, Bratislava – SK)**

Úvod: Cytogenetické zmeny sú dôležitými determinantmi akútnych myeloidných leukémií (AML). V čase diagnózy sa vyskytujú u cca 70 až 80% pacientov s AML. K častým zmenám patria t(8;21)(q22;q22), t(15;17)(q22;q12), inv(16)(p13q22) a prestavby chromozómu 11 resp. oblasti 11q23. Tieto prestavby zahŕňujú delécie, zmnoženia a translokácie s rôznymi chromozómami. Translokácie sú spájané so zlou prognózou, vplyv delécie 11q23 na prognózu nie je jednoznačný. Kazuistika: Prezentujeme zaujímavý prípad mladej

pacientky s AML, ktorej bola v čase diagnózy detekovaná na cytogenetickej úrovni translokácia t(11;17)(q23;q25). Do translokácie bol zahrnutý gén KMT2A a na chr. 17 pravdepodobne gén SEPT9. Prestavba 11q23 bola potvrdená aj na FISH úrovni. Pacientka bola liečená a transplantovaná, no po čase relabovala a k primárnej zmene pribudla ďalšia sekundárna zmena - delécia dlhého ramena aj druhého chromozómu 11-del(11)(q14).

### **P19/2941. MUTAČNÍ ANALÝZA PACIENTŮ S AKUTNÍ MYELOIDNÍ LEUKÉMIÍ - OPTIMALIZACE HODNOCENÍ SEKVENAČNÍCH DAT A PŘEDBĚŽNÉ VÝSLEDKY NÁRODNÍ STUDIE**

Janečková V., Ježíšková I., Tlamková T., Budinská E., Kosařová Z., Čulen M., Folta A., Cetkovský P., Žák P., Sztokowski T., Jindra P., Ráčil Z. (*Interní hematologická a onkologická klinika, Fakultní nemocnice, Brno; Institut biostatistiky a analýz Lékařské a Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity, Brno; Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, Brno; Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematologická a onkologická klinika, Fakultní nemocnice, Brno; Ústav hematologie a krevní transfúze, Praha; IV. interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice, Hradec Králové; Hemato-onkologická klinika, Fakultní nemocnice, Olomouc; Hematologicko-onkologické oddělení, Fakultní nemocnice, Plzeň*)

Problematika: U pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML) představuje molekulární testování v době diagnózy a následné sledování identifikovaných genových aberací standardní součástí diagnosticko-terapeutického procesu. Kromě rutinně vyšetřovaných znaků rekurentních se zřejmým prognostickým významem byly nedávno v souvislosti s AML identifikovány nové genové mutace. Sekvenování nové generace (NGS) má potenciál stanovit frekvenci těchto nově popsaných mutací u jednotlivých pacientů a v rámci populace a zjistit jejich vzájemnou koexistenci a prognostický význam. Práce je součástí rozsáhlého projektu mutační analýzy pacientů s AML, do něhož jsou zapojena velká hematologická centra České republiky. Cíl: Provést mutační analýzu genů se vztahem k AML na pilotním souboru AML pacientů a navrhnout metodu bioinformatického zpracování, která bude dále využita pro hodnocení dat z velkého počtu vzorků. Metodika: Ze vzorků leukocytů periferní krve a kostní dřeně odebraných v průběhu onemocnění byla pomocí QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) izolována DNA. Pro přípravu DNA knihoven byl použit kit ClearSeq AML založený na principu Haloplex - cíleném sekvenování (Agilent Technologies). Design kitu pokrývá celkem 48 exonů

20 nejčastěji mutovaných genů u pacientů s AML, resp. myelodysplastickým syndromem: ASXL1, CSF2R, CBL, CEBPA, DNMT3A, EZH2, FLT3, IDH1, IDH2, JAK2, MPL, NPM1, NRAS, RUNX1, SETBP1, SF3B1, SRSF2, TET2, TP53, U2AF. DNA knihovny byly sekvenovány na přístrojích MiSeq a NextSeq (Illumina). Výsledky: Pro sledování vývoje mutací byly vybrány vzorky z doby diagnózy (záhytu), remise a hematologického relapsu onemocnění, případně primární rezistence. Analýza sekvenačních dat byla provedena softwarem SureCall (Agilent Technologies), který je výrobcem kitu přímo navržen pro hodnocení panelů ClearSeq AML. Výsledky byly porovnány s výsledky z rutinní molekulární diagnostiky genů NPM1, IDH1, IDH2, FLT3-ITD, NRAS a DNMT3A, stanovené konvenčními metodami. Srovnání dat ukázalo, že program SureCall není schopen optimálně detekovat např. méně frekventované mutace v genu NRAS a nedetekuje správně inserce/delece, např. inserce v genu NPM1 a dlouhé inserce v genu FLT3 (mutace FLT3-ITD). Proto byl vybrán a optimalizován jiný software a vytvořen celkový algoritmus bioinformatického hodnocení sekvencí ve formátu FASTQ. Součástí algoritmu je 1) filtrace a kontrola kvality dat, 2) mapování na referenční sekvenci hg38, kontrola kvality mapování, 3) remapování na inserce-delece, 4) detekce variant a jejich anotace (programy Pindel a GATK-HaplotypeCaller). Celkem bylo sekvenováno 28 vzorků od celkem 15 pacientů. Průměrné pokrytí cílů v jednotlivých bězích bylo minimálně 531x s 97 % bází pokrytých alespoň 30x a 95 % bází pokrytých alespoň 100x. Záhyt a frekvence mutací se v krvi a kostní dřeni testovaných vzorků významně nelišil. V sekvenovaných oblastech bylo v době diagnózy detekováno 35 potenciálně patogenních mutací s mediánem 2,5 (0-6) mutace na pacienta, s průměrnou variantní frekvencí 15,06 % (VAF 7-57 %). Provedená analýza umožnila nastavit postup pro bioinformatické zpracování dat. Optimalizovaný přístup bude nyní aplikován využít pro analýzy dalších klinických vzorků zařazených do projektu. „Podpořeno z projektu MUNI/A/1028/2015 a programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. 15-25809A. Veškerá práva podle předpisů na ochranu duševního vlastnictví jsou vyhrazena.“

### **P20/2939. CÍLENÁ LÉČBA REZISTENTNÍ A RELABUJÍCÍ AKUTNÍ LEUKÉMIE U DĚTÍ – KDE JSOU HRANICE?**

Šrámková L., Hrušák O., Mejstříková E., Žaliová M., Trka J., Kolenová A., Sedláček P., Horáková J., Pospíšilová D., Štěrba J., Timr P., Blažek B., Votava T., Procházková D., Hak J., Starý J. (Klinika dětské hematologie a onkologie UK 2.LF a FN Motol, Praha - CZ; Klinika detskej hematológie a onkológie, DFNSP, Bratislava - SK; Dětská klinika, FN Olomouc - CZ; Klinika dětské onkologie, FN, Brno - CZ; Dětská klinika, Nemocnice, České Budějovice - CZ; Klinika dětského lékařství FN, Ostrava - CZ; Dětská klinika, FN, Plzeň - CZ; Dětská klinika, Masarykova nemocnice, Ústí nad Labem - CZ; Dětská klinika, FN, Hradec Králové - CZ)

Akutní leukémie rezistentní na standardní chemoterapii nebo opakovaně relabující byla donedávna považována za nevléčitelné onemocnění. S rozšířením klinického použití nových cílených léků se posouvají hranice toho, kdy pacienty označíme za nevléčitelné a indikujeme pouze k paliativní péči. Nedílnou součástí zavádění nových léků je i zahájený program screeningu všech pacientů s rezistentní a relabující akutní lymfoblastickou leukémií (ALL) k detekci potenciálně léčebně ovlivnitelných molekulárně-genetických změn. Hodnotíme období 2/2014-2/2016, kdy jsme začali používat některé nové léčebné přístupy v každodenní praxi. Za toto období jsme léčili 4 pacienty s ALL ve věku 5-17 let bispecifickou monoklonální protilátkou blinatumomab. U všech se jednalo o použití blinatumomabu ve 3. nebo 4. linii léčby, 2 pacienti byli léčeni pro relaps po alogenní transplantaci hematopoetických buněk (HSCT), 2 pro rezistentní 1. relaps ALL, jejich léčba byla při protrahované dřeňové aplázii komplikována život ohrožujícími infekcemi. Hematologické odpovědi jsme dosáhli u 3 pacientů, 2 z nich dosáhli i molekulárně genetické remise, 1 pacient zemřel jako non-responder. Přes dosažení rychlé hematologické odpovědi prodělala 1 pacientka extramedulární relaps v průdušních žlázách, který jsme léčili s dobrým efektem monoklonální protilátkou antiCD22 konjugovanou s kalicheamicinem (inotuzumab ozogamicin), 1 pacientka zrelabovala v kostní dřeni krátce po skončení 2. cyklu blinatumomabu, dosáhla 3. remise po chemoterapii a byla transplantována, poslední pacient je v remisi s krátkou dobou sledování. Do léčby 1. relapsu ALL standardního rizika jsme v rámci léčebné studie IntReALL-SR zavedli randomizované podání antiCD22 protilátky (epratuzumab) v konsolidační terapii. Kromě použití monoklonálních protilátek na našem pracovišti jsme navázali spolupráci s NIH v Bethesdě, USA a 1 pacienta s recidivujícím

relapsem ALL v centrálním nervovém systému (CNS) po sourozenecké transplantaci jsme zařadili do studie s použitím T buněk s CD19 chimerickým antigenním receptorem a po dosažení remise podstoupil 2.HSCT. Problematickou zůstává nadále skupina pacientů s relabující T-ALL, kde jsou možnosti cílené léčby velmi omezené. U 2 pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML) jsme použili antiCD33 protilátku konjugovanou s kalicheamicinem (gentuzumab ozogamicin) v konsolidační terapii před HSCT, 1 pacientka s FLT3-ITD pozit. AML M5 byla při non response na indukční chemoterapii a současném anurickém renálním selhání léčena sorafenibem v monoterapii s dosažením hematologické remise po 2 týdnech podávání, které umožnilo zlepšení celkového stavu a pokračování další terapie. Nové léky umožňují u části opakovaně relabujících nebo rezistentních pacientů s akutní leukémií dosáhnout remise onemocnění a překonat závažné komplikace předchozí léčby. Smyslem této terapie je ve většině případů přemostění období do potenciálně kurativní HSCT. Podpořeno MZ ČR - RVO, FN v Motole 00064203

### **P21/2899. SROVNÁNÍ SÉROVÝCH KONCENTRACÍ CYTOKINŮ A ADHEZNÍCH MOLEKUL S PROGNOSTICKÝMI FAKTORY U PACIENTŮ S NOVĚ DIAGNOSTIKOVANOU AKUTNÍ LYMFOLASTICKOU LEUKÉMIÍ**

Horáček J. M., Kupsa T., Vaněk J., Jebavý L., Žák P. (Katedra vojenského vnitřního lékařství a vojenské hygieny, Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, Hradec Králové; Katedra informatiky a kvantitativních metod, Fakulta informatiky a managementu Univerzity Hradec Králové, Hradec Králové; 4. interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové)

Úvod: Cytokiny a adhezní molekuly jsou studovány jako markery aktivace imunitního systému u různých chorob včetně hematologických malignit. Cílem studie bylo srovnání sérových koncentrací cytokinů, cytokinových receptorů a adhezních molekul se vstupními charakteristikami a prognostickými faktory u pacientů s nově dg. akutní lymfoblastickou leukémií (ALL). Metodika: Do studie bylo zařazeno 30 pacientů s nově dg. ALL (medián věku 46, rozpětí 22-75 let, 20 mužů). Ve studii byly hodnoceny sérové koncentrace celkem 31 analytů, a to 21 cytokinů, 4 solubilní cytokinové receptory, 5 solubilních adhezních molekul a matrix metaloproteináza 9 (MMP-9). Z cytokinů byly měřeny hladiny interleukinů (IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-23), Epidermal Growth Factor (EGF), Granulocyte Macrophage Colony

Stimulating Factor (GM-CSF), Interferon-gamma (IFN-gamma), Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha (MIP-1 alpha), Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1), Tumour Necrosis Factor-alpha (TNF-alpha), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), dále solubilní receptory pro IL-2 (sIL-2R alpha), IL-6 (sIL-6R), TNF typu 1 a 2 (sTNFR-1,2). Z adhezních molekul byly měřeny hladiny solubilního E-selektinu (E-SEL), L-selektinu (L-SEL), P-selektinu (P-SEL), Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) a Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1). Všechny analyty byly měřeny biočipovou technologií na analyzátoru Evidence Investigator (Randox). Hladiny testovaných analytů byly porovnány se vstupními charakteristikami pacientů – věk, pohlaví, typ ALL (imunofenotyp, cytogenetika, molekulární genetika), vstupní riziko podle GMALL, procento blastů v kostní dřeni, parametry krevního obrazu (leukocyty, hemoglobin, trombocyty, procento blastů), biochemické parametry (LDH, CRP) a další. Statistické zhodnocení bylo provedeno erudovaným statistikem pomocí softwaru R 3.2.3. Hodnoty  $p < 0,05$  byly považovány za statisticky významné. Výsledky: V souboru bylo 29 B-ALL a 1 T-ALL. Normální karyotyp mělo 8 pacientů, 16 pacientů mělo cytogenetickou změnu a u 6 pacientů nebyl karyotyp získán. 12 pacientů bylo BCR/ABL+, 1 pacient měl přestavbu MLL/AF4 a 1 pacient E2A/PBX1. Hyperleukocytoza (nad 30 000/μl u B-ALL, nad 100 000/μl u T-ALL) byla přítomna u 8 pacientů. Dle kritérií GMALL mělo vstupně 9 pacientů standardní riziko (SR), 9 pacientů vysoké riziko (HR) a 12 pacientů velmi vysoké riziko (VHR). U pacientů s nově dg. ALL byla prokázána silná negativní korelace IL-7 s počtem leukocytů ( $r = -0,633$ ;  $p = 0,032$ ), procentem blastů v periferní krvi ( $r = -0,695$ ;  $p = 0,004$ ) a LDH ( $r = -0,604$ ;  $p = 0,075$ ). Dále byla nalezena velmi silná pozitivní korelace IL-7 s počtem trombocytů ( $r = 0,801$ ;  $p < 0,0001$ ) a silná korelace VCAM-1 s LDH ( $r = 0,664$ ;  $p = 0,012$ ). Ostatní korelace testovaných analytů se vstupními charakteristikami ALL nedosáhly statistické významnosti. Závěr: Naše výsledky ukazují, že sérové koncentrace některých cytokinů a adhezních molekul korelují se vstupními charakteristikami pacientů s nově dg. ALL. U pacientů s aktivní ALL jsou nízké hladiny IL-7 spjaté s hyperleukocytozou, vyplavováním blastů do periferní krve a zvýšením sérového LDH. U žádného z testovaných analytů nebyla prokázána statisticky významná korelace s cytogenetickými nebo molekulárně genetickými změnami. V další kroku budou studovány korelace s léčebnou odpovědí a přežitím pacientů. K posouzení prognostického a prediktivního potenciálu změn v systému cytokinů a adhezních interakcí budou potřebné další studie na větších počtech pacientů. Podpořeno z projektu RO 1011 (FVZ).

## **P22/2898. SÉROVÝ PROFIL CYTOKINŮ, CYTOKINOVÝCH RECEPTORŮ A ADHEZNÍCH MOLEKUL U PACIENTŮ S NOVĚ DIAGNOSTIKOVANOU AKUTNÍ LYMFBLASTICKOU LEUKEMIÍ A U ZDRAVÝCH JEDINCŮ**

**Horáček J. M., Kupsa T., Vaněk J., Jebavý L., Žák P.** (Katedra vojenského vnitřního lékařství a vojenské hygieny, Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, Hradec Králové; Katedra informatiky a kvantitativních metod, Fakulta informatiky a managementu Univerzity Hradec Králové, Hradec Králové; 4. interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové)

Úvod: Signální mikroprostředí hraje důležitou roli u řady chorob včetně hematologických malignit. Poznatky získané ze studia cytokinů a adhezních interakcí by mohly umožnit zlepšení diagnostiky a léčby těchto onemocnění, protože cytokiny nebo jejich receptory mohou představovat cíle pro specifickou protinádorovou léčbu na molekulární úrovni. Cílem studie bylo porovnání sérového profilu cytokinů, cytokinových receptorů a adhezních molekul u pacientů s nově dg. akutní lymfoblastickou leukémií (ALL) a u zdravých jedinců. Dále byly hodnoceny vzájemné korelace jednotlivých analytů zvláště v obou skupinách. Metodika: Do studie bylo zařazeno 30 pacientů s nově dg. ALL (medián věku 46, rozpětí 22–75 let, 20 mužů) a 15 zdravých dárců krve jako kontrolní skupina (medián věku 41, rozpětí 25–58 let, 11 mužů). Hodnotili jsme sérové koncentrace celkem 31 analytů, a to 21 cytokinů, 4 solubilní cytokinové receptory, 5 solubilních adhezních molekul a matrix metaloproteinázu 9 (MMP-9). Z cytokinů byly měřeny hladiny interleukinů (IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-23), Epidermal Growth Factor (EGF), Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF), Interferon-gamma (IFN-gamma), Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha (MIP-1 alpha), Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1), Tumour Necrosis Factor-alpha (TNF-alpha), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), dále solubilní receptory pro IL-2 (sIL-2R alpha), IL-6 (sIL-6R), TNF typu 1 a 2 (sTNFR-1,2). Z adhezních molekul byly měřeny hladiny solubilního E-selektinu (E-SEL), L-selektinu (L-SEL), P-selektinu (P-SEL), Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) a Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1). Všechny analyty byly měřeny biočipovou technologií na analyzátoru Evidence Investigator (Randox). Statistické zhodnocení bylo provedeno erudovaným statistikem pomocí softwaru R 3.2.3 (R Core Team 2015). Hodnoty

$p < 0,05$  byly považovány za statisticky významné. Výsledky: U pacientů s nově dg. ALL jsme ve srovnání se zdravými jedinci zjistili statisticky významné zvýšení sérové koncentrace IL-6, IL-8, IL-15, MIP-1 alpha, MCP-1, sIL-2R alpha, sIL-6R, sTNFR-1, sTNFR-2, L-SEL, ICAM-1 a VCAM-1 ( $p < 0,01$ ). Dále jsme u pacientů s ALL zjistili statisticky významné snížení sérové koncentrace IL-3, IL-4 a GM-CSF ( $p < 0,01$ ). Ve skupině pacientů s ALL jsme prokázali statisticky významné korelace mezi sTNFR-1 a sTNFR-2 ( $r=0,805$ ;  $p < 0,0001$ ), IL-1 alpha a IL-4 ( $r=0,700$ ;  $p=0,008$ ), sTNFR-2 a MIP-1 alpha ( $r=0,657$ ;  $p=0,037$ ), sTNFR-2 a VCAM-1 ( $r=0,652$ ;  $p=0,044$ ). V kontrolní skupině byly prokázány statisticky významné korelace mezi EGF a IL-7 ( $r=0,876$ ;  $p=0,009$ ), EGF a IL-8 ( $r=0,856$ ;  $p=0,022$ ). Závěr: Naše výsledky ukazují, že sérové koncentrace některých cytokinů, cytokinových receptorů a adhezních molekul jsou významně odlišné u pacientů s nově dg. ALL ve srovnání s kontrolní skupinou zdravých jedinců, a mají vztah k aktivitě onemocnění. Dále jsme zjistili statisticky významné korelace mezi některými analyty. Není jasné, zda tyto změny mohou sloužit jako prognostické ukazatele u ALL. Další studie na větším počtu pacientů a srovnání se zavedenými prognostickými faktory budou nezbytné. Práce byla podpořena z projektu RO 1011 (FVZ).

### **P23/2897. AKTIVACE BUNĚK ENDOTELU A SÉROVÉ HLADINY CYTOKINŮ A SOLUBILNÍCH ADHEZNÍCH MOLEKUL U AKTIVNÍ AKUTNÍ MYELOIDNÍ LEUKÉMIE A V KOMPLETNÍ REMISI**

**Kupsa T., Vaněk J., Jebavý L., Žák P., Horáček J. M.** (Katedra vojenského vnitřního lékařství a vojenské hygieny, Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, Hradec Králové; Katedra informatiky a kvantitativních metod, Fakulta informatiky a managementu Univerzity Hradec Králové, Hradec Králové; 4. interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové)

Cíl: Rezistence akutní myeloidní leukémie (AML) k terapii je prognosticky nepříznivá. Předpokládaným molekulárním mechanismem je mimo jiné interakce prozánětlivých cytokinů jako je tumor nekrotizující faktor alfa (TNF-a) s buňkami endotelu a následná zvýšená exprese adhezních molekul. V této studii jsme ověřovali hypotézu, že hladiny cytokinů a solubilních adhezních molekul souvisí s aktivací buněk endotelu u AML. Metodika: Byl studován soubor 84 nemocných s nově zjištěnou AML. U 45 z nich byl vyšetřen vzorek séra odebraný v době kompletní remise (CR). Alogenně transplantovaní pacienti nebyli v době CR

hodnoceni. Hodnotili jsme sérové hladiny celkem 29 analytů: interleukiny (IL-1a, IL-1b, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15), Epidermal Growth Factor (EGF), Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF), Interferon-gama (IFN-gama), Macrophage Inflammatory Protein-1a (MIP-1a), Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1), TNF-a, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), E-selektin (E-SEL), P-selektin (P-SEL), Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1), Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1), Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9), solubilní IL-2 receptor-a (sIL-2Ra), solubilní receptory pro IL-6 (sIL-6R) a TNF-a typ I a II (TNFR-1,2). Biomarkery byly měřeny za použití proteinového biočipu na analyzátoru Evidence Investigator (Randox). Odchylky s  $P < 0,05$  byly považovány za statisticky signifikantní. Výsledky: U aktivní AML koreloval VCAM-1 s ICAM-1 ( $P < 0,0001$ ), E-SEL ( $P = 0,0011$ ), počtem leukocytů ( $P = 0,0006$ ), TNF-a ( $P < 0,0001$ ), TNFR-2 ( $P < 0,0001$ ), TNFR-1 ( $P = 0,0047$ ), LDH ( $P < 0,0001$ ), IL-2Ra ( $P = 0,0224$ ) a IL-6R ( $P = 0,0240$ ). Hladiny ICAM-1 korelovaly s E-SEL ( $P = 0,0285$ ), TNFR-1 ( $P = 0,0007$ ) a LDH ( $P = 0,0344$ ). E-SEL koreloval s P-SEL ( $P < 0,0001$ ), počtem leukocytů ( $P < 0,0001$ ), LDH ( $P < 0,0001$ ), TNFR-1 ( $P = 0,0152$ ) a TNFR-2 ( $P = 0,0202$ ). Hladina CRP korelovala s IL-6 ( $P < 0,0001$ ), ICAM-1 ( $P = 0,0122$ ) a negativně s hladinou albuminu ( $P = 0,0175$ ). Počet trombocytů koreloval s IL-7 ( $P < 0,0001$ ), EGF ( $P < 0,0001$ ) a VEGF ( $P = 0,0025$ ). Věk ani hladina hemoglobinu nekorelovaly s žádným z hodnocených analytů. V době CR byly při normalizaci počtu trombocytů hladiny IL-7 ( $P < 0,0001$ ), EGF ( $P < 0,0001$ ) a VEGF ( $P < 0,0001$ ) vyšší než u aktivní AML. Hladiny IL-6 byly nižší, korelace s CRP nebyla přítomna. Hladiny VCAM-1, ICAM-1, E-SEL a P-SEL byly nižší, po Bonferroniho korekci P však statisticky nevýznamně. P-SEL koreloval s počtem trombocytů ( $P < 0,0001$ ) a IL-8 ( $P < 0,0001$ ), což u aktivní AML nebylo prokazatelné. VCAM-1 koreloval s ICAM-1 ( $P = 0,0027$ ), ale ne s E-SEL nebo P-SEL. E-SEL a P-SEL nekorelovaly. Závěr: Věk ani hladina hemoglobinu nemají zásadní vliv na nádorové mikroprostředí u AML. Důležitým zjištěním je vzájemná korelace hladin adhezních molekul u aktivní AML ukazující na celkovou aktivaci adhezních interakcí v souvislosti s počtem leukocytů, LDH a některými cytokiny. Pochopení změn v regulaci signálního mikroprostředí s ohledem na aktivitu AML je důležitější než prosté porovnání hladin vyšetřovaných analytů. Naše data ukazují, že endotel je u aktivní AML aktivován. Aktivované endotelie jsou zdrojem E-SEL i P-SEL. V CR jsou hlavním (a fyziologickým) zdrojem P-SEL trombocyty, E-SEL a P-SEL nekorelují. Aktivace endotelu souvisí s rezistencí AML k terapii. U faktorů

souvisejících s aktivací endotelu u AML bude následně zkoumána možnost jejich využití jako nových prognostických markerů. Práce byla podpořena z projektu RO 1011 (FVZ).

### **P24/2889. PROJEKT AML NA SEVERNÍ A STŘEDNÍ MORAVĚ**

Starostka D., Szotkowski T., Adamová D., Kadlčková E., Brejcha M., Janek D., Jochymek R., Vaculová J., Rytikova N., Vinklárková K. (Oddělení klinické hematologie, Nemocnice s poliklinikou, Havířov, p.o.; Hematologická klinika FN, Olomouc; Hematologicko-transfúzní oddělení, Slezská nemocnice, Opava, p.o.; Hematologicko-transfúzní oddělení, Krajská nemocnice T. Bati, Zlín, a.s.; Hematologické oddělení, Nemocnice, Nový Jičín, a.s.; Hematologicko-transfúzní oddělení, Nemocnice s poliklinikou, Karviná - Ráj, p.o.; Hematologicko-transfúzní oddělení, Nemocnice, Třinec, p.o.; Hematologicko-transfúzní oddělení, Nemocnice, Frýdek - Místek, p.o.; Hematologická ambulance, Sdružené zdravotnické zařízení, Krnov, p.o.; Hematologicko-transfúzní oddělení, Nemocnice, Hranice, a.s.)

Úvod: Primárním cílem projektu byl sběr údajů o výskytu AML a její léčbě na severní a střední Moravě. Sekundárním cílem projektu bylo zpřesnění diagnostiky a prognostické stratifikace AML v uvedeném regionu. Metody: Údaje o nově diagnostikovaných případech AML byly evidovány po dobu 1 roku v regionu s populací 2,1 milionu obyvatel. Sledované údaje zahrnovaly: pohlaví, věk v době diagnózy, kategorie AML dle WHO klasifikace, rozlišení na primární a sekundární MDS, komorbidita a způsob léčby. Výsledky: Celkem bylo diagnostikováno 73 nových případů AML. Incidence AML byla 3,5 případů na 100 tisíc obyvatel (63% mužů, 37% žen). Věkový medián v době diagnózy byl 68 let (minimum 29 let, maximum 91 let). Výskyt jednotlivých diagnostických kategorií: AML s rekurentními genetickými abnormalitami 26.0%, AML s myelodysplastickými změnami 27.4%, AML spojená s léčbou 13.7%, AML asociovaná s Downovým syndromem 1.4%, AML nespecifikované 31.5%. Diagnostická shoda primárního a sekundárního cytologického vyšetření byla 100%. Diagnostická shoda cytologického a histologického vyšetření byla 84%. Primární AML se vyskytla v 58 %, sekundární AML ve 42 %. Signifikantní komorbidita byla přítomna u 82% nemocných: kardiovaskulární 63%, endokrinologická 33%, gastrointestinální 11%, významná chronická nemoc ledvin 5,5%, revmatologická onemocnění 1.3%, plicní komorbidita 10%, neurologická a psychiatrická onemocnění 8%. Nádorová duplicita se vyskytla ve 38% (po odečtení MDS 21%).

Léčba zahrnovala transfúze erytrocytů a/nebo trombocytů, chemoterapii, epigenetickou léčbu a allo-BMT nebo jejich kombinaci. Závěr: V rámci Projektu AML na severní a střední Moravě byly zmapovány základní demografické ukazatele, diagnostická, prognostická a léčebná data týkající se AML. Dalším výsledkem bylo zpřesnění diagnostiky a prognostické stratifikace AML v uvedeném regionu.

### **P25/2866. ALLOGENEIC HAEMATOPOIETIC CELL TRANSPLANTATION IN PATIENTS WITH FLT3-ITD MUTATED AML: TRANSPLANTATION IN 1ST CR IS THE DECISIVE FACTOR FOR GOOD OUTCOME**

Jindra P., Karas M., Szotkowski T., Lysák D., Raida L., Jungová A., Kuba A., Hrabětová M., Černan M., Steinerová K. (University Hospital, Pilsen; University Hospital, Olomouc)

Introduction: Patients with karyotypic normal (CN) FLT3-ITD mutated AML have dismal prognosis and the only curative option seems to be alloHCT. However, the timing of alloHCT is still matter of debate and some advocates HCT only beyond 1st CR. The consistent policy in 2 Czech centres since 2003 is to refer all FLT3-ITD+ AML pts to upfront alloHCT in CR1. The aim of this study was to analyze the outcomes of this strategy. Material (or patients) and methods: 73 consecutive adults with FLT3-ITD+ CN-AML allografted in 2 centres (56+17 pts) from 2003-2014 either with matched sibling (MSD, n=23, 32%) or unrelated donors (UD, n=50, 68%) were studied. Conditioning regimen was either RIC (n=54) or myeloablative (MAC, n=19). The median age of cohort was 53 years (20-68). 33 (45%) were NPM1mutated. The original aim of our policy was to perform HCT in CR1 (n=56), however in some patients due to various reasons (donor availability, disease resistance or patient preference), HCT was performed in more advanced stage (n=17, 1xPR1, 2xCR2/PR2, 4xPIF, 10xREL). Median interval dg. - HCT was 5 months (2-13) with median of 2 (1-5) cycles of chemotherapy before HCT. For analysis, the status at the time of HCT was classified as either early (CR1) or advanced (CR2, PR1, PR2, REL, PIF) Results: With median follow up of 44 months (range 5-135) altogether 35 pts (48%) has died mainly of relapse (n=26, 74%). The 5-year probabilities of OS and DFS were 49% and 47%. Cumulative incidences of relapse (RI) and NRM at 5-y were 37% and 17%, respectively. Cox regression hazard model identified status at HCT outside the CR1 (=advanced disease) as the strongest factor predicting extremely poor OS/DFS (HR 6.665, p<0.0001/HR 5.474, p<0.0001) and RI (HR

8.270,  $p < 0.0001$ ). The estimated 5-y OS for patients transplanted in CR1 was 62% vs. 0% for pts transplanted outside CR1. The higher patient age (cut-off 57 years) predicted higher NRM (HR 5.496,  $p = 0.0136$ ) as well as the higher aGVHD grade (HR 2.577,  $p = 0.0058$ ). The presence of chronic GVHD was associated with superior OS/DFS (HR 0.178,  $p = 0.0059$ /HR 0.238,  $p = 0.01$ ) probably because of the relapse protection (HR 0.214,  $P = 0.0145$ ). No association of patient age, NPM mutational status, time to HCT, no. of cycles pre-HCT, donor type (MSD vs. UD), donor age and sex, conditioning regimen (MAC vs. RIC), stem cell source, CD34+ cell dose and CMV status on the main outcomes was detected. Multivariable analysis identified HCT outside CR1 as the key factor for poor OS (HR 5.419,  $p < 0.0001$ ), DFS (HR 4.415,  $p = 0.0002$ ) and high RI (HR 8.080,  $p < 0.0001$ ). aGVHD grade  $\geq$ III predicted higher NRM (HR 3.798,  $p = 0.059$ ) as well as inferior OS (HR 2.041,  $p = 0.0079$ ) and DFS (HR 1.693,  $p = 0.0439$ ). Conclusion: Despite the limitations of a retrospective study, our data suggests alloHCT is a valuable therapeutic option for FLT3-ITD mutated CN-AML patients with potential to provide durable remission if patient is transplanted in CR1. Until prospective studies are completed, our study strongly supports to prioritize the allografting in CR1 regardless of donor type, i.e. alloHCT should be regarded as the urgency in CR1 in this subset of AML patients.

### **P26/2956. NERVOVĚ-SVALOVÉ NEŽÁDOUCÍ PROJEVY TYROZINKINÁZOVÝCH INHIBITORŮ V LÉČBĚ PACIENTŮ S CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMIÍ - ZKUŠENOSTI JEDNOHO CENTRA**

**Rudnay M., Žáčková D., Zmoraj V., Adamová B., Semerád L., Weinbergrová B., Ráčil Z., Mayer J.** (Interní hematologická a onkologická klinika Fakultní nemocnice Brno; Neurologická klinika Fakultní nemocnice Brno, Středoevropský technologický institut (Central European Institute of Technology - CEITEC), Masarykova univerzita, Brno)

Zavedení tyrozinkinázových inhibitorů (TKI) do léčby pacientů s chronickou myeloidní leukémií (CML) zásadním způsobem zlepšilo prognózu těchto nemocných. Vysoce účinná terapie TKI však není prosta výskytu nežádoucích účinků (NŮ). Jedněmi z nejčastějších jsou nervově-svalové projevy, charakteru svalových bolestí, křečí či slabosti. Provázejí zejména léčbu imatinibem (u více než 50 % pacientů). Třebaže dosahují spíše mírné či střední intenzity, mohou významně narušit kvalitu života pacientů. Jejich patogeneze nebyla dosud objasněna. Cíl. Prospektivně analyzovat

nervově-svalové NŮ léčby imatinibem a nilotinibem včetně detailního laboratorního rozboru ve snaze objasnění jejich podstaty. Metody. Pacienti s CML léčení imatinibem nebo nilotinibem v první linii byli před zahájením terapie a dále v jejím průběhu (v měsíci 1 a 3 od zahájení terapie, následně á 3 měsíce) podrobeni důkladnému klinickému (anamnéza, popis a stanovení tíže svalových projevů dle CTCAEv4.03, myodynamické testy – dřep a stand-up test) a laboratornímu vyšetření s důrazem na ukazatele svalového postižení, tj. kreatinínázu (CK) a myoglobin (Mb), iontogram v séru i moči (Ca, Mg, P) a vybrané hormony (PTH, fT4 a TSH). Výsledky. V období 3/2012 – 1/2014 bylo do projektu zařazeno 59 pacientů s nově zjištěnou CML (30 žen a 29 mužů, mediánu věku 60 let; rozmezí 22 – 90). Léčba imatinibem byla zahájena u 32 a nilotinibem u 27 pacientů. Svalové potíže se vyskytly u 19 (59,4 %) pacientů léčených imatinibem (slabost/křeče/bolesti u 2/14/3 pacientů) a u 8 (29,7 %) pacientů léčených nilotinibem (slabost/křeče/bolesti u 0/7/1 pacienta). Pouze u 3 pacientů léčených imatinibem a 1 léčeného nilotinibem byly obtíže stupně 3 závažnosti. Podíl pacientů s obtížemi u obou přípravků v průběhu sledovaného období narůstal. Myodynamické testy nebyly v průběhu léčby ani jedním z preparátů významně alterovány. Léčba imatinibem byla provázena signifikantním vzestupem CK oproti vstupním hodnotám (Tabulka), přičemž pouze ve 3 případech dosahoval stupně 2 závažnosti. Významný byl i pokles v koncentraci sérového magnézia v celém průběhu sledování. Pokles hladiny fosfátu dosahoval statistické významnosti pouze v měsíci 1, zatímco při léčbě nilotinibem jsme zaznamenali časný nástup poklesu hladiny fosfátu a její setrvalý charakter ve smyslu trvajících signifikantního poklesu oproti vstupním hodnotám, a to i přesto, že 6 (22 %) pacientů bylo v průběhu terapie nilotinibem substituováno p.o. přípravky fosfátu. Změny v koncentraci kreatinínázy, sérového Ca a Mg v průběhu léčby nilotinibem nabývaly spíše hraniční významnosti, a to jen v některých časových milnících (Tabulka). Zajímavým zjištěním byl významný vzestup koncentrace parathormonu ve 3. měsíci léčby oběma přípravky, zatímco koncentrace TSH a fT4 nejevila významného rozdílu oproti vstupním hodnotám. Léčba ani jedním z přípravků nebyla provázena významnými změnami v odpadech sledovaných iontů v moči. Závěr. I přes statisticky významné odchylky některých sledovaných parametrů potenciálně souvisejících s nervově-svalovými NŮ TKI se ukázalo, že změny v naprosté většině případů nedosahují klinického významu ve smyslu dosažení stupně 2 a více dle CTCAE. Samotné nervosvalové NŮ, které převažovaly ve skupině léčené imatinibem, ne-

Tabulka. Vývoj laboratorních parametrů v průběhu léčby imatinibem a nilotinibem

	Start (M0) Median (rozmezí)	n	M1 Median (rozmezí)	n	P (proti startu)	M3 Median (rozmezí)	n	P (proti startu)	M6 Median (rozmezí)	n	P (proti startu)	M9 Median (rozmezí)	n	P (proti startu)	M12 Median (rozmezí)	n	P (proti startu)	M15 Median (rozmezí)	n	P (proti startu)	M18 Median (rozmezí)	n	P (proti startu)
<b>Imatinib (N = 32)</b>																							
CK (ukat/l)	1,15 (0,41 – 6,20)	26	1,7 (0,81 – 5,02)	28	0,08	2,47 (0,69 – 3,85)	26	<0,01	2,79 (0,95 – 7,73)	28	<0,01	2,49 (1,28 – 6,53)	23	<0,001	3,07 (1,49 – 8,96)	17	<0,001	3,71 (1,20 – 8,02)	11	<0,01	3,96 (2,43 – 7,35)	12	<0,0001
MyoGb (µg/l)	36,1 (21 – 100,3)	25	29,7 (21 – 162)	27	0,51	38 (21 – 80,7)	26	0,77	36,1 (21 – 69,8)	26	0,91	37,9 (<20 – 382,2)	24	0,23	36,7 (21 – 85,2)	16	0,53	35,4 (25,2 – 93,3)	12	0,54	36,9 (21,9 – 101,0)	11	0,66
Ca (mmol/l)	2,36 (2,05 – 2,78)	28	2,27 (2,0 – 2,55)	28	0,21	2,26 (2,09 – 2,46)	24	0,12	2,28 (2,11 – 2,51)	29	0,27	2,32 (2,13 – 2,46)	26	0,49	2,25 (2,16 – 2,45)	19	0,22	2,25 (2,06 – 2,45)	15	0,31	2,35 (2,13 – 2,53)	15	0,75
Mg (mmol/l)	0,85 (0,6 – 1,0)	28	0,82 (0,7 – 0,95)	30	0,02	0,8 (0,61 – 0,94)	29	0,01	0,82 (0,66 – 1,03)	29	0,02	0,86 (0,64 – 0,92)	26	0,02	0,78 (0,67 – 0,98)	19	<0,01	0,77 (0,71 – 0,9)	15	<0,01	0,79 (0,69 – 0,88)	15	<0,01
P (mmol/l)	1,22 (0,7 – 1,71)	26	0,9 (0,48 – 1,34)	29	<0,01	0,94 (0,46 – 1,19)	27	0,24	0,9 (0,56 – 1,41)	29	0,32	0,9 (0,44 – 1,28)	26	0,42	0,87 (0,41 – 1,30)	19	0,31	0,87 (0,45 – 1,21)	15	0,42	0,89 (0,48 – 1,32)	15	0,35
PTH (pmol)	4,50 (1,6 – 6,6)	21	NA	NA	NA	6,9 (2,8 – 11,5)	25	0,001	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b>Nilotinib (N = 27)</b>																							
CK (ukat/l)	1,18 (0,39 – 6,58)	21	1,30 (0,39 – 4,86)	24	0,83	1,57 (0,39 – 5,62)	23	0,42	1,98 (0,89 – 6,08)	17	0,02	2,74 (0,86 – 5,55)	13	0,02	3,47 (0,77 – 5,07)	14	<0,01	2,07 (1,14 – 6,04)	8	0,17	2,54 (1,44 – 7,55)	6	0,03
MyoGb (µg/l)	33 (21 – 52,4)	18	30,7 (21 – 90,1)	22	0,52	30,8 (21 – 70,9)	19	0,47	38,9 (21 – 92,3)	16	0,21	2,3 (2,2 – 2,48)	14	0,94	50,9 (21 – 116,8)	12	0,05	37 (21 – 50,0)	8	0,81	51,45 (23 – 60,4)	6	0,08
Ca (mmol/l)	2,35 (2,16 – 2,55)	26	2,29 (2,14 – 2,47)	25	0,04	2,31 (2,13 – 2,48)	25	0,04	2,36 (2,16 – 2,57)	19	0,77	2,3 (2,2 – 2,48)	14	0,94	2,34 (2,19 – 2,54)	15	0,98	2,36 (2,3 – 2,5)	10	0,21	2,45 (2,28 – 2,56)	7	0,11
Mg (mmol/l)	0,85 (0,78 – 0,96)	26	0,83 (0,63 – 1,08)	25	0,28	0,84 (0,7 – 0,92)	26	0,04	0,82 (0,71 – 0,91)	20	<0,01	0,85 (0,72 – 0,96)	14	0,29	0,84 (0,79 – 1,14)	15	0,88	0,84 (0,71 – 1,05)	10	0,45	0,79 (0,73 – 0,91)	7	0,05
P (mmol/l)	1,16 (0,71 – 1,39)	23	0,9 (0,59 – 1,25)	24	<0,00001	0,92 (0,36 – 1,24)	24	<0,0001	0,86 (0,56 – 1,21)	20	<0,00001	0,86 (0,51 – 1,06)	14	<0,0001	0,85 (0,59 – 1,1)	15	<0,00001	0,94 (0,8 – 1,47)	10	0,02	0,91 (0,57 – 1,27)	7	<0,01
PTH (pmol)	3,50 (1,9 – 5,9)	14	NA	NA	NA	7,2 (4,99 – 12,1)	16	<0,00001	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

byly závažného charakteru a u žádného z pacientů si nevytýkaly změnu na jiný preparát. Otázka významu vzestupu hladiny parathormonu při léčbě oběma přípravky a též hypofosfatémie dominantně po nilotinibu, přetrvávající v průběhu celého sledování i přes léčebnou substituci bude předmětem dalšího výzkumu.

**P27/2917. ANALÝZA DÉLKOVÝCH POLYMORFISMŮ AMPLIFIKOVANÝCH DNA FRAGMENTŮ ASOCIOVANÝCH S CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKÉMIÍ V KOMBINACI S NGS ODHALILA POLYMORFISMY V REPETITIVNÍCH OBLASTECH A V LOKUSECH SPJATÝCH SE VZNIKEM RAKOVINY**

**Koblihová J., Šrůtová K., Jarušková M., Klamová H., Machová Poláková K. (Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha)**

Genetické predispozice a molekulární mechanismy vzniku chronické myeloidní leukémie (CML) a rezistence na léčbu inhibitory tyrozinkináz (TKI) jsou celosvětově předmětem intenzivního zájmu. Vysokokapacitní techniky, jako je sekvenování nové generace (NGS) umožňující celogenomové analýzy, mají své limity v náročném bioinformatickém zpracování a vyhod-

nocení velkého množství získaných dat. V této práci jsme s využitím kombinace vysoce reprodukovatelné metody AFLP (amplifikace délkových polymorfismů) a NGS analyzovali CML genomy a identifikovali tak polymorfni oblasti asociované s onemocněním a rezistencí k imatinibu (IM). AFLP analýzy byly provedeny u 65 pacientů léčených IM v první linii (39 pacientů s optimální odpovědí; 26 pacientů se selháním léčby) a 30 zdravých dárců; pro potvrzovací analýzy Sangerovým sekvenováním bylo přidáno dalších 30 kontrol. Věkový medián pacientů byl 55 let (rozsah 18-84 let). AFLP analýzy byly provedeny s použitím restričních endonukleáz MseI a EcoRI a komerčně dodávaných kitů a protokolů. Fragmentační analýza probíhala na sekvenátoru ABI PRISM 3130. Délky DNA fragmentů byly odečítány v GeneMapperu. Četnost DNA fragmentů mezi pacienty a zdravými dárci byla počítána pomocí exaktního binomického testu. Devět vybraných fragmentů bylo dále charakterizováno pomocí NGS a získaná data byla hodnocena v NextGENU. Polymorfismy v identifikovaných fragmentech byly potvrzeny Sangerovým sekvenováním. AFLP analýzy celkově poskytly 3912 AFLP markerů/DNA fragmentů diverzifikovaně se vyskytujících napříč souborem pacientů a zdravých jedinců, z čehož 199 fragmentů bylo významně spjata s onemocněním a 5 s odpovědí na

léčbu IM. Pomocí NGS jsme charakterizovali 7 lokusů spojených s CML a 2 s odpovědí na léčbu IM. Fragment CAC\_ACC\_25, u kterého jsme potvrdili SNP rs113864098 (C/T) odpovědné za vznik EcoRI restričního místa, se nachází na chromosomu 1 a je součástí LIMC1 a AluSz repetitivních elementů. Významně vyšší četnost alely rs113864098-T byla nalezena v kohortě pacientů (60 %) oproti zdravým kontrolám (13 %;  $P = 0,016$ ). U fragmentu CAT\_ACC\_54, lokalizovaném na chromosomu 10 mezi geny NRAP a CASP7SNP, bylo potvrzeno SNP rs7906704 (G/T), které dává vznik novému MseI restričnímu místu. Četnost minoritní alely rs7906704-T byla významně vyšší u CML pacientů (38 %;  $P = 0,04$ ) v porovnání se zdravými kontrolami. Podle Li et al. (2012) má lokus rs7906704 vliv na apoptotickou dráhu v tumorigenezi pankreatu. Dále jsme identifikovali fragment CTT\_ACA\_57, který se významně vyskytoval u pacientů s optimální odpovědí na IM (65 %) oproti pacientům, kterým léčba selhala (19 %;  $P = 0,03$ ). Tento fragment je součástí satelitní sekvence ALR/ALPHA vyskytující se v centromerních oblastech chromosomů s největší četností přiřazení sekvence na chromosomu 5. Genomové aberace v tomto satelitu byly nalezeny u chronické lymfocytární leukémie (Kim et al., 2010). V této práci jsme použili celogenomovou fragmentační analýzu a NGS k nalezení polymorfismů v DNA, které jsou asociované s CML a odpovědí na léčbu IM. Podařilo se nám identifikovat a potvrdit dvě SNP významně spjaté s CML a 1 polymorfismus v repetitivní oblasti asociovaný s odpovědí na léčbu IM. Kombinace AFLP/NGS představuje vhodný postup pro identifikaci lokusů v genomu pacientů spjatých s CML, ale i dalších onemocnění, jako vhodné alternativy k celogenomovému sekvenování. Podporováno projektem IGA MZ ČR NT11555 a projektem 00023736.

## **P29/2892. ÚSPĚŠNÁ DLOUHODOBÁ TERAPIE PONATINIBEM U PACIENTA S CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMIÍ V CHRONICKÉ FÁZI S VÝVOJEM MUTACÍ T315I A MUTACEMI Y253HWT A L364FWT PO II. LINII LÉČBY**

**Černá O. (IHK FNKV, Praha)**

Chronická myeloidní leukémie je raritní hematologické maligní onemocnění, které se řadí do skupiny myeloproliferativních onemocnění. Diagnosticky je charakterizována přítomností Ph chromosomu s translokací mezi chromosomy 9 a 22 a vznikem fúzního genu BCR-ABL. Tento poznatek vedl k vývoji tyrosinkinázových inhibitorů. Zavedení tyrosinkinázových inhibitorů do terapie chronické myeloidní leukémie znamenalo převrat v léčbě tohoto onemocně-

ní. Imatinib, tyrozinkinázový inhibitor první generace, je stále zlatým standardem v léčbě chronické fáze CML. Tímto se výrazně zlepšila prognóza pacientů a jejich celkové přežití je téměř srovnatelné s přežitím populace bez CML. U 25-30 % pacientů však dochází k selhání léčby, vzniku resistance, a to nejčastěji na podkladě vzniku mutací v kinázové doméně. Řada mutací je citlivá na TKIs druhé generace: nilotinib, dasatinib a bosutinib, apod. Mutace T 315I je však většinou na tyto preparáty resistantní. Ponatinib je tyrosinkinázový inhibitor 3. generace. Navozuje dle řady studií i klinického sledování v reálném životě vysoké procento hematologických, cytogenetických i molekulárně genetických odpovědí u pacientů předléčených více liniemi léčby, zejména v chronické fázi CML, a to s výskytem multiresistentní mutace T 315I i bez ní. Terapie tímto lékem může být spjata s rizikem rozvoje arteriálních trombóz. Výskyt těchto komplikací je v 17-27 % v průběhu 3 let. To je však do značné míry závislé na dávce, se snížením dávky se vznik těchto komplikací snižuje. Je nutné pečlivé a cílené sledování pacientů stran výskytu kardiovaskulárních komplikací. Kasuistika: 70ti letý muž, u kterého byla ve věku 64 let diagnostikována chronická myeloidní leukémie v chronické fázi s typem transkriptu b3a2 a vysokým rizikovým Sokalovým, Hasfordovým i EUTOS skóre. Po iniciální cytoredukci hydroxyureou pro hyperleukocytózu byla zahájena terapie I. linie imatinibem. Pro suboptimální efekt léčby po 13 měsících pokračoval pacient terapií II. linie nilotinibem se stabilní hlubokou molekulární remisí. Po 13 měsících byla mutační analýzou při nárůstu transkriptu BCR-ABL prokázána mutace T315I. Došlo postupně ke ztrátě molekulární, cytogenetické i hematologické remise i po vysazení tyrosinkinázových inhibitorů a při terapii maximálními dávkami INF. Byl zaznamenán až vývoj v akcelerované fázi CML s nutností kombinace s HU a krátkodobě s dasatinibem. V tomto období byla zahájena terapie ponatinibem s iniciální dávkou 30 mg na den a při cytopenii byla dávka ještě přechodně krátce snižována. Dále pokračoval dávkou 30 mg a při normalizaci krevního obrazu byla léčba plně dávkována na 45 mg. Při této dávce se objevila dermatologická toxicita grade 2. Dále byla proto ponechána při průběžném poklesu transkriptu BCR-ABL dávka 30 mg na den. Terapie byla velmi dobře tolerována, bez ischemických komplikací či jiných projevů toxicity. Pacient dosáhl opět kompletní hematologické, cytogenetické a i velké molekulární remise dle monitorace BCR-ABL. Mutace T 315I však persistuje. Toto kazuistika dokumentuje velice úspěšnou a dobře tolerovanou terapii ponatinibem, bez výskytu vážnějších komplikací léčby. Toto je podmíněno pravidelným sledováním pacienta, úpra-

vou dávkování a event. konkomitantní profylaktickou terapií vzniku ischemickým komplikací. Terapie ponatinibem (Iclusigem) patří nyní dle SPC mezi terapie

2. a 3. generace u pacientů CP CML. Úhrada je zatím dostupná na základě žádosti dle paragrafu 16 u zdravotní pojišťovny.

## TRANSPLANTACE

### **P30/2965. PRVNÍ AUTOLOGNÍ PODÁNÍ PROMYTÝCH HEMATOPOETICKÝCH KMENOVÝCH BUNĚK (HSC) POMOCÍ SEPAX 2 PACIENTOVI S TĚŽKÝM POŠKOZENÍM LEDVIN**

**Adamusová L., Kořístek Z., Smejkalová J., Vrublová P., Grebeníček L., Michalíková M., Hájek R. (Klinika hematookologie, Fakultní nemocnice Ostrava; Lékařská fakulta, Ostravská univerzita, Ostrava)**

Úvod: Plně automatizovaný přístroj Sepax 2 (Biosafe, Švýcarsko) patří mezi nejmodernější systémy používané pro promytí kryoprezervovaných hematopoetických kmenových buněk (HSC). Díky specificky vytvořenému programu SmartWash dochází k efektivnímu promytí transplantátu s minimálním vlivem na kvalitu a počet převáděných progenitorů krvetvorby. Promývání transplantátů s sebou přináší mnohé výhody pro pacienta: odstranění DMSO a toxicity s ním spojené, snížení objemu podávaných transplantátů, možnost podání transplantátu bez nutnosti využít centrální žilní katetr, výrazné snížení toxicity pro pacienty s renálním selháním. Kazuistika: Jedná se o 43letého pacienta, u něhož byla v roce 2011 diagnostikována amyloidóza s vícečetným postižením orgánů (ledviny – těžký nefrotický syndrom 15 g/l a renální insuficience, srdce, rektum, játra, polyneuropatie). V době indikace vysokodávkované chemoterapie s autologní transplantací HSC byl nemocný po 3 liniích léčby (VMP, tedy bortezomib, melfalan, prednison; CD, tedy cyklofosamid, dexametazon; RD, tedy lenalidomid, dexametazon), kterou absolvoval na jiném pracovišti, nemoc i přesto progredovala. Pacient v té době již s terminálním renálním selháním s anurií, v chronickém dialyzačním programu. Transplantát získán po mobilizaci G-CSF 10 µg/kg/den, pro nedostatečné vyplavování (poor mobilizer) nutné posílení mobilizace plerixaforem. Během 4 aferéz získán bezpečný transplantát, celkem 2,07x10x6 CD34+ buněk/kg, z technických důvodů (koncentrace

leukocytů) bylo nutné transplantát zamrazit v celkem 12 kryovacích. Před vysokodávkovanou chemoterapií ještě podány 4 cykly VTD (bortezomib, thalidomid, dexametazon). V říjnu 2015 byl za plné podpůrné péče podán melfalan v dávce 100 mg/m<sup>2</sup> (redukce s ohledem na renální selhání). Prvních 6 vaků s transplantátem (celkem 1,13x10x6 CD34+ buněk/kg) bylo podáno ve dvou dnech, vždy s následnou dialýzou, a bylo provázené polymorfními nežádoucími účinky, z nichž většinu bylo možné připsat toxicitě DMSO: kolísání tlaku, dráždění v krku, pachuť v ústech, bušení srdce, svírání na prsou, slabost a teplota. Zbytek transplantátu, 0,94x10x6 CD34+ buněk/kg, obsažený v celkem 6 kryovacích bylo se souhlasem pacienta promyto bez komplikací pomocí přístroje Sepax 2. Výsledkem bylo odstranění DMSO a významná redukce objemu transplantátu, ze 720 ml na 200 ml. Podání promytého transplantátu se obešlo bez projevů nežádoucích účinků DMSO a bylo velmi dobře tolerováno. Další potransplantačním průběh nebyl zatížen významnými komplikacemi, restituce krvetvorby byla rychlá a úplná (leukocyty > 1x10x9/l den +11, granulocyty > 0,5x10x9/l den+12, trombocyty > 20x10x9/l bez substituce den +14). Závěr: V průběhu roku 2015 byla na našem pracovišti zavedena moderní metoda promývání rozmražených hematopoetických kmenových buněk pomocí přístroje Sepax 2. Validace potvrdily, že se jedná o metodu účinnou a spolehlivou co se do zachování množství a vitality hematopoetických progenitorů týče. Vzápětí se nám naskytla možnost si výhody této metody ověřit i v praxi u prvního pacienta, kterému jsme promyté transplantáty mohli podat. Zdravotní stav pacienta, zejména jeho významné poškození ledvin, bylo první indikací k co možná největší snaze o snížení zatížení ledvin a celého organismu několika násobnými transplantacemi. Díky přístroji Sepax 2 jsme toho mohli docílit jak významným snížením objemu podávaného transplantátu, tak odstraněním toxického vlivu DMSO, bez toho aniž bychom ovlivnili kvalitu podávaného autologního štěpu.