

2931. LABORATOŘE TRANSFUZNÍHO ODDĚLENÍ FAKULTNÍ NEMOCNICE OLOMOUC- HISTORICKÉ OHLÉDNUTÍ

Galuszková D. (Transfuzní oddělení, FN, Olomouc)

Transfuzní oddělení Fakultní nemocnice Olomouc má více než šedesátiletou tradici. Svoji činnost zahájilo v dubnu roku 1949. Imunohematologické laboratoře transfuzního oddělení tvoří základ pro rozvoj řady oborů, které se bez hemoterapie neobejdou. Patří k nim určité chirurgické obory, zejména traumatologie, kardiokirurgie, ale i interní obory jako hematologie, gastroenterologie. Samostatný obor transfuzního lékařství vznikl po objevení krevních skupin, jednoho z nejvýznamnějších objevů v historii medicíny. Samotné počátky imunohematologie jsou spojeny se jménem českého psychiatra Jana Jánského, který v roce 1907 publikoval práci, v níž představil systém čtyř krevních skupin I-IV. V současné době známe již přes 300 erytrocytárních antigenů, jejichž klinický význam je dán jejich protilátkami. Významné klinické protilátky jsou ty, které jsou schopné způsobit destrukci erytrocytů nesoucích daný antigen a tím zhoršit zdravotní stav pacienta. Naše laboratoře se věnují diagnostice erytrocytárních antigenů a jejich protilátek k přípravě bezpečné hemoterapie, ale i erytrocytární aloimunizaci v těhotenství. Při svém vzniku se prováděly serologické testy ve zkumavkách, vizuálně se hodnotila síla reakce, která vznikla mezi antigeny na červených krvinkách a protilátkami v séru. Novinkou byly mikrotitrační destičky, na které se ručně kapalo ... sérum pacienta. V roce 1998 se nainstaloval rozplňovací automat KEMBLE Guardian SP II, který umožnil automatické rozplnění diagnostických sér a krevních vzorků. Součástí byla

jednotka k odečítání krevních skupin na mikrotitračních plotnách. Od roku 2001 používáme k serologickým testům metodu sloupcové aglutinace. Plná automatizace diagnostických procesů byla zahájena v roce 2007, kdy oddělení získalo analyzátor WADiana Compact firmy Grifols. Analyzátor, využívající systém sloupcové aglutinace DG gel, samostatně rozkapával vzorky i diagnostika za použití čárových kódů, analyzoval, vyhodnocoval, dokumentoval a on-line přesouval výsledky do informačního systému transfuzního oddělení. Maximální kapacita byla 48 krevních vzorků a vyšetřovací cyklus trval při maximálním zatížení 1,5 hodiny. Spektrum vyšetření, které se provádělo na analyzátoru, obsahovalo vyšetření krevních skupin, screening protilátek, zkoušky kompatibility a identifikace protilátek. V dubnu 2008 byl pořízen na oddělení plně automatizovaný imunohematologický analyzátor Techno Twin Station. Analyzátor využívá současně ID-karty a tři mikrotitrační destičky. Zavedením analyzátorů do rutinního provozu laboratoří došlo k redukci manuální práce, odpadlo popisování zkumavek a karet a tím se významně omezila psaná dokumentace, minimalizoval se vliv lidského faktoru na proces vlastního zpracování; vyhodnocení a přenos dat probíhá on-line. Celý proces se významně standardizoval. Zároveň došlo ke zvýšení bezpečnosti personálu, jelikož se významně omezil kontakt zaměstnanců s potenciálně infekčním materiálem. Mezi významná omezení serologických vyšetřovacích metod patří výsledky u polytransfundovaných, silně pozitivních PAT pacientů a diagnostika zeslabených, variantních a vzácných antigenů. Novým trendem je genetická analýza erytrocytárních a destičkových antigenů, která je ale mnohem náročnější finančně i časově.

MYELOYDYSPLASTICKÝ SYNDROM/ MYELOPROLIFERATIVNÍ ONEMOCNĚNÍ

2951. LÉČBA PH NEGATIVNÍCH MYELOPROLIFERATIVNÍCH NEOPLÁZIÍ V ROCE 2016

Weinbergerová B., Bělohlávková P., Ráčil Z., Mayer J. (Interní hematologická a onkologická klinika, LF MU a FN, Brno; IV. Interní hematologická klinika, LF UK a FN, Hradec Králové)

Úvod: Ph negativní myeloproliferativní neoplázie je skupina onemocnění hematopoetické kmenové buňky charakterizovaná následnou aberantní proliferací gra-

nulocytární a/nebo erytrocytární a/nebo megakaryocytární linie a zvýšeným rizikem kardiovaskulárních komplikací, progresí do myelofibrózy nebo leukémie. Mezi nejčastější, tzv. klasické, Ph negativní myeloproliferativní neoplázie patří 3 klinické jednotky: pravá polycytémie, esenciální trombocytémie a primární myelofibróza. V roce 2011 vydala Evropská leukemická síť doporučení pro jejich diagnostiku a léčbu. Cílem léčby Ph negativních myeloproliferativních neoplázií je primárně snížení rizika trombotických komplikací bez navýšení rizika krvácení a hematologické progresie.

Sekundárním cílem je zmírnění ostatních průvodních příznaků (manifestace vazomotorických poruch, splenomegalie a jiných). Mezi obecná doporučení patří redukce nadváhy, abstinence kouření, tělesný pohyb, kontrola krevního tlaku, glykémie a metabolismu tuků. Léčba pravé polycytémie a esenciální trombocytémie: Věk > 60 let a trombotická událost v anamnéze tvoří kritéria rozdělující pacienty s pravou polycytémií a esenciální trombocytémií do nízkorizikové skupiny pro rozvoj trombotických komplikací. Mezi další rizikové faktory někteří autoři řadí přítomnost mutace v Janusově kináze 2 (JAK2), kardiovaskulární rizikové faktory a jiné vrozené či získané trombofilní stavy (např. faktor V Leiden, mutace protrombinu 20210A a jiné). Základní doporučení pro léčbu nízkorizikových pacientů s pravou polycytémií jsou nízkodávkovaná acetylsalicylová kyselina (LD ASA) a venepunkce a pro vysokorizikové pacienty navíc cytoredukční léčba hydroxyureou a/nebo interferonem alfa v 1. linii. V poslední době je možno vysokorizikové pacienty s pravou polycytémií neodpovídající na léčbu hydroxyureou nebo netolerující tento přípravek léčit JAK2 inhibitory, ruxolitinibem, s vysokou efektivitou ve zmírnění konstitučních symptomů (event. splenomegalie). Pro léčbu nízkorizikových pacientů s esenciální trombocytémií je indikována LD ASA a pro vysokorizikové pacienty navíc cytoredukční léčba hydroxyureou v 1. linii. Pacienti s esenciální trombocytémií ve vysokém riziku neodpovídající na léčbu hydroxyureou nebo netolerující tento přípravek mohou být v 2. linii léčeni anagrelidem. V České Republice je možné použít anagrelid u vysokorizikových pacientů s esenciální trombocytémií již v 1. linii. Léčba myelofibrózy: Jedinou léčbu s kurativním potenciálem představuje u pacientů s myelofibrózou (primární myelofibrózou a myelofibrózou po pravé polycytémii nebo esenciální trombocytémií) v současnosti pouze alogenní transplantace krvetvorných buněk, nicméně vzhledem k vysokému riziku komplikací s ní spojených je nutná pečlivá selekce vhodných kandidátů. Obecně je alogenní transplantace krvetvorných buněk rezervována pro pacienty ve středním-2 a vysokém riziku podle tzv. prognostických skórovacích systémů založených na přítomnosti negativních rizikových faktorů. V poslední době se nabízí také možnost léčby JAK2 inhibitory, ruxolitinibem, s dobrým efektem na zmenšení splenomegalie a zmírnění konstitučních symptomů u pacientů s myelofibrózou. Ostatní léčebné modalit (hydroxyurea, busulfan, interferon alfa, erytropoézu stimulující léky, androgeny, imunomodulační léky, ozáření sleziny a splenektomie) jsou převážně paliativní, většinou pouze přechodně zmírňující symptomy onemocnění.

2907. ŽILNÍ TROMBOTICKÉ KOMPLIKACE PH NEGATIVNÍCH MYELOPROLIFERATIVNÍCH CHOROB

Palová M., Hluší A., Indrák K., Szotkowski T., Papajík T. (Hemato-onkologická klinika, Olomouc)

Úvod:

Do skupiny Ph negativních myeloproliferativních nemocí (Ph- MPN) patří pravá polycytémie (PV), esenciální trombocytémie (ET) a primární myelofibróza (PMF). Žilní trombózy jsou jedny z nejzávažnějších komplikací, které nepříznivě ovlivňují kvalitu i délku života těchto nemocných.

Epidemiologie:

Reálný výskyt významných trombotických komplikací je těžko stanovitelný díky heterogenitě metodiky a výběru pacientů jednotlivých studií. Popisovaná celková incidence trombotických příhod (arteriálních i venózních) je 5,5/100 pacientoroků u PV, 1-3/100 pacientoroků u ET a 2/100 pacientoroků u PMF. Ve třetině případů se jedná o trombózy venózní s incidencí 0,7% - 1,3% pacientoroků u PV a 0,5% - 1,2% pacientoroků u ET. Pro srovnání roční incidence žilního tromboembolismu (TEN) v obecné populaci se udává mezi 0,1% až 0,2%. Riziko rekurence trombózy u Ph- MPN po ukončení antikoagulační léčby je vysoké, pohybuje se mezi 33-42% a ve věku nad 60 let je riziko rekurence 1,7 krát vyšší než u mladších nemocných. Hlavním terapeutickým cílem u PV a ET je snížení rizika trombózy či krvácení. U PMF je tato problematika poněkud zastíněna rizikem leukemické transformace a komplikacemi vyplývajícími z cytopenie, nicméně frekvence trombotických komplikací je minimálně srovnatelná s ET.

Patogeneze:

Patogeneze trombóz u pacientů s Ph- MPN je komplexní a souvisí nejen s kvantitativními, ale také s kvalitativními změnami klonálních buněk. Jedním z hlavních faktorů v patogenezi trombózy je trvale zvýšená aktivace trombocytů, vyúsťující ve vyšší expresi P selektinů, tkáňového faktoru, vyšší generaci trombinu, zvýšeným uvolňováním trombocytárních a endoteliálních mikropartikulí – protrombogenních fragmentů buněčných membrán uvolněných po aktivaci buněk. Také zvýšené množství tzv. retikulárních (nezralých) trombocytů u ET v krvi je asociováno s vyšším rizikem trombózy. U PV zvyšují riziko trombózy hyperviskozita krve a kvalitativní změny membrány erytrocytů vedoucí k tvorbě jejich agregátů. V neposlední řadě se může na patogenezi podílet přítomnost přídatných vrozených a získaných trombofilních stavů (Leidenské mutace ge-

nu faktoru V (G1691A), mutace protrombinového genu G20210A, deficitu antitrombinu, proteinu C a proteinu S). Získaný trombofilní stav asociovaný s Ph-MPN je multifaktoriální etiologie. Vyplývá nejen z protrombogenního fenotypu cirkulujících buněk MPN klonu, ale také z imunitní odpovědi hostitele na přítomnost nádorového klonu se zvýšenou produkcí zánětlivých cytokinů s následnou aktivací leukocytů a endotelu.

Riziková stratifikace a léčba:

Riziková stratifikace nemocných s PV a ET se opírá o přítomnost nebo chybění rizikových faktorů pro trombózu. Jednoznačnými nezávislými rizikovými faktory jsou věk nad 60 let a pozitivní anamnéza trombózy, dále obecné kardiovaskulární rizikové faktory (kouření, diabetes, hypertenze), pozitivní mutační stav JAK2V617F. Význam leukocytózy je třeba validovat v prospektivních studiích. Samotná trombocytémie je jako rizikový faktor stále kontroverzní.

Naproti tomu extrémní trombocytóza (nad 1000 až 1500x10⁹/l) je spojována s vyšším rizikem krvácení, zejména při současné medikaci kyselinou acetylsalicylovou (ASA). Tento fenomén je vysvětlován získaným von Willebrandovým syndromem.

Hlavním léčebným cílem u PV a ET je minimalizace výskytu dlouhodobých s chorobou spojených komplikací, především trombotických, které jsou například nejčastější příčinou smrti u PV. V rámci primární prevence trombotických komplikací je u všech pacientů s PV indikována nízké dávkovaná ASA spolu s kontrolou hematokritu pomocí venepunkce nebo erytrocytaferézy s cílovou hodnotou hematokritu $\leq 45\%$ u mužů a $\leq 42\%$ u žen. Podkladem účinnosti venepunkce je navození relativní či absolutní deficit železa - jeho suplementace v těchto případech je kontraproduktivní. U vysoce rizikových pacientů (starší 60-ti let, anamnéza trombózy) je indikována také cytoredukční léčba.

Trombotické komplikace u nízké rizikových pacientů s WHO definovanou ET jsou poměrně vzácné, srovnatelné s jejich výskytem v obecné populaci. Přínos ASA je u této skupiny nejasný, s výjimkou nemocných s přítomností kardiovaskulárních rizik, gravidity či přítomností vasomotorických symptomů (bolesti hlavy, vertigo, erytromelalgie, livedo reticularis, akrální parestezie atd.), v jejichž prevenci a léčbě je nízké dávkovaný aspirin efektivní. U vysoce rizikových pacientů s ET je indikována cytoredukce spolu s antiagregační léčbou. U všech nemocných s Ph-MPN je kladen důraz na redukci nadváhy, abstinenci kouření, kontrolu krevního tlaku, glykémie a metabolismu lipidů.

Optimální dávkovací režim ASA u ET není zcela přesně znám. Zatímco u zdravých jedinců nízké dávkovaný

aspirin jednou denně dostatečně inhibuje trombocytární cyklooxygenázu-1 (COX-1) a tím syntézu tromboxanu A₂ (TXA₂), tak stejný dávkovací režim není schopen plně inhibovat produkci TXA₂ u asi 80% pacientů s ET. Důvodem může být rychlejší obnova COX-1 díky zvýšenému obratu trombocytů u ET se vznikem mladých trombocytů s intaktní aktivitou COX-1 během 24hodinového dávkovacího intervalu. Tento předpoklad je podporován průkazem zlepšení odpovědi na ASA při dávkovacím intervalu dva krát denně, klinický benefit zatím ale nebyl ve studiích dostatečně testován. V případě zjištěné aspirinové rezistence je možno zvážit právě užití dávkovacího intervalu dva krát denně či změnu za alternativní antiagregans (např. clopidogrel).

Pacienti s Ph-MPN a prodělanou žilní trombózou jsou indikováni k dlouhodobé antikoagulační léčbě snižující riziko rekurence žilní trombózy. Optimální délka antikoagulační léčby není zatím jednoznačně stanovena a u některých nemocných bude nutno uvažovat i o doživotní antikoagulační léčbě. Na druhou stranu je potřeba brát v úvahu také zvýšené riziko krvácivých komplikací u nemocných s Ph-MPN, což mnohdy činí takové rozhodnutí v klinické praxi obtížným. V této souvislosti jsme realizovali retrospektivní analýzu 16 pacientů s diagnózou Ph-MPN (dle kritérií WHO 2008) sledovaných na naší klinice, u nichž byla objektivně verifikovaná žilní trombóza v letech 2004-2015. V devíti případech se jednalo o trombózu v atypické lokalizaci včetně splachnických žil (n=7). V době trombotické komplikace 11 nemocných splňovalo diagnostická kritéria pro PV, pět pro primární myelofibrózu. Medián věku pacientů v době příhody byl 57,5 let (26 - 72), medián počtu leukocytů 11,2x10⁹/l (6,9 - 30,9), medián počtu trombocytů 415x10⁹/l (142 - 1892), mutační stav JAK2V617F pozitivní (n=13), mutace v exonu 12 (n=1), CALR pozitivní (n=2). Přídavný trombofilní stav (kombinovaný vrozený trombofilní stav, přítomnost lupus antikoagulans) byl zjištěn u tří pacientů. Rekurence žilní trombózy po ukončení antikoagulační léčby byla prokázána u čtyř z šesti pacientů v mediánu 2 let. U nemocných s trvalou antikoagulační léčbou warfarinem byla zaznamenána recidiva ve dvou případech při neúčinném INR. Ve dvou případech vznikla žilní trombóza během účinné antikoagulační léčby, a to dabigatranem a LMWH. Výše popsaná skupina pacientů byla součástí recentní multicentrické studie s 206 pacienty s Ph-MPN a prodělanou žilní trombózou, jež ukázala, že riziko rekurence žilní trombózy po ukončení antikoagulační léčby v pěti letech bylo 42%, což je ve srovnání s non-MPN populací signifikantně vyšší. V 80% případů vznikla recidiva žilní trombózy ve stejné lokalizaci jako iniciální příhoda. Taktéž výskyt významných krváci-

vých komplikací během léčby antagonisty vitamínu K byl ve studiové kohortě pacientů mírně vyšší (2,4%) oproti non-MPN populaci.

Závěr:

V souladu s publikovanými daty je dlouhodobá anti-koagulace antagonisty vitamínu K efektivní ve snížení rizika rekurence trombotických komplikací. Avšak i přes dostupné léčebné možnosti zůstává riziko vzniku a rekurence trombózy relativně vysoké a je třeba dalších klinických studií s cílem zlepšení efektivity primární a sekundární prevence trombóz a přesnější identifikace rizikových nemocných. Vzhledem ke krvácivým komplikacím při medikaci warfarinem se otevírá možnost uplatnění, ale také potřeba ověření účinnosti a bezpečnosti nových antikoagulantů v této indikaci.

Podporováno grantem IGA-LF-2016-001.

2880. SYSTÉMOVÁ MASTOCYTÓZA, ZKUŠENOSTI JEDNOHO PRACOVIŠTĚ

Kozák T., Černá O., Gahérová L., Ticháková P., Vrbková K., Vernerová Z. (IHK, 3. LF UK a FN Královské Vinohrady, Praha; Ústav patologie, 3. LF UK a FN Královské Vinohrady, Praha)

Mastocyty bylo poprvé jako mezenchymální buňky popsány na konci 19. století Paulem Ehrlichem. WHO rozlišuje dle kliniky a laboratorních projevů 4 základní typy SM: indolentní SM, SM-AHNMD (s mastocytózou spojené hematologické klonální nemastocytární onemocnění), agresivní SM (ASM) a mastocytární leukémii (MaCL). Suspekce na diagnózu SM vzniká u pacientů s alergickými epizodami při trvale zvýšené hladině tryptázy a současnou UP a/nebo u pacientů s nejasnými kostními ložisky, UP a organomegalií nebo lymfadenopatií. Potvrzení diagnózy SM se opírá o histologický průkaz infiltrace tkáně atypickými mastocyty (nejčastěji kostní dřev - KD), podpořenou FACS a průkazem mutace c-kit D816V, event. cytogenetickým vyšetřením. Kromě parametrů krevního obrazu je k posouzení agresivity onemocnění vhodné provést RTG skeletu a zobrazovací vyšetření hrudníku a břicha (CT) k odhalení organomegalie. V našem souboru je 36 pacientů s touto vzácnou diagnózou, z toho 16 mužů, věkový medián v době stanovení diagnózy je 57 let (25 - 84). V osmi případech jde o agresivní formu SM, u 3 pacientů probíhalo současně jiné hematologické onemocnění (AML, ET, HL), u 25 pacientů se jedná o indolentní formu SM. Medián sledování je 49 měsíců (2 - 263), hladinu tryptázy měli v době diagnózy zvýšenou všichni pacienti, fúzní gen FIP1L1/PDGFR α byl vyšetřen u 20 pacientů, u žádného pacienta nebyl na-

lezen. Přítomnost mutace D816V v c-kit byla vyšetřena v KD u 23 pacientů, pozitivní byla u 19 pacientů (83%). U osmi pacientů byly vyšetřeny na mutaci D816V c-kit jak periferní krev, tak kostní dřev. Všichni tito pacienti měli pozitivitu zachycenou v KD, ale pouze 5 z nich ji mělo prokazatelnou v krvi (63%). Urticaria pigmentosa byla přítomna celkem u 22 pacientů (61%), v případě ASM byla UP přítomna u 3 pacientů z 8. Anafylaktické reakce spojené s vyplavením vasoaktivních mediátorů byly projevem nemoci u 16 pacientů (44%). Osteolytická ložiska nebo těžká osteoporóza s patol. frakturami byly přítomny u 4 pacientů (11%). Za dobu sledování zemřeli v souboru 2 pacienti: 1 na progresi agresivní formy onemocnění, jeden na relaps AHNMD (AML). Terapie interferonem alfa (IFN- α) byla zahájena v 1. linii u 13 pacientů, z toho u 3 pacientů byla indikována pro opakované těžké anafylaktické záchvaty. U dvou z těchto pacientů léčba IFN- α snížila frekvenci anafylaktických epizod a vedla k ústupu infiltrace kostní dřev. IFN- α dále vedl k navození parciální remise (PR) u 3 ze 7 pacientů s ASM, u žádného pacienta nevedl k ústupu UP. Pacienti se SM-AHNMD byli léčeni primárně pro jiné hematologické onemocnění. Léčba kladribinem byla indikována celkem u 3 pacientů s ASM v 1. linii, u jednoho z nich vedla k navození kompletní remise (CR). Ve 2. linii léčby byl kladribin použit u 9 pacientů, k navození CR došlo ve 2 a PR také ve 2 případech. Závěr: SM je svým klinickým průběhem pestré myeloproliferativní onemocnění, na něž je třeba pomýšlet zejména u pacientů s opakovanými anafylaktickými záchvaty a trvale zvýšenou hladinou tryptázy. Jak uvolnění vasoaktivních mediátorů, tak nádorový syndrom mohou být život ohrožující. U agresivních forem je indikována protinádorová terapie, u indolentních zejména protialergická profylaxe a interferon- α s kortikosteroidy. Slibné do budoucna mohou být molekuly v klinickém vývoji: masatinib nebo midostaurin.

2911. MDS 2016

Jonášová A. (I. interní klinika VFN a I. LF UK, Praha)

Myelodysplastický syndrom (MDS) představuje heterogenní skupinu klonálních chorob hemopoetické kmenové buňky charakterizovaných inefektivní hemopoézou, periferní cytopenií, morfológickou dysplazií a nebezpečím transformace do akutní myeloidní leukemie (AML). MDS, zvláště v raných fázích je vlastně premaligním (preleukemickým) onemocněním. **Incidence**, která se obecně pohybuje kolem 3,5-4/100 000 za rok, s věkem významně stoupá. U osob nad 60 let je pak 30/100 000, což činí MDS jednu z nejčastějších hematologických malignit v této věkové kategorii a bo-

hužel vede k významnému zkrácení přežívání u těchto nemocných. MDS se s malou převahou vyskytuje častěji u mužů. **Klasifikace.** S vývojem znalostí a kumulací dat o tomto onemocnění se rozvíjí i klasifikace od FAB (French, American, British) k WHO (World Health Organization) klasifikaci 1999 a 2008 a nově navržené 2015 dělíci onemocnění do více podskupin. Jednotlivé podskupiny se liší svojí klinikou, prognózou, celkovým přežíváním a četností transformací do AML.

Co se týče rizika progresu a přežívání, je onemocnění stratifikováno do několika skupin podle IPSS (International Prognostic Scoring System) a nověji IPSS-R (revised) (Obrázek č.1) (1,2,3). Skórovací systémy jsou stěžejní pro rozhodování o volbě terapie. V současné době používáme oba systémy. Revidovaný systém, ale lépe odhaduje přežívání hraničních nemocných a pomáhá zvláště k rozhodování kdy nemocného dle původního IPSS níže rizikového indikovat k transplantaci. V dnešní době se stále více obrací pozornost k výsledkům molekulární genetiky a nálezů mutací specifických genů, které mají, jak se zdá také nezanedbatelný prognostický význam (například: TP53, ASXL1, EZH2, TET2, SF3B1, RUNX1, CBL, NRAS) (Obrázek č.2) (4,5). Kruciólní stran prognózy je například mutace tumor supresorického genu TP53 (6). Ačkoli MDS je závažné onemocnění známé několik dekád jeho molekulární **patogeneze** a otázka proč dochází k vývoji do AML zůstávají neznámé. V patogenезi MDS nejspíše hrají roli genetické faktory, epigenetické a imunopatologické mechanismy (7,8,9). Globálně zmíněné poruchy vedou k dysplastické křetvorbě. Protože jsou v podstatě nádorového charakteru, dávají patologickému klonu růstovou výhodu, takže postupně patologická křetvorba nahradí normální polyklonální hemopoézu. U níže rizikových skupin (rané fáze choroby) je periferní cytopenie pravděpodobně následek akcelerované apoptózy dřevných prekursorů. Imunitní disregulace, metabolické změny, vliv prozánětlivých cytokinů, porucha mikroprostředí a také například abnormální biogeneze ribosomálních proteinů v této fázi hrají pravděpodobně též důležitou roli v narušení integrity hemopoézy a možnosti vzniku patologického klonu. K jeho plné malignizaci a vzniku leukemické populace buněk, ale nejspíše přispívají ještě další faktory. Nebyla prokázána žádná jednotlivá genetická léze, která by mohla vést k vzniku onemocnění. Mezi genetickými defekty, které jsou významné v patogenезi MDS, patří zvláště důležité nebalancované ztráty genetického materiálu (méně často reciproké translokace) (11). Klonální vývoj u MDS je charakterizován vývojem somatických mutací, které vznikají v kmenových buňkách a jejich dceřiných populacích. Sekvenování nové generace“

s vysokou citlivostí pod 0,1% v posledních pěti letech odhalilo sadu mutací které mohou hrát roli ve vzniku onemocnění (12,13). Většina mutovaných genů ovlivňuje nastavení genetického programu umožňující diferenciaci krevních buněk, dále jde o mutace genů, které mají význam jako tumor supresorické geny, geny signálních soustav, geny s rolí v epigenetických procesech, geny pro apoptotické a anti-apoptotické faktory, geny s rolí v reparaci DNA, geny pro ribosomální proteiny a další. Zajímavé právě u MDS je, že mnoho často mutovaných genů u MDS kóduje proteiny, které jsou důležité v epigenetických mechanismech, což naznačuje specifický vztah genetických a epigenetických změn. Poslední práce dokládají, že u MDS nalezneme minimálně jednu z mnoha známých onkogenních mutací u zhruba 70-90% nemocných. Role jednotlivých mutací v etiopatogenezi onemocnění není ještě zcela objasněn a je předmětem současného výzkumu. Studium mutací stojí v posledních letech ve středu zájmu výzkumu týkajícího se patogenезe MDS. Výskyt mutací u nemocných je velmi variabilní, většina nemocných sice má nějakou mutaci, ale výskyt specifické mutace v rámci celé MDS skupiny nepřesahuje 20% (obrázek č.3). Výjimečné jsou jenom mutace sestřihového mechanismu (spliceosom). Ty se vztahují k jednomu podtypu MDS RARS a RARS-T (tedy refrakterní anemie s věnečkovitými sideroblasty ev. s trombocytémií) u těchto podskupin se vyskytuje minimálně jedna mutace spliceosomu téměř ve 100% nemocných a tak se de facto stávají diagnostické pro tyto podskupiny.

Ve středu pozornosti stran patogenезe onemocnění v současné době stojí samostatná podskupina MDS, což jsou nemocní s 5q- aberací (delece dlouhého raménka 5. chromosomu). V roce 2008 B. Ebert dokázal, že haploinsuficience genu kódujícího ribosomální protein RPS14, ležícího v CDR (common deleted region) způsobuje specifický blok maturace červené řady (14). Následovali další práce identifikující další haploinsuficentní geny z deletovaného úseku a jejich vztah k patogenезi onemocnění (15).

Terapie. I přes stálý intenzivní výzkum je MDS jednou z nejobtížněji řešitelných hematologických malignit. Prognóza asi poloviny nemocných s primárním a většiny nemocných se sekundárním MDS je relativně špatná.

V posledních letech se objevily nové terapeutické možnosti v podobě imunomodulační terapie a epigenetické-demetylační terapie. Obě tyto nové skupiny léků znamenaly pro MDS doslova revoluci a to nejen stran šancí pro nemocné, ale i zájmem o tuto chorobu. Hrály proto i roli v intenzivnějším výzkumu patogenезe onemocnění. Právě u první skupiny imunomodulační

terapie reprezentované u MDS lenalidomidem byly zcela recentně udělány podstatné kroky v poodhalení vysoké selektivní efektivity tohoto preparátu u nemocných s MDS s 5q- aberací (16,17). V první řadě byl identifikován centrální intracelulární cíl imunomodulačních látek- cereblon (CRBN). Nemalou měrou k tomu přispěla právě u MDS i naše práce (18). CRBN je součástí ubiquitin E3 ligázy. Po vazbě na lenalidomid jsou do tohoto komplexu rekrutovány specifické proteiny, které podléhají ubiquitinaci a jsou následně degradovány v proteasomu. Naše práce popisuje statisticky významně vyšší expresi CRBN u nemocných právě s 5q- oproti MDS bez 5q- aberace a zdravým kontrolám, což by mohlo podpořit vysvětlení proč právě nemocní s 5q- jsou tak citliví na terapii lenalidomidem. Nepublikovaná data analýzy nemocných z I. Interní kliniky VFN léčených lenalidomidem ukazují též, že nemocní, kteří jsou dobrými respondenty mají vysokou hladinu mRNA CRBN ve srovnání s nemocnými, kteří neodpovídají na lenalidomid. V loňském roce byla v časopise Nature publikována velice elegantní práce identifikující kasein kinázu 1a1 (CK1 α), jejíž gen je na CDR a která je tudíž haploinsuficientní, jakožto cílový protein rekrutovaný do E3 ligázového komplexu právě po navázání lenalidomidu na CRBN. CK1 α v haploinsuficientní formě vede k růstové výhodě a proliferaci takto postižené buňky/klonu tedy v tomto případě klonu s 5q- (19). Avšak při její degradaci (v proteasomu) a dalším podstatném snížení hladiny, buňka takto postižená propadá apoptóze. Tak je vysvětlen efekt lenalidomidu specificky u 5q-. Kdy jistě dochází k potlačení růstu patologického klonu s 5q- aberací. Mezi zásadnější novinky v terapii nízce rizikových nemocných patří dva příbuzné preparáty pro anemické nemocné ovlivňující pozdní fáze erythropoézy s účinností cca 50 a více procent podle tíže transfusní dependence a to Sotatercept a Luspatercept. Oba léky jsou ale stále ještě ve fázi klinického zkoušení. Stále diskutabilní u MDS je použití trombopoetinových agonistů Romiplostimu a Eltrombopagu pro jejich možnou potenciaci progresu onemocnění. Klinické studie s oběma preparáty byly z tohoto důvodu předčasně ukončeny. Co se týče terapie vysoce rizikových nemocných není zatím překonán azacitidin (20, 21). Jasnou předností azacitidinu je prodloužení OS (overall survival) v porovnání se standartní terapií nicméně s narůstajícími zkušenostmi s tímto preparátem je zřejmé, že stěžejní problém je dosažení skutečně dlouhotrvající remise onemocnění. Je třeba se orientovat na potenciaci efektů léčby vhodnými kombinacemi a hledání dalších terapeutických možností po selhání azacitidinu. Transplantace tak jednoznačně hraje stá-

le nejdůležitější roli v dosažení dlouhodobě trvajících remisí (22). Azacitidin se v souvislosti s transplantací používá čím dále tím více jako přemostující terapie. V současné době je v klinickém zkoušení asi 50 nových preparátů. Nezbývá než doufat, že aspoň některé z nich přinesou prospěch pro MDS nemocné.

Práce vznikla za podpory výzkumného záměru I. LF UK Prvok 27 a Výzkumného úkolu MZ ČR UHKT No 00023736.

LITERATURA

- Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997; 89: 2079–2088 (erratum, *Blood* 1998, 91: 1100).
- Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012 Sep 20, 120(12): 2454–2465.
- Schanz J, Tüchler H, Solé F, et al. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol*. 2012 Mar 10, 30(8): 820–829.
- Bejar R, Stevenson KE, Caughey BA, et al. Validation of a prognostic model and the impact of mutations in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 2012; 30(27): 3376–3382.
- Bejar et al. Somatic mutations in MDS patients are associated with clinical features and predict prognosis independent of the IPSS-R, analysis of combined datasets from the international working group for prognosis in MDS-molecular committee. *Blood* 2015, 126 (23) p 907.
- Kulasekararaj AG, Smith AE, Mufti GJ, et al. TP53 mutations in myelodysplastic syndrome are strongly correlated with aberrations of chromosome 5, and correlate with adverse prognosis. *Br J Haematol*. 2013, 160: 660–672.
- Cazola M, DellaPorta MG, Malcovati L. The genetic basis of myelodysplasia its clinical relevance. *Blood*. 2013 Dec 12, 122(25): 4021–4034.
- Itzykson R, Fenaux P. Epigenetics of myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2014 Mar, 28(3): 497–506.
- Figuerola ME, Skrabanek L, Li Y, et al. MDS and secondary AML display unique patterns and abundance of aberrant DNA methylation. *Blood*. 2009, 114(16): 3448–3458.
- Molldrem JJ, Jiang YZ, Barrett AJ, et al. Haematological response of patients with myelodysplastic syndrome to antithymocyte globulin is associated with a loss of lymphocyte-mediated inhibition of CFU-GM and alterations in T-cell receptor Vbeta profiles. *Br J Haematol*. 1998 Sep, 102(5): 1314–1322.
- Haase D, Germing U, Schanz J, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood*. 2007, 110: 4385–4395.
- Haferlach T, Nagata Y, Grsmann V, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2014 Feb, 28(2): 241–247.
- Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, et al. Clinical and biologi-

- cal implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2013 Sep 12, (122): 3616-3627.
14. Ebert BL, Pretz J, Golub TR, et al. Identification of RPS14 as a 5q-syndrome gene by RNA interference screen. *Nature*. 2008 Jan 17, 451(7176): 335-339.
 15. Starczynowski DT, Kuchenbauer F, Karsan A, et al. Identification of miR-145 and miR-146a as mediators of the 5q-syndrome phenotype. *Nat Med*. 2010 Jan, 16(1): 49-58.
 16. List A, Dewald G, Bennett J, Giagounidis A, Raza A, et al. Myelodysplastic Syndrome-003 Study Investigators. Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *N Engl J Med*. 2006 Oct 5, 355(14): 1456-1465.
 17. Jonášova et al. Lenalidomid v terapii MDS nemocných s 5q- aberací, zkušenosti české MDS skupiny. *Vnitr Lek*. 2015 Dec;61(12):1028-33. Czech.
 18. Jonášová A, Fuchs O et al. High level of full-length cereblon mRNA in low risk myelodysplastic syndrome with isolated 5q deletion is implicated in the efficacy of lenalidomide. *European J Haematol*. 2015 Jul;95(1):27-34.
 19. Krönke et al. Lenalidomide induces ubiquitination and degradation of CK1 α in del(5q) MDS. *Nature* 2015 Jul 9;523(7559):183-8
 20. Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, et al. International Vidaza High-Risk MDS Survival Study Group. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol*. 2009, 10(3): 223-232.
 21. Jonášova A, Čermák J, Červínek L, et al. První zkušenosti České MDS skupiny s terapií 5-azacytidinem u nemocných s myelodysplastickým syndromem s vyšším rizikem (IPSS střední 2 a vysoké riziko), akutní myeloidní leukemií do 30 % myeloblastů a chronickou myelomonocytární leukemií II. Jonášová A. a kolektiv, *Tranfuse hematologie dnes*, 2013, 19: 125-133.
 22. Zeidan E, Gore SD et al. Should elderly patients with higher-risk myelodysplastic syndromes undergo allogeneic hematopoietic stem cell transplantation? *Expert Rev Hematol*. 2013 Oct;6(5): 539-42

3005. SOMATIC MUTATIONS IN HIGH-RISK MDS PATIENTS TREATED WITH AZACITIDINE AND LENALIDOMIDE

Polgárová K., Kulvait V., Vargová K., Minařík L., Jonášová A., Stopka T. (1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague, 1st Clinic - Haematology, General Faculty Hospital, Prague; 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague)

Myelodysplastic syndrome (MDS) is a clonal stem cell disorder with dysplastic and ineffective haematopoiesis with variable risk of progression to acute myeloid leukaemia (AML). MDS stem cells produce clonal progeny marked with somatic variants in previously characterized MDS/AML associated genes in 70% of patients that undergo additional mutation events during course of the disease such as mutation of TP53. Accumulation of somatic mutations leads to progression in myeloblast accumulation as well as lineage differentiation suppression. To stratify the prognosis of patients several scoring systems have been developed with IPSS-R being currently mostly used. Although the detection of somatic mutations in oncogenic drivers has been proposed to be included into the patient prognostic stratification, only limited guidelines for detecting and scoring these somatic variants were recommended. Using Illumina Myeloid TruSight panel we analysed amplicons of 54 MDS/AML-linked genes in 65 MDS patients, 5 MDS/AML cell lines and controls including cord bloods and normal individuals. The MDS patients were either high risk (N=39) treated with Azacitidine or low risk (N=16) mostly treated with Lenalidomide (N=13). Most of the patients were sequenced before and during therapy. In order to increase proportion of tumour cells we separated out the CD3+ T-cell fractions using magnetic sorting and sequenced these two fractions in parallel. In addition, we analysed effect of repeating the sequencing step as well as duplicate library-preparation step. While duplicating the sequencing step provided only decent changes in variant allele frequency (VAF) within one library without having to much of impact on number and type of somatic variants, the duplicate library experiment for 8 patient samples led to striking differences on number and type of variants suggesting presence of PCR artefacts during library preparation. Indeed validations using Sanger sequencing provided important information of how reliable were the individual sequencing runs and how effective was to use duplicate library experiment and focus on those variants that overlap between the two libraries per one patient. Our results suggest caution is needed when assuming somatic mutations for prognostic purpose to prevent (pre)analytical sources of bias especially using single library-sequencing experiment.