

POSTEROVÁ SEKCE

CHRONICKÁ LYMFOCYTÁRNÍ LEUKEMIE

PO1

LIČBA CHRONICKEJ B-LYMFOCYTOVEJ LEUKÉMIE KOMBINOVANOU IMUNOCHEMOTERAPIOU S RITUXIMABOM – DÁTA Z REÁLNEJ KLINICKEJ PRAXE

Hrubiško M.^{1,2}, Lukáš J.^{1,2}, Harvanová Ľ.¹, Hatalová A.¹, Slezáková K.¹, Sninská Z.¹, Farkaš F.¹, Petříková K.¹, Pavlíková D.^{1,2}, Skraková M.^{1,2}, Sopko L.¹, Štefániková Z.¹, Bojtárová E.^{1,2}, Mistrík M.^{1,2}, Bátorová A.^{1,2}

¹Klinika hematológie a transfúziológie LF UK, SZU a UNB, Nemocnica sv. Cyrila & Metoda Petržalka, Bratislava

²Slovenská zdravotnícka univerzita, Bratislava

Ciel: Porovnanie efektivity režimu FCR (fludarabín, cyklofosfamid, rituximab – RXM) s pacientmi liečenými v minulosti bez použitia RXM a kombinácie RXM s Bendamustínom (BR) v rutínnej praxi na KHaT v Bratislave.

Metódy: Štatisticky sme spracovali súbor 109 pacientov (71 mužov a 38 žien), ktorí boli v rokoch 2001–2018 liečení CHT v kombinácii FC, FCR alebo BR. Priemerný vek pri diagnóze v celom súbore bol 57 rokov (medián 57 rokov, rozsah 36–79 rokov). Režim FCR dostalo 83 pacientov, FC 27 pacientov a BR 12 pacientov. Medián veku v skupinách FCR – FC – BR bol 58, 52 a 61,5 rokov, resp. Medián sledovania bol 58,5 mesiaca (2–240 mesiacov).

Výsledky: V skupine FCR sme dosiahli 75 KR (90,4%), 5 PR (6%) a 3krát (3,6%) sme odpoveď nezaznamenali (NR). V skupine bez RXM sme zaznamenali 21 KR (77,8%) a po 3 (11,1%) PR a NR. Pacienti s BR dosiahli KR v 8 prípadoch (66,7%), PR v 3 (25%) a NR 1krát (8,3%). RFS v skupine FCR bol 37 mesiacov, bez RXM 30 mesiacov. Medián OS v skupine FCR nebol ešte dosiahnutý, po FC je 97 mesiacov. Rozdiel síce nie je štatisticky signifikantný, ale pozorujeme výrazný trend v prospech skupiny FCR. 18 chorých v skupine bez RXM bolo liečených v ďalšej línii režimom FCR, príp. inými spôsobmi vrátane alogénnej nepríbuzenskej transplantácii krvotvorných buniek (3krát). Pri režime FCR má výrazný vplyv na RFS genetika (RFS low risk 39 mesiacov vs. high risk 24 mesiacov), línia liečby (RFS 1. línia 50 mesiacov vs. 2. línia 16 mesiacov) a pokročilé štádium

(C, príp. III a IV): RFS počiatočné štádium 41 mesiacov vs. pokročilé 14 mesiacov.

Záver: RFS sa pridaním Rituximabu do liečby CLL výrazne predĺžil, zaznamenali sme aj zlepšenie celkového prežívania, ktorého medián nebol ešte v skupine FCR dosiahnutý. Potvrdili sme význam pokročilosti choroby a genetických rizikových faktorov.

PO2

TERAPIE BCR INHIBITORY U CHRONICKEJ LYMFOCYTÁRNÍ LEUKEMIE – ZKUŠENOSTI CENTRA

Špaček M., Molinský J., Cmunt E., Karban J., Šálková J., Haber J., Trněný M.

I. interní klinika I. LF UK a VFN, Praha

Cíle: Terapeutické výsledky u pacientů s CLL se v posledních letech výrazně zlepšují. Zásadní podíl na tom má nová cílená léčba, která podstatně mění prognózu pacientů s CLL. V současné době jsou dostupné tři nové molekuly: ibrutinib, idelalisib a venetoklax. Výběr pacientů pro klinické studie zpravidla neodpovídá běžné populaci nemocných s CLL, a proto bylo cílem naší práce popsat výsledky terapie BCR inhibitory v běžné praxi.

Metody: Zařazení byli pacienti s CLL, kteří zahájili léčbu BCR inhibitory (ibrutinib, idelalisib) do konce roku 2017, hodnocena byla odpověď na léčbu (včetně CT vyšetření) a toxicita dle CTCAE.

Výsledky: Ibrutinib zahájilo 22 pacientů (73% muži), medián věku při zahájení terapie byl 67 let (43–82 let), aberace TP53 byla přítomna u deseti pacientů (45%). Celková léčebná odpověď (ORR) byla 82% (9% kompletní remise). Dva pacienti progredovali (9%), jeden měl stabilní chorobu (5%) a jednou nebyla odpověď hodnocena. Aktuální medián času na léčbě je 7 měsíců (2–27 měsíců), přičemž 13 pacientů dále pokračuje. Důvody ukončení terapie byly (počty pacientů): progresse (3), alogenní transplantace (2), krvácení (2), sekundární malignita (2). Idelalisib zahájilo 20 pacientů (60% muži), medián věku při zahájení terapie byl 68 let (42–79 let), aberace TP53 byla přítomna u 13 pacientů (65%).

POSTEROVÁ SEKCE

Celková léčebná odpověď (ORR) byla 80% (5% kompletní remise). Čtyři pacienti vykazovali stabilní chorobu (20%). Aktuální medián času na léčbě je 6 měsíců (2–30 měsíců), přičemž čtyři pacienti dále pokračují. Důvody ukončení terapie byly (počty pacientů): progresse (4), infekce (4), alogenní transplantace (2), kolitida (2), sek. MDS (1), bulózní dermatitida (1), progresse (1), stabilní choroba (1).

Závěr: BCR inhibitory jsou hlavní léčebnou možností u relabujících/refrakterních pacientů s CLL. Výsledky z běžné praxe ukazují při akceptovatelné toxicitě vysokou účinnost i u prognosticky velmi nepříznivých CLL.

P03

KOMPLEXNÍ HODNOCENÍ IMUNITNÍCH FUNKCÍ U NEMOCNÝCH S CHRONICKOU LYMFOCYTÁRNÍ LEUKEMIÍ

Vodárek P.¹, Andrýs C.², Jurenková A.², Motýčková M.¹, Řezáčová V.², Souček O.², Šimkovič M.¹, Vokurková D.², Belada D.¹, Žák P.¹, Smolej L.¹

¹IV. interní hematologická klinika LF UK a FN, Hradec Králové

²Ústav klinické imunologie a alergologie LF UK a FN, Hradec Králové

Úvod: Chronická lymfocytární leukemie (CLL) je provázená významným kombinovaným imunodeficiencím. Důsledkem je zvýšený výskyt infekcí, které jsou nejčastější příčinou úmrtí nemocných s CLL. Řada mechanismů imunoprese u CLL není dosud dobře prozkoumána.

Cíle: Komplexní zhodnocení buněčné a humorální imunity u nemocných se stabilní a progredující CLL.

Metody: Imunitní funkce byly prospektivně hodnoceny u 78 nemocných s CLL (50 mužů, medián věku 67 let, nízké/střední/vysoké modifikované riziko dle Raije u 23/33/44 % nemocných, progredující onemocnění u 49 %). Parametry buněčné imunity (počty Th- lymfocytů (ly), Tc-ly, polyklonálních B-ly a NK-buněk) byly hodnoceny průtokovou cytometrií (cytometr Navios, Beckman Coulter). Sérové koncentrace cytokinů (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-17F, IL-33 a IFN- γ) byly stanoveny metodou X-MAP (Luminex). Humorální imunita byla hodnocena měřením koncentrací imunoglobulinů (IgG1-4, IgM a IgA) pomocí kitů Image Immunochemistry System (Beckman Coulter) a testem aktivace komplementu pomocí kitů Wieslab Complement System Screen (Euro Diagnostica). Při statistické analýze dat humorální imunity byl využit kontrolní soubor 46 zdravých dárců krve (27 mužů, medián věku 40 let).

Výsledky: Nemocní s CLL měli proti kontrolám nižší koncentrace IgG, IgA i IgM ($p < 0,0001$). Progredující onemocnění bylo spojeno s nižší koncentrací IgG a IgA ($p = 0,009$ a $p = 0,0005$). U nemocných s CLL byla proti kontrolám zvýšená aktivace komplementu alternativní cestou ($p = 0,039$). Sérové koncentrace IL-4, IL-6, IL-10 a IFN- γ byly ve srovnání s kontrolami zvýšené ($p < 0,0001$). Nemocní s progresí CLL měli navíc vyšší koncentrace IL-10, než nemocní se stabilní chorobou ($p = 0,038$). U progredující CLL byly nižší relativní počty T-ly, Tc-ly a NK-buněk ($p = 0,021$, $p = 0,021$ a $p = 0,011$), ale vyšší relativní počet Th-lymfocytů ($p = 0,038$).

Závěr: Výsledky ukazují na vícečetné defekty postihující buněčnou i humorální imunitu nemocných s CLL. Progredující onemocnění je spojeno s dalším zhoršováním imunitních funkcí. Budou prezentována aktualizovaná data.

Podpořeno programem Progres-Q40/08, Liga proti rakovině Praha.

P04

VYUŽITÍ OSMIBAREVNÉ PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE V DIAGNOSTICE VLASATOBUNĚČNÉ LEUKEMIE

Hrabčáková V.¹, Černá J.^{1,2}, Doubek M.^{1,2}, Dvořáková D.¹, Mayer J.^{1,2}

¹Interní hematologická a onkologická klinika, Centrum molekulární biologie a genové terapie FN, Brno

²Středoevropský technologický institut (CEITEC), Masarykova univerzita, Brno

Cíle: Buňky vlasatobuněčné leukemie (HCL) vykazují typické morfologické a imunohistochemické znaky, nicméně stanovení diagnózy nemusí být na první pohled jednoznačné. Leukemické buňky jsou dobře detekovatelné i pomocí průtokové cytometrie. Molekulární analýza DNA umožňuje prokázat získanou mutaci protoonkogenu BRAF V600, která je popsána jako spolehlivý marker tohoto onemocnění. Naším cílem bylo dosáhnout, aby se imunofenotypizační analýza zralých leukemických B-buněk stala optimalizovanou, rychlou a efektivní metodou nejen v rámci diferenciální diagnostiky, ale také při dlouhodobém sledování pacientů s indolentním průběhem HCL a také u pacientů po terapii v rámci sledování minimální zbytkové nemoci včetně pacientů s netypickým fenotypem či nejasným statusem mutace BRAF V600.

Metody: Srovnávali jsme míru exprese a relevanci původně i nově popsaných antigenů (CD11c, CD20, CD25, CD27, CD48, CD103, CD123, CD200, CD305 a ROR1) a výsledky analýzy mutace *BRAF V600* mezi skupinou pacientů s HCL, variantní HCL a zdravými kontrolami. Na přístroji FACSCanto II byly pomocí osmibarevné analýzy stanoveny hodnoty MFI pro jednotlivé antigeny (na populaci CD19+ leukocytů). Byla hodnocena míra diskriminace hodnot MFI mezi leukemickými a fyziologickými CD19+ B-lymfocyty v rámci různých kombinací antigenů na test.

Výsledky: V porovnání s fyziologickými B-lymfocyty jsou jednotlivé antigeny exprimovány na povrchu leukemických buněk s rozdílnou mírou exprese. Prokázali jsme, že v porovnání se zdravými kontrolami je pomocí

antigenů CD11c, CD103, CD305 a CD200 možné zcela odlišit normální B-lymfocyty od buněk HCL. Negativní exprese antigenu CD200 ve více než polovině případů navíc může pomoci odlišit variantní HCL od klasické HCL, kde je daný antigen hyperexprimován. Expresе všech ostatních vyšetřovaných znaků vykazovaly mezi buňkami HCL a normálními B-lymfocyty určitou míru překryvu. Na základě daných výsledků je možné sestavit vysoce specifický vyšetřovací panel antigenů, pomocí kterého spolehlivě odlišíme patologické a fyziologické B-lymfocyty.

Závěr: Analyzovaná data pomohou zpřesnit diferenciální diagnostiku HCL a zkvalitnit sledování minimální zbytkové nemoci jako i efektivně využít relevantní a moderní imunofenotypizační markery.

LYMFOMY

P05

CYTOLOGIA IMPRINTOV LYMFATICKÝCH UZLÍN - JEDENÁŠŤROČNÉ SKÚSENOSTI

Wild A.^{1,2}, Holasová J.^{1,2}, Plank L.^{3,4}, Szépe P.^{3,4}, Balhárek T.^{3,4}, Marcinek J.^{3,4}

¹Hematologické oddelenie a Centrálny laboratórny komplex FNŠP F. D. Roosevelta, Banská Bystrica

²Slovenská zdravotnícka univerzita, Bratislava

³Ústav patologickej anatómie Jesseniovej lekárskej fakulty Univerzity Komenského a Martinskej fakultnej nemocnice, Martin

⁴Martinské biotické centrum, s.r.o., Martin

Ciele: Cytologie imprintov lymfatických uzlín (CILU) sa dlhodobo vykonávajú na pracovisku autorov pre prípad potreby ďalšej diagnostiky, stagingu alebo aj začatia terapie pred výsledkom histologického vyšetrenia a prípadne ako materiál pre genetické vyšetrenie metódou FISH. Cieľom je zhodnotiť ich význam z hľadiska určenia správnej diagnózy.

Metódy: Autori retrospektívne vyhľadali popis CILU od apríla 2007 do apríla 2018. Porovnali výsledky CILU a histologie lymfatických uzlín.

Výsledky: Autori identifikovali 119 nálezov porovnateľných s histologickým vyšetrením. 5 imprintov bolo nereprezentatívnych. Z 22 malobunkových NHL (mNHL) bolo cytologicky identifikovaných 8, 4 boli označené ako v blastickéj transformácii (BT), 2 ako nejasný a 8 ako nenádorový nález. Z 20 DLBCL bolo 10 označených ako NHL vysokého stupňa malignity (HG-NHL), 8 ako tumor nejasnej genézy, 1 ako Burkitov lymfóm (BL) a 1 ako mNHL-BT. Z 15 imprintov suspektných z HG-NHL boli 2 histologicky bez nádorovej infiltrácie: prvý cytologicky suspektný z PTLD, druhý histologicky bez infiltrácie v LU, ale s infiltráciou DLBCL v kostnej dreni a sliznici duodena. Správne boli identifikované: jediný BL, 53 % klasických Hodgkinových lymfómov (cHL, eozinofília v LU bola u menej ako 33 %) a 83 % LU bez nádorových zmien. Pre diagnostiku mNHL bola senzitivita 54%, pozitívna prediktívna hodnota (PPH) 89%. Pre diagnostiku metastáz bola senzitivita 65%, špecificita a PPH 100%, negatívna prediktívna hodnota 93%. Pre diagnostiku všetkých nádorov okrem mNHL boli tieto hodnoty 85 %, 69 %, 89 % a 55 % a pre HG-NHL 55 %, 78 %, 68 % a 92 %. Autori prezentujú koreláciu morfológických s ďalšími laboratórnymi a klinickými údajmi a prípadné možnosti spresnenia cytologickej diagnostiky.

Záver: CILU nedostatočne diagnostikuje mNHL, ich blastickú transformáciu aj cHL, najmä ak ide o novo-

zistené ochorenie. Cytologický nález nádorovej infiltrácie inej ako evidentnej MTS nemožno používať pre liečebné účely bez korelácie s klinickými a ostatnými laboratórnymi údajmi.

P06

STANDARDIZACE TESTOVÁNÍ SOMATICKÝCH MUTACÍ V GENECH MYD88 A CXCR4 Z KOSTNÍ DŘENĚ A PERIFERNÍ KRVE U PACIENTŮ S WALDENSTRÖMOVOU MAKROGLOBULINEMÍÍ V ČESKÉ REPUBLICE

Kašćák M.^{1,2}, Chyra Z.^{1,2,3}, Growková K.^{1,2,3}, Šimíćek M.^{1,2,3}, Hrdinka M.^{1,2,3}, Jelínek T.^{1,2,3}, Hájek R.^{1,2}

¹Klinika hematookologie FN, Ostrava

²Lékařská fakulta, Ostravská univerzita

³Katedra biologie a ekologie, Přírodovědecká fakulta, Ostravská univerzita

Úvod: Více než 90 % případů Waldenströmovy makroglobulinemie (WM) provází aktivační bodová mutace L265P v genu MYD88 a jenom vzácně se vyskytuje u jiných indolentních lymfomů. Druhým nejčastěji mutovaným genem u WM s frekvencí 30 % je CXCR4 (Hunter 2014). Mutace v těchto genech jsou přítomné v kostní dřeni (BM) a zároveň v periferní krvi (PB) s vysokou konkordancí (Growková 2017). Genotyp mutací u WM představuje nejvýznamnější faktor určující efektivitu léčby a může být vodítkem při jejím výběru (Treon 2017). Bylo popsáno nejméně sedm metod detekce s různým detekčním limitem a testujících různé buněčné frakce. Doposud ale neexistuje jednotný standard pro vyšetření těchto mutací v rutinní praxi v České republice.

Cíl: Cílem této práce je návrh standardizované metody alelově specifické PCR (AS-PCR) pro potřeby vyšetření somatických mutací v genech MYD88 a CXCR4 ze vzorků BM a PB, které by byly dostatečně citlivé, jednoduché a dostupné.

Metódy: Byly použity vzorky z PB a BM 31 pacientů s WM. Analýza mutace MYD88 (L265P) byla provedena na vzorcích genomové DNA (gDNA) mononukleárních buněk PB (PBMCs) pomocí AS-PCR (Varettoni 2013). Pomocí kvantitativní real-time AS-PCR byla analyzována mutace CXCR4 (C1013C) (Roccaro 2014). Pro srovnání výsledků byla navíc provedena analýza u deseti vzorků z plně PB a u deseti náhodně vybraných vzorků z CD19+ buněk BM.

Výsledky: Analýza mutací v genu MYD88 (L265P) ze vzorků gDNA PBMCs odhalila 87 % (27/31) WM pacientů jako pozitivních. Mutace CXCR4 (C1013G) se objevila ve 25 % (8/31). Konkordance detekce MYD88L265P mezi CD19+ BM v porovnání s PB, PBMCc a CD19+ PB byla 100% u všech případů, pro CXCR4S338X byla konkordance mezi CD19+BM a CD19+PB nebo PBMCs 91%, mezi CD19+BM vs. PB 83%.

Podpořeno grantem DRO – FNOs/2018.

P07

VÝZNAM ANTIANGIOGENNÍ TERAPIE U LYMFOMU Z PLÁŠŤOVÝCH BUNĚK

Vočková P.^{1,2}, Klánová M.^{1,2}, Molinský J.^{1,2}, Tušková D.^{1,2}, Maswabi B. C.², Trněný M.¹, Klener P.^{1,2}

¹I. interní klinika I. LF UK a VFN, Praha

²Ústav patologické fyziologie I. LF UK, Praha

Cíl: Bevacizumab je rekombinantní monoklonální protilátka proti vaskulárnímu endoteliálnímu růstovému faktoru (VEGF), působí primárně inhibici angiogeneze. Tato látka je v současnosti schválena v léčbě některých solidních tumorů (např. kolorektální karcinom, karcinom prsu a ledvin). U hematologických malignit zatím zůstává význam angiogeneze a antiangiogenních léčebných přístupů nejasný. Naším cílem bylo prozkoumat efekt bevacizumabu v experimentální terapii lymfomu z plášťových buněk (MCL).

Metoda: K experimentální terapii jsme použili panel myších modelů lidského MCL založených na intravenózní (i.v.) či subkutánní (s.c.) xenotransplantaci ustálených buněčných linií (JEKO-1, HBL-2) a primárních buněk MCL (VFN-M1, VFN-M2) do imunodeficientních myší (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ). Protilymfomový efekt bevacizumabu byl hodnocen analýzou dynamiky růstu podkožních tumorů (s.c. model) či porovnáním celkového přežívání myší (i.v. model) léčených bevacizumabem ve srovnání s kontrolní, neléčenou skupinou myší (CTRL). Expres vybraných genů byla analyzována pomocí TaqMan Angiogenesis Array. Hladina VEGF byla analyzována v myších tkáňových metodou ELISA.

Výsledky: Zjistili jsme, že bevacizumab významně potlačuje růst podkožních tumorů MCL u 4 ze 4 s.c. modelů v porovnání s CTRL (JEKO-1: 0,71 g ± 0,24 g vs. 3,22 g ± 0,65 g, p = 0,0061; HBL-2: 0,95 g ± 0,11 g vs. 4,2 g ± 0,28 g, p < 0,0001; VFN-M1: 0,49 g ± 0,04 g vs. 2,18 g ± 0,13 g, p < 0,0001; VFN-M2: 0,77 g ± 0,07 g vs.

1,15 g ± 0,18 g, p = 0,0012). Na druhou stranu, bevacizumab je neúčinný pro terapii diseminovaného MCL; u 3/4 testovaných i.v. modelů (HBL-2, JEKO-1, VFNM1) se celkové přežívání myší léčených bevacizumabem významně neliší ve srovnání s CTRL (p = 0,89, 0,87 a 0,09). Stanovení hladin VEGF v s.c. tumorech CTRL ukazuje korelaci exprese VEGF s velikostí tumoru. U všech analyzovaných modelů dochází po terapii bevacizumabem ke zvýšení exprese proangiogenních genů ANG, FOXC2 a IFNBI.

Závěr: Diskrepance protilymfomové účinnosti bevacizumabu u s.c. a i.v. modelu může být způsobena odlišnou úrovní hypoxie v lymfomu rostoucím podkožně a u lymfomu systémově diseminovaného. Výsledky analýzy genové exprese naznačují, že zablokováním VEGF dojde ke stimulaci alternativních mechanismů angiogeneze.

P08

HODNOCENÍ TOXICITY LÉČBY 1. LINIE U STARŠÍCH PACIENTŮ S HODGKINOVÝM LYMFOMEM V POKROČILÉM STADIU – MULTICENTRICKÁ RETROSPEKTIVNÍ ANALÝZA DAT Z ČR

Sýkorová A.¹, Móciková H.², Lukášová M.³, Kořen J.⁴, Štěpánková P.¹, Procházka V.³, Belada D.¹, Klásková K.², Gáherová L.², Chroust K.⁵, Burešová L.⁵, Marková J.², za Hodgkinův lymfom, z.s.

¹IV. interní hematologická klinika LF UK a FN, Hradec Králové

²Oddělení klinické hematologie 3. LFUK a FNKV, Praha

³Hemato-onkologická klinika a LF UP, Olomouc

⁴I. interní klinika – klinika hematologie I. LF UK a VFN, Praha

⁵DSC Services, Tišnov

Úvod: Optimální léčba pacientů ≥ 60 let s pokročilým stadiem Hodgkinova lymfomu (HL) není dosud definována pro častou přítomnost komorbidit nemocných a špatnou toleranci chemoterapie (CHT) a/nebo radioterapie.

Cíl: Cílem práce bylo analyzovat toxicitu léčby 1. linie u starších pacientů s klasickým HL v pokročilém stadiu.

Metody: Analyzovali jsme léčbu u 125 pacientů (p) ≥ 60 let s HL v pokročilém stadiu s diagnózou v letech 1999–2016. Medián věku byl 67 let (rozmezí 60–84 let). Samotnou chemoterapií bylo léčeno 109 (87,2 %) pacientů. CHT a RT byla použita u 11,2 % pacientů. Chemoterapii na bázi antracyklinů dostalo 84 % nemocných, 50,4 % pacientů bylo léčeno režimem ABVD.

POSTEROVÁ SEKCE

Výsledky: Medián počtu podaných cyklů CHT byl 6 (rozmezí 1–9). Medián počtu cyklů CHT s podáváním G-CSF byl 6 (rozmezí 1–8). ORR byla 83,2 % pacientů – CR 67,2 %, SD 0,8 % a progresse 6,4 %. Toxicita bleomycinu stupně ≥ 3 byla pozorována u 12,2 % nemocných. Další toxicita stupně ≥ 3 dle CTCAE v.4 zahrnovala: kardiální 7,2 %, neurologickou 4 %, infekce 21,6 % a jinou toxicitu 4 %. Zemřelo 51 pacientů (40,8 %). Nejvyšší úmrtnost v této skupině pacientů byla způsobena progresí HL (31,3 %). Úmrtnost v souvislosti s léčbou byla 25,4 %. Další příčiny úmrtí zahrnovaly: infekce (3,9 %), sekundární malignity (9,8 %), jiné příčiny (11,8 %) a neznámo (17,6%) pacientů.

Závěr: Nejčastější příčinou úmrtnosti u starších pacientů v pokročilém stadiu zůstává progresse HL. Toxicita bleomycinu je v našem souboru srovnatelná s publikovanými údaji. Mortalita v souvislosti s terapií je vysoká. Prospektivní klinická hodnocení jsou nutná k určení optimálního léčebného režimu s vyšší účinností a nízkou toxicitou.

Práce byla podpořena grantem AZV 16-29857A, grantem KLS 16-31092A, výzkumným projektem Univerzity Karlovy v Praze, 3. LF UK v Praze Progres-Q28 a výzkumným projektem Progres-Q40/08.

P09

HODGKINOVA VARIANTA RICHTEROVA SYNDROMU U PACIENTŮ V ČESKÉ REPUBLICCE

Móčíková H.¹, Sýkorová A.², Marková J.¹, Klásková K.¹, Šimkovič M.², Smolej L.², Kalinová M.³, Campr V.³, Kozák T.¹

¹Interní hematologická klinika 3. LF UK a FNKV, Praha

²IV. interní hematologická klinika FN, Hradec Králové

³Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN Motol, Praha

Cíl: Transformace B buněčné chronické lymfatické leukemie (B CLL) do Hodgkinova lymfomu (HL) se vyskytuje zřídka. Optimální léčba těchto pacientů je nejasná. V práci jsme shrnuli diagnostiku, léčbu a prognózu deseti pacientů léčených v České republice pro Hodgkinovu variantu (HV) Richterova syndromu.

Metody: Iniciální léčba deseti pacientů s B CLL zahrnovala převážně chemoterapii na bázi fludarabinu v kombinaci s rituximabem nebo alemtuzumabem, pouze tři pacienti byli léčeni chlorambucilem. V letech 1996–2017 jsme diagnostikovali v České republice deset pacientů (osm mužů) s HV Richterova syndromu.

Medián doby od diagnózy CLL do diagnózy HV byl 8,4 let (rozsaň 2,6–16,5). Medián věku při diagnóze HV byl 68 let (rozsaň 54–83). Pro nedostatek kvalitního materiálu ze zamražených tkání nebo pro nedostupnost vzorků z doby iniciální diagnostiky B-CLL pouze u jednoho pacienta bylo možné prokázat stejné klonální reorganizování IgH (VH7/DH1/JH6) ze vzorku CLL a současně z buněk HV získaných pomocí mikrodisekce. Sedm pacientů s HV bylo léčeno chemoterapií ABVD (doxorubicin, bleomycin, vinblastin, dakarbazin), z nich dva v kombinaci s rituximabem. Tři pacienti dostali COPP (cyklofosamid, vin-kristin, prokarbazin, prednison). Po chemoterapii byli dva pacienti ozařováni 30 Gy technikou „involved field“.

Výsledky: Po léčbě HV v rámci B CLL byly dosaženy tři kompletní remise, tři parciální remise a čtyři progresse. Následně šest pacientů bylo léčeno dále, u čtyř nemocných v kombinaci s rituximabem. Z deseti pacientů čtyři žijí: tři v kompletní remisi a jeden pacient v parciální remisi. Šest pacientů zemřelo (tři progresse, jeden toxicita léčby, jeden solidní nádor, jeden nejasná příčina). Medián celkového přežití od diagnózy B-CLL byl 207 měsíců a od diagnózy HV byl 42 měsíců.

Závěr: Naše výsledky potvrzují špatnou prognózu Hodgkinovy varianty Richterova syndromu. Současná léčba HV není uspokojivá, proto by bylo vhodné zvážit zařazení nových léků u těchto pacientů.

Práce byla podpořena grantem AZV 16-29857A a výzkumným projektem Univerzity Karlovy v Praze, 3. LF UK v Praze Progres-Q28 a Progres-Q40/08.

P10

ÚSPĚŠNÁ LÉČBA RELAPSU HODGKINOVA LYMFOMU PO AUTOLOGNÍ TRANSPLANTACI BRENTUXIMAB VEDOTINEM – KAZUISTIKA

Marková J., Móčíková H., Gáherová L., Kozák T.
Interní hematologická klinika 3. LF UK a FNKV, Praha

Cíle: Hodgkinův lymfom (HL) patří mezi nejlépe léčitelná onkologická onemocnění. Problémem zůstává léčba recidivujících relapsů (R/R HL). Relaps po vysokodávkované terapii (HDT) následované autologní transplantací periferních kmenových buněk (ASCT) měl ještě nedávno špatnou prognózu (většina pacientů zemřela do 2 let). Cílem nově zařazených léků na bázi imunoterapie, jako je Brentuximab Vedotin (BV) a PD1-check point inhibitory, je zlepšit prognózu těchto pacientů. Uvádíme kazuistiku pacientky s časným

relapsem po ASCT, která byla následně léčena 16 cykly BV bez aloSCT.

Metody: Žena, 32 let, dg. 07/2011 cHL NS, stadium IVB, IPS 3. 08 – 12/2011 byla léčena 6 cykly eskalovaného BEACOPP (eBEA). Restaging (Re) po chemoterapii: metabolická CR a morfoloická PR s PET negativním reziduem v mediastinu (3,5 cm). Radioterapie nebyla provedena. Po 5 měsících (05/2012) byl diagnostikován první relaps (časný).

Terapie: Salvage 2krát DHAP, RT 30 Gy na reziduální tumor, HDT a ASCT (06 – 08/2012). Sto dní po ASCT 12/2012 dosažena PET negativní CR. Druhý relaps CD30 pozitivního cHL byl prokázán po 10 měsících (06/2013). Byl léčen 16 dávkami BV (23. 7. 2013 – 5. 6. 2014).

Výsledky. Po čtyřech dávkách BV byl zaznamenán výrazný efekt, po osmi dávkách dosažena CR s PET/CT negativním nálezem. Komplikací byla polyneuropatie WHO III, která vymizela do roka po ukončené terapii. Pacientka konsolidaci aloSCT odmítla. Třetí CR trvá aktuálně 4 roky (negativní PET/CT 05/2018). Pacientka je ve výborném celkovém stavu.

Závěr: Cílem terapie relapsu po ASCT pomocí BV je dosažení dlouhodobé CR a ne pouze bridge k aloSCT. V současné době není nutné u všech pacientů s relapsem po HDT + ASCT léčených BV indikovat časné alogenní transplantaci, zatím nejsou všeobecně akceptované rizikové faktory, které vedou k dalšímu relapsu. Použití nových inhibitorů PD1 umožňuje odsunout rozhodnutí o aloSCT až do dalšího relapsu HL.

Práce byla podpořena grantem AZV 16-29857A a výzkumným projektem Univerzity Karlovy v Praze, 3. LF UK v Praze Progres-Q28 a Progres-Q40/08.

P11

LYMFOPROLIFERATIVNÍ ONEMOCNĚNÍ PO ORGÁNOVÝCH TRANSPLANTACÍCH U DĚTÍ

Kudrnovská J.¹, Šrámková L.¹, Kabíčková E.¹, Suková M.¹, Kruseová J.¹, Čepelová M.¹, Campr V.², Kynčl M.³, Hubáček P.⁴, Pochop P.⁵, Mejstříková E.¹, Hrušák O.¹, Starý J.¹

¹Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol, Praha

²Ústav patologie a molekulární genetiky 2. LF UK, Praha

³Klinika zobrazovacích metod 2. LF UK FN Motol, Praha

⁴Ústav lékařské mikrobiologie 2. LF UK a FN Motol, Praha

⁵Oční klinika dětí a dospělých 2. LF UK a FN Motol, Praha

Úvod: Vzhledem k přibývajícimu počtu úspěšně transplantovaných dětských pacientů přibývá i široké

spektrum posttransplantačních komplikací, mezi které můžeme zařadit i lymfoproliferativní onemocnění (PTLD). Rizikovými faktory pro vznik této heterogenní skupiny onemocnění je zejména nutnost kombinované imunosupresivní terapie a nízký věk dítěte v době transplantace, který jde ruku v ruce s předtransplantační EBV séronegativitou, s následným rizikem EBV primoinfekce.

Metody: V letech 1999– 2018 jsme na Klinice dětské hematologie a onkologie ve FN Motol léčili devět pacientů pro lymfoproliferativní onemocnění (PTLD) po transplantaci solidních orgánů. Celkem byli léčeni tři pacienti po transplantaci jater (pro biliární atrezií), dva pacienti po transplantaci srdce (pro dilatační kardiomyopatii), tři pacienti po transplantaci ledviny (pro chronické selhání ledvin, polycystické onemocnění jater a ledvin, juvenilní nefronoftózu) a jeden pacient po transplantaci plic (pro cystickou fibrózu). Věk pacientů v době transplantace byl od 8 měsíců do 16 let (medián 6 let). PTLD manifestovali v období od 6 měsíců do 15 let od transplantace (medián 5 let). Mezi nemocnými byli tři případy polymorfni lymfoproliferace, tři případy Hodgkinova lymfomu, tři případy monomorfni lymfoproliferace (difuzní velkobuněčný lymfom, Burkittův lymfom, T-hepatosplenický lymfom). EBV PCR pozitivitu v periferní krvi mělo šest pacientů při manifestaci PTLD, jeden pacient byl EBV negativní, dva pacienti nebyli vyšetřováni. U všech pacientů byla redukována imunosupresivní terapie, dva pacienti byli léčeni rituximabem v monoterapii (jeden z nich navíc intravitreálním podáváním rituximabu při infiltraci duhovky), sedm pacientů podstoupilo chemoterapii, jeden pacient byl léčen radioterapií.

Výsledky: I přes tato léčebná opatření dva pacienti zemřeli (jeden na toxicitu léčby, jeden na rejekci transplantovaného srdce s multiorgánovým selháním), šest pacientů je v trvalé remisi PTLD, jeden pacient aktuálně intenzivně léčen chemoterapií.

Závěr: Lze předpokládat, že incidence posttransplantačních lymfoproliferací bude stále stoupat, avšak díky přibývajícím zkušenostem s terapií těchto onemocnění jsme schopni optimalizovat léčebné postupy a zlepšit prognózu těchto pacientů.

Podpořeno MZ ČR – RVO, FN Motol 00064203.

P12

OSUD NEMOCNÝCH S REFRAKTERNÍM DIFUZNÍM VELKOBUNĚČNÝM LYMFOMEM (DLBCL)

Otáhal P., Janíková A., Belada D., Procházka V., Móciková H., Pirnos J., Ďuraš J., Kopečková K., Campr V., Pytlík R., Blahovcová P., Trněný M.

Kooperativní lymfomová skupina

Cíle: Popsat léčebné výsledky pacientů s refrakterním DLBCL.

Metody: V rámci projektu NiHiL Kooperativní lymfomové skupiny (GovTrial GovTrial No NCT03199066) byli analyzováni nemocní s refrakterním DLBCL. Kritéria byla podobná jako ve studii Scholar 1 (Crump et al. Blood 2017). Zahrnuti byli nemocní léčení v letech 2001–2017 v první linii imunochemoterapií R-CHOP like. Za pacienty s rezistentním DLBCL byli považováni ti, kteří po první linii léčby dosáhli odpovědi pouze stabilní choroby (SD) nebo u nich byla zjištěna progresse, (PD) a dále pacienti, u nichž selhala záchranná léčba platinovým režimem (DHAP, ESHAP, ICE, GDP, GIFOX) a dále pacienti s progresí do 12 měsíců po ASCT. V souboru pacientů bylo sledováno celkové přežití a přežití bez progresse. Křivky přežití byly konstruovány dle Kaplan-Meiera a srovnány log-rank testem.

Výsledky: Z celkem 2634 pacientů s DLBCL z období 2001–2017 bylo 163 pacientů primárně rezistentní na 1. linii léčby CHOP-like režimem, 31 pacientů bylo rezistentních po záchranné terapii platinovým režimem v relapsu a 16 pacientů zprogredovalo do 12 měsíců po ASCT. Analyzovaný soubor celkem tak zahrnuje 210 pacientů s rezistentním DLBCL. V době zjištění onemocnění byl věkový medián nemocných 65 let (22–91), 54 % byli muži, 74 % mělo pokročilé klinické stadium (III+IV), 68 % mělo IPI > 3, 77 % mělo vyšší LDH, 45 % mělo tumor > 10 cm. Medián celkového přežití (OS) od stanovení refrakterního onemocnění byl pouze půl roku (0,53) a medián PFS 0,29 roku. Nemocní mladší 65 let měli medián přežití 0,8 roku proti 0,4 roku u nemocných starších 65 let.

Závěr: Naše výsledky ukazují, že rezistentní DLBCL má extrémně špatnou prognózu a je nezbytná nová terapeutická strategie pro tyto nemocné včetně snahy identifikace nemocných s vysokým rizikem selhání léčby již před jejím zahájením.

Podpořeno výzkumným záměrem Progres-Q28-9.

P13

PREDIKCE CELKOVÉHO PŘEŽITÍ U PACIENTŮ S FOLIKULÁRNÍM LYMFOMEM VYSOKÉHO VĚKU: SROVNÁNÍ DVOU PROGNOTICKÝCH MODELŮ

Ďuraš J.^{1,2}, Hájek R.^{1,2}, Dlouhá J.³, Campr V.¹⁴, Janíková A.⁴, Móciková H.⁵, Belada D.⁶, Pirnos J.⁷, Procházka V.⁸, Starostka D.⁹, Pokorná P.¹⁰, Stejskal L.¹¹, Jakešová J.¹², Karlová J.¹³, Trněný M.³

¹Klinika hematologie FN, Ostrava

²Lékařská fakulta OU, Ostrava

³I. interní klinika 1. LF UK a VFN, Praha

⁴Interní hematologická a onkologická klinika FN, Brno

⁵Interní hematologická klinika FNKV, Praha

⁶IV. interní hematologická klinika FN, Hradec Králové

⁷Onkologické oddělení, Nemocnice České Budějovice

⁸Hematoonkologická klinika FN, Olomouc

⁹Oddělení klinické hematologie, Nemocnice Havířov

¹⁰Radioterapeuticko-onkologické oddělení FN Motol, Praha

¹¹Hematologicko-transfuzní oddělení, Slezská nemocnice v Opavě

¹²Oddělení onkologie, Oblastní nemocnice Příbram

¹³Oddělení klinické hematologie, Krajská nemocnice Liberec

¹⁴Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN Motol, Praha

Úvod: Nejpoužívanějším prognostickým indexem u folikulárního lymfomu (FL) je index FLIPI. K predikci celkového přežití (OS) pacientů velmi vysokého věku byl navržen index eFL založený na zhodnocení tří rizikových faktorů (RF): mužské pohlaví, anemie (hemoglobin < 120 g/l) a přítomnost B-symptomů (1).

Cíle: Ověření indexu eFL v predikci celkového přežití u pacientů s FL vysokého věku a porovnání uvedeného modelu s indexem FLIPI na datech registru Kooperativní lymfomové skupiny.

Metody: Do analýzy byli zahrnuti pacienti s FL grade 1 až 3 a starší 80 let v době diagnózy. Křivky OS byly kalkulovány s použitím Kaplan-Meierovy metody se srovnáním přežití jednotlivých rizikových skupin log-rank testem. V databáze bylo identifikováno 76 pacientů s mediánem věku 82 let (80–90). Klinické stadium III–IV bylo u 70 % (53/76), elevace LDH u 40 % (31/76), ECOG ≥ 2 u 25 % (19/76) pacientů.

Výsledky: Podle indexu eFL bylo nízké riziko (žádný RF), střední riziko (1 RF) a vysoké riziko (2–3 RF) přítomné u 36 % (27/76), 47 % (36/76), resp. 17 % (13/76) pacientů. Podle indexu FLIPI bylo nízké, střední a vysoké riziko u 12 % (9/76), 32 % (24/76), resp. 51 % (39/76) pacientů, u čtyř pacientů nebylo FLIPI stanoveno. Při mediánu sledování 43 měsíců byl medián OS 81,7 (95% CI: 55,3 – nedosaženo) vs. 37,9 (95% CI: 16,3–72,2) vs. 18,2

(95% CI: 6,1-86,1) měsíců ve skupině s nízkým, středním a vysokým rizikem podle indexu eFL a 134,4 (95% CI: 72,2-149,2) vs. 57,9 (95% CI: 27,5-86,1) vs. 37,7 (95% CI: 21,9-94,9) měsíců dle indexu FLIPI. Rozdíl v mediánu OS byl spojen s trendem k statistické významnosti ($p = 0,1375$) při rozdělení dle indexu eFL. Při rozdělení podle FLIPI nebyl rozdíl statisticky významný ($p = 0,3225$), výsledky jsou limitovány velmi pravděpodobně ale velikostí souboru.

Závěr: Jednoduchý rizikový index eFL může být pravděpodobně použit k prognostické stratifikaci pa-

cientů s FL vysokého věku. Ve srovnání s indexem FLIPI model pravděpodobně lépe distribuuje i separuje pacienty jednotlivých prognostických skupin. Výsledky práce jsou limitovány velikostí souboru.

Práce byla podpořena MZ ČR 16-31092A.

LITERATURA

1. Nabhan C, et al. Br. J Haematol 2015; 170(1): 85-95.

MNOHOČETNÝ MYELOM

P14

PLASMA CELL DYSCRASIAS AND BONE MARROW MICROENVIRONMENT

Flodr P.¹, Minařík J.², Flodrová P.¹, Pika T.², Krhovská P.², Bačovský J.²

¹Department of Clinical and Molecular Pathology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc, Czech Republic

²Department of Hemato-oncology, University Hospital Olomouc, Czech Republic

Aim: Neoplastic niche is an important both cellular and noncellular microenvironment for a growth, retention/adhesivity, survival, resistency or sensitivity to a therapeutic approach in all malignant diseases. We contextually studied neoplastic cells and their non-neoplastic supportive tissue in multiple myeloma (MM and SMM) and MGUS samples according to an expressions of 16 proteins – MIP1alfa, Annexin A2, TRAP, DKK-1, RANK, RANKL, OPG, Sclerostin, Activin A, NFkappaB proteins (p50, p52, p65), p62, MMP9, RUNX2 and SQSTM.

Methods: Bone marrow trephine biopsy specimens (n = 96) with multiple myeloma (de novo and relapsed) and MGUS were included in our prospective study. FFPE tissues were processed in app. 5µm sections and placed on plus charged slides. The indirect immunohistochemistry was applied after antigen retrieval. Primary antibodies were used for the detection of observed proteins. Standard secondary antibody and ABC method were included in visualisation. The detected expressions were analysed.

Results: Bone marrow specimens showed variable positivity of observed proteins with high levels in MIP1alfa, Annexin A2, RANK, RANKL, Sclerostin, p52 (cytoplasmic), p62 (cytoplasmic), p65 (cytoplasmic), RUNX2, SQSTM and low levels in TRAP, DKK-1, OPG, Activin A, p50 cytoplasmic, MMP9.

Conclusion: The exact and contextual knowledge of engaged signaling pathways and their plasticity may suggest more specific or tailored therapeutic approaches with neutralizing antibodies (e.g. anti-RANKL, anti-DKK-1, anti-Sclerostin, anti-Activin A) in each individual case with corresponding regressive, stable or progressive behavior (disease stage, bone fractures, osteoblast dysfunction, permissive bone marrow microenvironment with progression from MGUS through SMM to overt MM and drug resistance or sensitivity)

mirrored in complex interactions between multiple cell types, both neoplastic and non-neoplastic origin. Understanding the underlying mechanisms may bring better detection and control of plasma cell dyscrasias from and early stages.

Supported by MH CZ – DRO (FNOL00098892).

P15

PRVNÍ ZKUŠENOSTI S VENETOCLAXEM U PACIENTŮ S RELABOVANÝM/REFRAKTERNÍM MNOHOČETNÝM MYELOMEM

Popková T.¹, Jelínek T.^{1,2,3}, Plonková H.¹, Szeligová L.¹, Benková K.^{1,2}, Kořístek Z.^{1,2}, Zuchnická J.¹, Navrátil M.¹, Ďuraš J.^{1,2}, Gumulec J.^{1,2}, Growková K.^{1,2,3}, Šimíček M.^{1,2,3}, Hájek R.^{1,2,3}

¹Klinika hematologie FN, Ostrava

²Lékařská fakulta OU, Ostrava

³Katedra biologie a ekologie, Přírodovědecká fakulta OU, Ostrava

Úvod: Venetoclax je selektivní inhibitor antiapoptického proteinu BCL-2 (B-cell lymphoma 2). Potenciace účinku venetoclaxu bortezomibem a dexamethasonem byla testována v klinické studii fáze Ib (Moreau Blood 2017) na 66 pacientech s relabovaným/refrakterním mnohočetným myelomem (RRMM), kde ORR bylo 67 % a medián TTP 9,5 měsíců. Venetoclax je pacientům s RRMM přístupný díky Named Patient Programu (NPP). Ten umožňuje žádat farmaceutickou firmu o lék pro pacienta s vyčerpanými možnostmi léčby.

Cíle: Vyhodnotit první zkušenosti s venetoclaxem a jeho kombinací s bortezomibem a dexamethasonem u MM v ČR, ověřit schůdnost NPP v praxi a analyzovat prediktivní přínos exprese Bcl2/BclXL a Bcl2/Mcl.

Metody: Od zavedení NPP do praxe v červenci 2017 byl Venetoclax podán u pěti pacientů s RRMM s mediánem věku 65 let a s mediánem sedm předchozích linií. Žádný z pacientů neměl pozitivní t(11,14). Nemocní byli léčeni nejprve monoterapií venetoclaxem s navyšováním dávky 400 mg, 800 mg a 1200 mg denně ve 21denním cyklu. Dále byl přidán dexamethason 40 mg týdně a bortezomib 1,3 mg/m² týdně. V trojkombinaci byl venetoclax redukován na 800 mg denně. Před začátkem režimu byl proveden odběr kostní dřeně pro stanovení poměru exprese Bcl2/BclXL a Bcl2/Mcl1.

Výsledky: U dvou pacientů zatím odpověď nebyla hodnocena (< 3 cykly). Celková léčebná odpověď byla 66% (2/3). Oba reagující pacienti dosáhli VGPR až po přidání bortezomibu do kombinace. Všichni pacienti byli předléčeni bortezomibem. Léčba je dobře tolerována i při probíhajícím osmém, respektive desátém cyklu. Jedna pacientka ukončila léčbu pro progresi.

Hodnocení prediktivního významu exprese sledovaných antiapoptických proteinů bude provedeno po navýšení počtu nemocných v souboru.

Závěr: V našem souboru s mediánem sedm předchozích linií byla léčebná odpověď při kombinaci venetoclax/dexamethason/bortezomib pozorovaná u dvou ze tří nemocných, a to i při negativitě t(11,14). Velmi pravděpodobně má na odpověď zásadní vliv synergismus mezi venetoclaxem a bortezomibem. Na příkladě venetoclaxu demonstrujeme možnost získat účinný lék neschválený v ČR pro nemocné s pokročilým MM po vyčerpání dostupných léčebných možností.

P16

CIRKULUJÍCÍ PLAZMATICKÉ BUŇKY U MNOHOČETNÉHO MYELOMU

Bezděková R.¹, Šebelová B.¹, Králová R.¹, Stejskalová M.¹, Všianská P.¹, Krejčí M.², Penka M.¹, Říhová L.¹

¹Oddělení klinické hematologie FN, Brno

²Interní hematologická a onkologická klinika FN, Brno

Úvod: Mnohočetný myelom (MM) je charakterizován akumulací klonálních plazmatických buněk (PC) v kostní dřeni (KD). PC nezřídka expandují do periferní krve (PK), kdy jsou označovány jako cirkulující PC (cPC). Přítomnost cPC u nově diagnostikovaných MM je nezávislým negativním prognostickým znakem, byla prokázána asociace s kratším přežitím a možnost predikce časného relapsu. Jejich další analýza může ozřejmit budoucí chování PC.

Cíl: Analýza zastoupení a fenotypového profilu cPC a PC u MM pacientů.

Metody: Pomocí polychromatické průtokové cytometrie byly detekovány PC v PK i KD u 107 nově diagnostikovaných MM pacientů. Byla stanovena exprese a medián intenzity fluorescence (MFI) adhezivní molekuly CD56 a stanovena klonalita PC v KD.

Výsledky: cPC byly detekovány u 64,5 % (69/107) pacientů s mediánem zastoupení 0,02 % (rozsah 0,00 až 22,4). U cPC+ pacientů bylo < 1 % cPC detekováno u 82,6 % (57/69) pacientů, naopak ≥ 20 % cPC bylo nalezeno u 58 %

(4/69) pacientů. U cPC+ pacientů bylo % cPC významně nižší než infiltrace PC v KD (0,1 vs. 9,3; p < 0,001). Také bylo nalezeno významné snížení MFI CD56 mezi PK a KD u cPCs+ pacientů (2415,5 vs. 4355,8; p < 0,001), ale % CD56+ PC bylo podobné v PK a KD (98,9 vs. 98,4 %). U cPC+ pacientů byla též významně vyšší infiltrace PC v KD (9,3 vs. 2,7 %; p < 0,001) a méně polyklonálních PC (nPC) (0,4 vs. 1,7; p < 0,001) v porovnání s cPC- pacienty, nicméně % CD56+ PC a MFI CD56 se u obou skupin nelišily (96,1 vs. 98,4 % a 4985,5 vs. 4355,8).

Závěr: Cirkulující PC nejsou detekovatelné u všech pacientů s MM, jejich přítomnost koreluje s vyšší infiltrací KD a sníženým počtem zbytkových nPC. Nebyly zjištěny změny v CD56 pozitivitě a MFI korelující s pravděpodobností vycestování PC, takže tento marker není informativní a pravděpodobně se na extramedulárním šíření podílejí další molekuly.

Podpořeno granty AZV MZ ČR 17-30089A a 17-29343A.

P17

BENDAMUSTIN V LÉČBĚ PACIENTŮ S RELABUJÍCÍM/REFRAKTERNÍM MNOHOČETNÝM MYELOMEM V ČR – DATA Z REGISTRU RMG

Machálková K., Maisnar V., Brožová L., Radocha J., Beranová K., Žák P.

IV. interní hematologická klinika FN, Hradec Králové

Cíle: Bendamustin je registrován v České republice pro nemocné s mnohočetným myelomem od roku 2010. Na našem souboru jsme hodnotili výsledky léčby bendamustinem mimo klinické studie u pacientů s relabujícími/refrakterními myelomem. Celkem se jedná o 66 nemocných (jeden absolvoval 2 linie léčby bendamustinem, tj. celkově 67 léčebných linií).

Metody: Byly analyzovány výsledky léčby bendamustinem u nemocných z devíti hematologických center v České republice od roku 2009 do února 2018, zdrojem dat byl Registr monoklonálních gamapatií (RMG).

Výsledky: Medián věku zahájení léčby byl 66 let, ve většině případů se jednalo o výrazně předléčené nemocné (medián počtu předchozích linií - 4). Nejčastěji byla použita dvojkombinace bendamustinu s kortikoidem, nejčastěji dexamethasonem. Medián délky léčby byl 3,3 měsíce. Finální léčebná odpověď byla samozřejmě ve většině případů progresse (65,5%), nicméně alespoň přechodné léčebné odpovědi bylo dosaženo

POSTEROVÁ SEKCE

u více než 1/3 nemocných. Medián OS od zahájení léčby byl 10,2 měsíce, medián PFS 5 měsíců. Z nežádoucích účinků (více než grade 3) dominuje hematologická toxicita.

Závěr: I výrazně předlčení nemocní s R/R MM mohou profitovat z léčby bendamustinem. V nejčastěji používané kombinaci s kortikoidem jde o dobře tolerovaný režim se zvládnutelnou toxicitou.

P18

GENETICKÁ DIAGNOSTIKA MNOHOPOČETNÉHO MYELÓMU V RUTINNEJ PRAXI – SKÚSENOSTI LABORATÓRIA

Žákovičová A.¹, Juríková K.¹, Žideková L.¹, Tóthová A.¹, Lukačková R.¹, Lengyelová K.¹, Blahová A.¹, Oravcová A.¹, Farkaš F.², Mistrík M.³, Harrachová D.², Valchálková C.², Szépe P.³, Gbúrová K.⁴, Leitnerová M.⁵

¹Oddelenie Genetiky, Medirex, Bratislava

²UNB Nemocnica sv. Cyrila a Metoda, Bratislava

³Martinské bioptické centrum, s. r. o., Martin

⁴Oddelenie laboratórnej medicíny UNLP, Košice

⁵Oddelenie genetiky NOŮ, Bratislava

Úvod: Mnohopočetný myelóm (MM) je geneticky heterogénne ochorenie. Mnohé rekurentné genetické abnormality sú prítomné od počiatkových až po koncové štádiá ochorenia, naopak niektoré vznikajú až neskôr v priebehu ochorenia. Tieto abnormality majú výpovednú hodnotu pri stanovení cytogenetických rizikových skupín v závislosti od štádia ochorenia.

Ciel: Cieľom prezentácie je poukázať na cytogenetickú klasifikáciu MM, laboratórne vyšetrovacie stratégie a ich výstupy do diagnostickej praxe na súbore pacientov.

Metódy: Vstupným materiálom pre genetické vyšetrenie MM v našom laboratóriu je kostná dreň. Heparinizovaná kostná dreň sa následne spracuje magnetickou separáciou založenou na pozitívnej selekcii CD138+ buniek. Vyseparovaná populácia plazmocytov sa podrobí FISH analýze, kde vyšetrujeme primárne (hyperdiploidie, delécie 13q, translokácie IGH génu a jeho fúznych partnerov) a sekundárne chromozómové aberácie (delécie TP53 génu, zisky 1q, delécie 1p, MYC prestavby). Z kostnej drene v K3EDTA alebo Tempus skúmavkách sa molekulovo-genetickými analýzami vyšetruje expresia cyklínového génu CCND1. Pri diferenciálnej diagnostike Waldenströmovej makroglobulí-

némie a MM hrá kľúčovú úlohu vyšetrenie mutačného stavu génu MYD88 a CXCR4.

Záver: Genetické vyšetrenie je dôležité pri klasifikácii a stratifikácii rizika pacientov so smoldering myeloma (SMM) a MM, čoho je dôkazom aj inkorporácia high-risk cytogenetických abnormalít do Revised International Staging System for Multiple Myeloma.

P19

VÝSLEDKY DRUHÉ AUTOLOGNÍ TRANSPLANTACE U MNOHOČETNÉHO MYELOMU

Minařík J.¹, Faber E.¹, Raida L.¹, Szotkowski T.¹, Skoumalová I.¹, Pika T.¹, Krhovská P.¹, Bačovský J.¹, Zapletalová J.², Papajík T.¹, Ščudla V.¹

¹Hemato-onkologická klinika LF UP a FN, Olomouc

²Oddělení biofyziky a statistiky LF UP a FN, Olomouc

Cíle: Cílem je posouzení léčebné odezvy a intervalů přežití u nemocných s mnohočetným myelomem (MM) podstupujících druhou (netandemovou) autologní transplantaci křvetvorných buněk (ASCT).

Metody: Posuzováno bylo celkem 62 nemocných. Režimy pro conditioning zahrnovaly BEM (BCNU, etoposid a melfalan), BuMel (busulfan, melfalan) či vysokodávkovaný melfalan. Reindukční režimy zahrnovaly konvenční chemoterapii – režim CAD (cyklofosamid, adriamycin, dexametazon) ve 27 %, bortezomibové (BTZ) režimy v 31 % a thalidomidové (THAL) režimy v 18 %, zbylí nemocní obdrželi lenalidomidové (LEN) režimy, polychemoterapii nebo žádnou reindukci. Posuzována byla doba do progresu (progression free survival – PFS) a léčebná odezva včetně dosažení kompletních remisí (CR), velmi dobrých parciálních remisí (VGPR), parciálních remisí (PR), minimální léčebné odpovědi (MR), stabilního onemocnění (SD) či progresu (PG), jak před ASCT, tak v den +100 po ASCT. Výsledky byly korelovány ke stážovacímu systému dle Durie-Salmona (DS), mezinárodnímu prognostickému indexu (international scoring system – ISS) a k použité reindukční léčbě.

Výsledky: Léčebná odezva před druhou ASCT byla následující: CR 6,9%, VGPR 3,4%, PR 37,9%, MR+SD 19% a PG v 32,8% a po ASCT: CR 26,7%, VGPR 13,3%, PR 38,3%, MR+SD 8,3% a PG 13,3%. Medián PFS dosahoval 20 měsíců. Byl vysledován vztah léčebné odezvy k PFS (CR 34,8 měsíců, VGPR 22,5 měsíců, PR 33,1 měsíců, MR a SD 18,8 měsíců, PG 6,6 měsíců, $p < 0,0001$). Nebyl nalezen vztah PFS ke stážovacím systémům ani k po-

užitému reindukčnímu režimu. Naznačen byl trend lepšího PFS u nemocných podstupujících ASCT pro první relaps než pro vyšší relaps onemocnění.

Závěry: Použití druhé ASCT pro relaps MM je účinnou léčebnou modalitou, srovnatelnou s výsledky u nových léků s biologickým mechanismem účinku. Navzdory nižší předtransplantační léčebné odezvě byly výsledky v den +100 s vysokým procentem kompletních remisí. Hodnocené stážovací systémy (DS, ISS) ani použitý reindukční režim neměly vliv na léčebnou odezvu po druhé ASCT.

Za podpory grantu IGA-LF-2018-004 a MZ ČR – RVO (FNOL 00098892).

P20

VÝZNAM PRVNÍ AUTOLOGNÍ TRANSPLANTACE U MNOHOČETNÉHO MYELOMU V ÉRE KONVENČNÍ CHEMOTERAPIE A NOVÝCH LÉKŮ S BIOLOGICKÝM MECHANISMEM ÚČINKU

Minařík J.¹, Faber E.¹, Raida L.¹, Szotkowski T.¹, Skoumalová I.¹, Pika T.¹, Krhovská P.¹, Bačovský J.¹, Zapletalová J.², Papajík T.¹, Študla V.¹

¹Hemato-onkologická klinika LF UP a FN, Olomouc

²Oddělení biofyziky a statistiky LF UP a FN, Olomouc

Cíl: Cílem sdělení je posouzení výsledků první autologní transplantace krvetvorných buněk (ASCT) u nemocných s mnohočetným myelomem (MM) v éře konvenční chemoterapie a v období terapie novými léky s biologickým mechanismem účinku.

Metody: Posuzovali jsme celkem 274 nemocných s MM, kteří podstoupili první ASCT. Hodnocena byla léčebná odezva a doba do progresu (progression free survival – PFS) ve vztahu k indukční terapii, stadiu dle Durie-Salmona (DS) a mezinárodního prognostického indexu (international scoring system – ISS), a ve vztahu k dosažené léčebné odezvě a udržovací léčbě. Léčebné strategie zahrnovaly indukční režimy VAD (vincristin, adriamycin, dexametazon), thalidomidové (THAL) režimy, bortezomibové (BTZ) režimy, polychemoterapii a lenalidomidové (LEN) režimy. 163 nemocných (59 %) obdrželo udržovací léčbu, většinou interferonem (32 %), konvenční chemoterapií (11 %) nebo pomocí THAL (9 %).

Výsledek: Medián PFS byl 35 měsíců. Nemocní s hlubší léčebnou odezvou měli signifikantně lepší mediány PFS: kompletní remise 48 měsíců, velmi dobrá parciální remise 36 měsíců, parciální remise 33 měsíců, minimální odpověď a stabilní onemocnění 13 měsíců,

progresivní onemocnění 9 měsíců, $p < 0,0001$. ASCT setřela negativní prognostický dopad vyššího ISS, nepřekonal však DS s horšími mediány PFS u vyššího stadia onemocnění (stadium I – 58 měsíců, II – 42 měsíců, III – 31 měsíců, $p = 0,012$). Nové léky (THAL, BTZ a LEN) vedly k lepší léčebné odezvě před ASCT i v den +100 po ASCT, nebyl však signifikantní rozdíl v celkovém PFS. Udržovací léčba pomocí chemoterapie, interferonu či THAL nevedla ke zlepšení PFS.

Závěry: ASCT je nadále zlatým standardem v léčbě MM. Nové léky s biologickým mechanismem účinku napomáhají dosažení vyšší předtransplantační léčebné odezvy, jako hlavní výhoda oproti konvenční chemoterapii se jeví především možnost dosažení rychlejšího efektu s minimem nežádoucích účinků, umožňující poskytnutí ASCT širšímu spektru nemocných. Udržovací léčba pomocí starších léčebných modalit včetně interferonu, thalidomidu či posttransplantační chemoterapii nemá vliv na prodloužení PFS.

Podpořeno granty IGA-LF-2018-004 a MZ ČR – RVO (FNOL 00098892).

P21

VÝZNAM DOSAŽENÍ IMUNOFENOTYPOVÉ KOMPLETNÍ REMISE U PACIENTŮ S MNOHOČETNÝM MYELOMEM PO AUTOLOGNÍ TRANSPLANTACI PERIFERNÍCH KMENOVÝCH BUNĚK – PILOTNÍ STUDIE

Beranová K., Radocha J., Machálková K., Maisnar V. IV. interní hematologická klinika FN, Hradec Králové

Úvod: Dosažení negativity minimální reziduální nemoci (MRN) u mnohočetného myelomu se stalo novým cílem léčby. V současnosti existují dvě možnosti stanovení MRN, v prvním případě využívající přítomnosti molekulárně-genetických změn, ve druhém na průkazu klonu pomocí průtokové cytometrii. Cílem naší práce bylo zhodnocení významu dosažení imunofenotypové kompletní remise (iCR) u našich pacientů po autologní transplantaci periferních kmenových buněk (PKB).

Metoda: Do prospektivní studie prognostického významu MRN byli zařazeni pacienti s mnohočetným myelomem, kteří podstoupili autologní transplantaci periferních kmenových buněk (PKB) v rámci léčby 1. linie v období od ledna 2014 do dubna 2018. Všichni pacienti byli jednotně předlčení indukční chemoterapii s proteazomovým inhibitorem a následně vysokodávkovanou chemoterapii Mel 200. MRN status byl vyhodnocen

POSTEROVÁ SEKCE

osmibarevnou průtokovou cytometrií z aspirátu kostní dřeně 1 měsíc po ukončení autologní transplantace PKB u pacientů, kteří dosáhli minimálně VGPR. Citlivost použité metody byla v našem případě 10-4.

Výsledky: Do sledování bylo zatím zahrnuto 66 pacientů, kteří splnili výše uvedená kritéria (37 mužů a 29 žen), medián věku byl 61 let; 64 % pacientů (42/66) dosáhlo iCR a 36 % pacientů (24/66) zůstalo iCR pozitivních. Medián doby sledování kohorty byl 24 měsíců (9-57). 26 % pacientů (17/66) během doby sledování již zrelabovalo, z toho bylo 21 % pacientů v iCR (9/42) a 33 % pacientů bez iCR (8/24). Medián PFS u obou sledovaných skupin v době vyhodnocení nebyl dosažen. Nicméně je přítomen trend delšího PFS u pacientů v imunofenotypové kompletní remisi ($p = 0,1015$, log-rank).

Závěr: Dosažení iCR s citlivosti metody 10-4 je spojeno s delší dobou do progresu ve srovnání s konvenční kompletní remisí. Dosažení iCR minimálně na této úrovni by se tak mělo stát novým cílem léčby mnohočetného myelomu.

Na sjezdu budou prezentována aktuální data k měsíci 9/2018.

P22

AUTOLOGNÍ TRANSPLANTACE S REDUKOVANOU PŘEDTRANSPLANTAČNÍ PŘÍPRAVOU U PACIENTŮ S MNOHOČETNÝM MYELOMEM VE VYŠŠÍM VĚKU – TOXICITA VS. EFEKTIVITA

Jungová A.¹, Havlová E.², Zábranská T.¹, Lysák D.¹, Jindra P.¹

¹Hematologicko-onkologické oddělení FN, Plzeň

²Ústav klinické biochemie a hematologie FN, Plzeň

Úvod: Mnohočetný myelom (MM) je jedno z častých hematologických onemocnění, jehož incidence neustále vzrůstá. Přes významný pokrok ve vývoji léků zůstává základním pilířem léčby autologní Tx. Standardně se podává melphalan v dávce 200 mg/m² u mladších pacientů z důvodu rizika toxicity. U starších se dávka redukuje na 100-180 mg/m² dle celkového stavu. Cílem bylo porovnání délky hospitalizace, komplikací a vliv na PFS a OS.

Metoda: Retrospektivní analýza u 179 pacientů s MM konsekutivně transplantovaných na HOO FN Plzeň mezi roky 2013-2017. Hodnocena byla data po první Tx. U všech pacientů byl podáván pouze melphalan v rámci přípravy.

Výsledky: Soubor 179 pacientů byl rozdělen podle věku. Ve skupině > 67 let (A) bylo celkem 47 pacientů s mediánem věku 70 let (67-75), zatímco skupinu mladších 67 let v době Tx (B) představovalo 133 pacientů s mediánem věku 59 let (41-66). V základních parametrech kromě věku nebyl statistický rozdíl. Ve skupině A byla průměrná dávka melphalanu 154 mg/m², ve skupině B pak 188 mg/m². Medián hospitalizace byl ve skupině A 15 dnů (14-28), ve skupině B 16 dnů (13-63). Engraftment byl stejný. Porovnatelná byla GIT toxicita-medián grade I (0-IV), ve skupině A se nevyskytla závažnější komplikace než grade III, ve skupině B grade III+IV jen u 2 %. Infekční komplikace ve skupině A poměrně ojedinělé, medián grade 0 (0-II), bez výskytu závažnějších infekčních komplikací, ve skupině B jen 1% velmi závažných infekcí (grade III+IV), medián grade I (0-IV). Z analýzy nebyl patrný vliv snížené dávky melphalanu na PFS ani OS. Medián PFS byl ve skupině A 20 měsíců ve skupině B pak 15 měsíců ($p = 0,28$, HR 0,77, CI 0,51-1,17). Medián OS nebyl ve skupině A dosažen, ve skupině B byl 40 měsíců ($p = 0,23$, HR 0,66, CI 0,36-1,22).

Diskuze: Autologní Tx je nedílnou součástí léčby u pacientů s MM. Dosud bylo standardem využití u mladších pacientů, ale dle našich dat i starší pacienti mohou být transplant eligible a při stejném riziku toxicity lze dosáhnout stejných výsledků jako u mladších včetně PFS a OS. Take message home: Autologní Tx s redukovanou dávkou i u pacientů nad 70 let efektivnější než režimy na bázi „nových léků“.

P23

SROVNÁNÍ RADIODIAGNOSTICKÝCH METOD (KONVENČNÍ RADIOGRAFIE, “LOWDOSE” POČÍTAČOVÉ TOMOGRAFIE A CELOTĚLOVÉ MAGNETICKÉ REZONANCE) S UKAZATELI SIGNÁLNÍCH DRAH MYELOMOVÉ KOSTNÍ NEMOCI

Krhovská P.¹, Heřmanová Z.², Hrbek J.³, Heřman M.³, Petrová P.⁴, Zapletalová J.⁵, Pika T.¹, Bačovský J.¹, Ščudla V.¹, Minařík J.¹

¹Hemato-onkologická klinika LF UP a FN, Olomouc

²Ústav imunologie LF UP a FN, Olomouc

³Radiologická klinika LF UP a FN, Olomouc

⁴Oddělení klinické biochemie LF UP a FN, Olomouc

⁵Ústav lékařské biofyziky LF UP, Olomouc

Cíle: Cílem naší studie bylo srovnat rozsah kostního postižení (MBD) u nemocných s mnohočetným myelomem (MM) hodnoceným pomocí radiodiagnostických

metod, tedy konvenční radiografií (RTG), “low-dose” počítačovou tomografií (LD-CT) a celotělovou magnetickou rezonancí (WBMR), s vybranými ukazateli kostního metabolismu a mikroprostředí kostní dřene.

Metody: Náš soubor se sestával z 81 nemocných s nově diagnostikovaným MM. U všech bylo provedeno rentgenové vyšetření skeletu, celotělové LD-CT a celotělové WB-MR. Vybrali jsme 10 parametrů mikroprostředí kostní dřene, u kterých je prokázáno, že se podílejí na vzniku MBD.

Z kostních parametrů a ukazatelů mikroprostředí kostní dřene byly v trepanobiopsii posuzovány: osteoprotegerin (OPG), zánětlivý makrofágový protein 1 α (MIP-1 α), aktivátor receptoru nukleárního faktoru kappa B (RANK) a jeho ligand (RANKL), Annexin A2, Activin A, tartrate-rezistentní kyselá fosfatáza (TRAP), Dickkopf related protein-1 (DKK-1), Runt-related transcription faktor 2 (Runx2) a matrixová metalloproteináza-9 (MMP-9). Ke stanovení těchto parametrů byly použity metody imunohistochemie. Ke statistickému zhodnocení byla použita Spearmanova korelační analýza a post-hoc test dle Dunnové na hranici významnosti $p < 0,05$.

Výsledky: Byla nalezena pozitivní korelace mezi rozsahem kostního postižení hodnocenému dle LD-CT a hodnotami MIP-1 α ($kk = 0,306$, $p = 0,035$) s tendencí k vyšším hladinám DKK-1 a MMP-9 u pacientů s pokročilým postižením na LD-CT. U ostatních pozorovaných parametrů nebyla prokázána signifikantní korelace, stejně tak nebyla prokázána souvislost mezi WB-MR a hodnotami zkoumaných působků.

Závěr: Stanovení rozsahu kostního postižení u nemocných s MM dle RTG není příliš specifické, především pokud se jedná o oblast páteře. Neproklázali jsme korelaci mezi RTG vyšetřením a hodnotami, které reflektují kostní obrat.

Byla prokázána korelace mezi následujícími parametry kostního metabolismu a rozsahem myelomové kostní choroby: MIP-1 α , DKK-1 a MMP-9. Většina těchto působků nekoreluje se zobrazovacími technikami. To podporuje předpoklad, že kostní osteomarkery spíše zrcadlí aktuální aktivitu kostního vzplanutí než rozsah osteolytického postižení.

Podpořeno granty MZ ČR – RVO (FNOL, 00098892), IGA_LF_2018_004.

P24

VÝSLEDKY LÉČBY PACIENTŮ S MNOHOČETNÝM MYELOMEM NA KLINICE HEMATOONKOLOGIE FAKULTNÍ NEMOCNICE OSTRAVA ZA ROK 2017

Plonková H.¹, Jelínek T.^{1,2,3}, Szeligová L.¹, Popková T.¹, Kořístek Z.^{1,2}, Zuchnická J.¹, Navrátil M.¹, Ďuraš J.^{1,2}, Gumulec J.^{1,2}, Hájek R.^{1,2}

¹Klinika hematooonkologie FN, Ostrava

²Lékařská fakulta, Ostravská univerzita, Ostrava

³Katedra biologie a ekologie, Přírodovědecká fakulta OU, Ostrava

Úvod: Léčba mnohočetného myelomu (MM) na Klinice hematooonkologie FN Ostrava je vedena v souladu s doporučením pro diagnostiku a léčbu MM vydaným Českou myelomovou skupinou. Mimo standardní režimy v terapii využíváme inovativní léčiva v klinických studiích se záměrem zlepšit efekt léčby a prognózu pacienta. Cílem předkládané práce je hodnocení léčby pacientů s MM na našem pracovišti za rok 2017.

Metody: V roce 2017 bylo na Klinice hematooonkologie FN Ostrava léčeno 106 pacientů s MM ve 145 liniích léčby. Soubor zahrnoval nemocné v mediánu věku 67 let, muže a ženy 1,2 : 1. ISS stadia nemoci odpovídala standardnímu zastoupení. U 14,5 % pacientů bylo přítomno významné renální selhání. Léčba nově diagnostikovaného myelomu (NDMM) probíhala v 52 (35,9 %) liniích. Devadesát tři (64,1 %) léčebných linií bylo podáno pro relaps nebo rezistenci onemocnění (RRMM). V primoterapii byl nejčastěji použit režim bortezomib, thalidomid a dexametazon VTD (75,0 %), pro RRMM režim ixazomib, lenalidomid a dexametazon IRD (25,8 %) – ixazomib v rámci Named Patient Program. Inovativní léky podané pro RRMM zahrnovaly pomalidomid (11,8 %), carfilzomib (9,7 %), daratumumab (3,2 %), panobinostat (3,2 %), venetoclax (3,2 %), nivolumab (3,2 %), isatuximab (2,2 %) a ibrutinib (2,2 %). Autologní transplantaci kmenových buněk podstoupilo 27 (51,9 %) pacientů s NDMM, a 3 (3,2 %) pacienti s RRMM.

Výsledky: Léčebná odpověď byla hodnocena u 101 ukončených linií léčby. U pacientů s NDMM bylo dosaženo ORR 77,8 % (CR 20,0 %, VGPR 31,1 %, PR 26,7 %) a v léčbě RRMM ORR 64,3 % (CR 10,7 %, VGPR 23,2 %, PR 30,4 %). Toxicita léčebných režimů byla akceptovatelná. Většina nežádoucích účinků odpovídala ≤ 2 stupni. Nežádoucí účinky ≥ 3 stupně zahrnovaly infekci (11,5 %), neutropenii (9,6 %), anemii (9,6 %) a periferní neuropatii (5,8 %) v režimech pro NDMM a neutropenii (21,5 %), trombocytopenii (12,9 %), infekci (11,8 %) a anemii (7,5 %) v režimech pro RRMM.

Závěr: Léčba mnohočetného myelomu na Klinice hematologické FN Ostrava dosahuje standardních výsledků. Léčebné postupy s využitím řady inovativních léků odpovídají moderní hematologické léčbě.

P25

GENE EXPRESSION PROFILE OF CIRCULATING MYELOMA CELLS REVEALS CD44 AND CD97 (ADGRE5) OVEREXPRESSION

Ševčíková T.^{1,2,3#}, Kryukov F.^{1,2#}, Brožová L.⁵, Filipová J.^{1,2,3}, Kuřová Z.^{1,2,4}, Growková K.^{1,2,3}, Bezděková R.^{6,7,8}, Němec P.⁶, Říhova L.⁷, Jarkovský J.⁵, Šimíček M.^{1,2,3}, Hájek R.^{1,2}

¹Department of Haematology, University Hospital Ostrava, Czech Republic

²Department of Clinical Studies, Faculty of Medicine, University of Ostrava, Czech Republic;

³Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Ostrava, Czech Republic

⁴Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic

⁵Institute of Biostatistics and Analyses, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

⁶Babak Myeloma Group, Department of Pathological Physiology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

⁷Department of Clinical Hematology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

⁸Laboratory of Molecular Cytogenetics, Institute of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic

#These authors contributed equally to this work

Aim: Release of the aberrant plasma cells (aPCs) from the bone marrow (BM) and their presence in the peripheral blood (PB) is a marker of disease progression and worse survival in multiple myeloma (MM) (Nowakowski et al. 2005). Circulating plasma cells (cPCs) are able to survive without homing microenvironment, evade the original tumor and colonize other bone marrow niche (Paiva et al., 2013). Comprehensive analysis of the genome-wide gene expression profiling (GEP) that could provide deeper insight into the expression patterns of cPCs of MM is still lacking. Our aim was to identify differentially expressed genes in paired samples of aPCs from BM and PB and to describe potential biomarkers of cPCs in MM.

Methods: Paired samples of aPCs from BM and PB were obtained from ten MM patients. aPCs were sorted according to the immunophenotype (CD45dim/CD38+/CD19-/CD56-/+) and GEP was performed on paired samples using AffymetrixGeneChip Human GeneST1.0 array. RMA normalized data at gene level were analyzed using Wilcoxon paired test with Benjamini-Hochberg multiple testing correction.

Results: GEP analysis of paired BM and PB samples revealed 1001 significantly changed genes in cPCs. Two genes upregulated in cPCs, CD97 and CD44, can be suggested as biologically relevant potential biomarkers of cPCs.

Conclusion: Among differentially expressed genes, two surface markers upregulated in cPCs are of particular interest: CD44 is involved in cell-cell interactions, cell adhesion and migration and CD97 belongs to the EGF-TM7 subgroup of adhesion G-protein-coupled receptors. Nevertheless, neither CD44 nor CD97 expression were described in plasma cell dyscrasia previously. Thus, despite non-systemic changes of gene expression at the whole transcriptome level, cPCs in MM likely represent distinct biological entity with specific expression profile underlying further PC malignant transformation.

Samples were kindly provided from Biobank Brno (doc. MUDr. Luděk Pour, Ph.D. and Ing. Martina Almáši, Ph.D.). Supported by SGS02/LF/2017-2018; RVOFNOs/2018.

P26

KLINICKÝ VÝZNAM TRANSLOKACE t(14;16)(q32;q23) U NEMOCNÝCH S MNOHOČETNÝM MYELOMEM (MM)

Pavlišťová L.^{1,3}, Berková A.^{1,3}, Zemanová Z.¹, Svobodová K.¹, Izáková S.¹, Špička I.³, Straub J.³, Michalová K.^{1,2}

¹Centrum nádorové cytogenetiky, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky I. LF UK a VFN, Praha

²Cytogenetické oddělení, Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

³I. interní klinika – klinika hematologie I. LF UK a VFN, Praha

Úvod: Translokace t(14;16)(q32;q23) je detekována v plazmatických buňkách 2–4 % nemocných s MM a je považována za silný negativní prognostický faktor. Vyšetření této aberace je v současné době nedílnou součástí rizikové stratifikace nemocných s MM podle R-ISS. Vzhledem k nízkým počtům t(14;16) pozitivních

případů však nebyl jednoznačně negativní prognostický význam t(14;16) ve všech studiích potvrzen, a proto je důležité pokračovat v analýzách a vyšetřit větší skupiny pacientů.

Cíle: Cílem naší studie bylo stanovit četnost translokace t(14;16)(q32;q23) v souboru nemocných s MM diagnostikovaných a léčených ve VFN a posoudit její vliv na přežití do události (EFS) a celkové přežití (OS) ve srovnání s kontrolní skupinou (26 MM nemocných bez vysoce rizikových aberací).

Metody: Od roku 2004 do roku 2017 jsme vyšetřili metodou FISH na imunofluorescenčně značených plazmatických buňkách (cIg FISH) celkem 1005 vzorků kostní dřeně pacientů s MM (Abbott Vysis, Kreatech a MetaSystems). K porovnání OS a EFS byla použita Kaplanova-Maierova analýza.

Výsledky: Translokace t(14;16) byla prokázána u 20/1005 nemocných s MM (2 %). K relapsu a/nebo progresi došlo u 16 pacientů. Medián EFS byl 12,5 měsíce ve skupině t(14;16) pozitivních nemocných (rozpětí 3–62 měsíců) a 16,5 měsíce u kontrolního souboru (rozpětí 3–74 měsíců). Medián OS byl 24 měsíců (rozpětí 10–209 měsíců) ve srovnání s 41 měsíci v kontrolní skupině (rozpětí 3–143 měsíce), rozdíly nebyly statisticky významné. Patnáct pacientů s t(14;16) zemřelo, u čtyř z nich byla prokázána současně další vysoce riziková aberace – delece genu TP53.

Závěr: Četnost translokace t(14;16) v našem souboru byla 2 %, což odpovídá údajům udávaným v literatuře. V naší studii jsme nepotvrdili jednoznačně negativní prognostický význam t(14;16) pro přežití nemocných s MM. Rozdíl v EFS mezi oběma skupinami nebyl statisticky významný, pozorovali jsme pouze trend k horšímu OS u t(14;16) pozitivních pacientů (24 vs. 41 měsíců u kontrol).

Podpořeno projekty RVO – VFN 64165, Progres-Q28/LF1 a GA ČR P302/12/G157.

P27

IMMUNOGLOBULIN LIGHT CHAIN AMYLOIDOSIS MUTATIONAL LANDSCAPE REVEALED BY EXOME SEQUENCING

Ševčíková T.^{1,2}, Chyra Z.^{1,2,3}, Vojta P.⁴, Filipová J.^{1,2,5}, Growková K.^{1,2,5}, Štork M.⁶, Pour L.⁶, Robak P.⁷, Debski J.⁸, Wiktor-Jedrzejczak W.⁹, Waszczuk-Gajda A.⁹, Jungova A.¹⁰, Grosicki S.¹¹, Barchnicka A.¹², Jurczyszyn A.¹³, Šimíček M.^{1,3,5}, Hajduch M.⁴, Hájek R.^{1,2}

¹Department of Haemato-Oncology, University Hospital Ostrava, Czech Republic

²Department of Clinical Studies, Faculty of Medicine, University of Ostrava, Czech Republic

³Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic

⁴Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University in Olomouc, Olomouc, Czech Republic

⁵Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Ostrava, Czech Republic

⁶Department of Internal Medicine, Hematology and Oncology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

⁷Experimental Hematology, Medical University of Lodz, Lodz, Poland

⁸Department and Clinic of Haematology, Blood Neoplasms and Bone Marrow Transplantation, Wroclaw Medical University, Wroclaw, Poland

⁹Department of Haematology, Oncology and Internal Diseases, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland

¹⁰Charles University Hospital Pilsen, Czech Republic

¹¹Department of Cancer Prevention, School of Public Health, Silesian Medical University in Katowice, Poland

¹²Department of Doctoral Studies, School of Public Health in Bytom, Medical University of Silesia, Katowice, Poland

¹³Jagiellonian University Medical College Department of Hematology, Krakow, Poland

Aim: Immunoglobulin light chain amyloidosis (ALA) is a plasma cell dyscrasia characterized by deposition of amyloid fibrils in various organs. The aim of the study was to reveal genomic profile on cohort of 16 ALA patients, to identify targets for study of their role in pathogenesis of ALA and to compare number of mutations with multiple myeloma (MM) and monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS).

Methods: DNA from aberrant plasma cells (aPCs) from bone marrow and peripheral (PB) blood was obtained. APCs and PB samples were collected from 51 patients (16 ALA, 25 MM and 10 MGUS). SureSelect Human All Exon V5 Kit was used for library preparation

and sequenced on Illumina HiSeq 4000 with average coverage 100x. Somatic variants were called using VarScan v2.0.

Results: The sum of somatic variants (SNVs) in aPC population was 39.700 for ALA, 25.060 for MM and 1.327 for MGUS samples. Exome sequencing of the aPCs revealed comparable number of mutated genes between ALA and MM (8.838 vs. 8.429) and lower number in MGUS (559), which is incongruent with differences in cohort sizes (ALA – 16, MM – 25 and MGUS – 10 patients). The most mutated genes were *MUC3A*, *MUC6*, *PABPC3*, *JPH4* and *MUC16*.

Discussion & conclusions: Wide spectrum of mutated genes for ALA and MM suggest high genetic heterogeneity among patients, which may underlie malignant nature of those diseases. On the other hand, ALA has low infiltration of aPCs in bone marrow, which is similar to MGUS. Future integrated analysis of the presented data from three disease stages (MGUS, MM, ALA) can reveal additional insights into the mechanisms of clonal plasma cells development in monoclonal gammopathies.

Ministry of Health (15-29667A; DRO – FNOs/2018) and the Ministry of Education, Youth and Sports (IRP201550).

P28

A PRELIMINARY ANALYSIS OF SOMATIC EXOME MUTATIONS OF MINIMAL RESIDUAL DISEASE IN MULTIPLE MYELOMA

Ševčíková T.^{1,2,3}, Zátopková M.^{1,2}, Stracquadanio G.^{1,2}, Vojta P.⁴, Šimíček M.^{1,2,3}, Crowková K.^{1,2,3}, Kuřová Z.^{1,3,6}, Filipová J.^{1,2,3}, Jelínek T.^{1,2}, Říhová L.⁵, Bezděková R.⁵, Smejkalová J.¹, Hajduch M.⁴, Pour L.⁷, Minařík J.⁸, Jungová A.⁹, Maisnar V.¹⁰, Kryukov F.¹¹, Hájek R.^{1,3}

¹Department of Haematology, University Hospital Ostrava, Czech Republic

²Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Ostrava, Czech Republic

³Department of Clinical Studies, Faculty of Medicine, University of Ostrava, Czech Republic

⁴Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University in Olomouc, Czech Republic

⁵Department of Clinical Hematology, University Hospital Brno, Czech Republic

⁶Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic

⁷Department of Internal Medicine, Hematology and Oncology, University Hospital Brno, Czech Republic

⁸Department of Haemato-Oncology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc and University Hospital Olomouc, Czech Republic

⁹Department of Haemato-Oncology, University Hospital in Plzen, Czech Republic

¹⁰Department of Medicine – Haematology, University Hospital Hradec Kralove, Czech Republic

¹¹Medical Department, JCS BIOCAD, Saint Petersburg, Russian Federation

¹²School of Computer Science and Electronic Engineering, University of Essex, Colchester, United Kingdom

Aim: Our aim is to explore mutational spectrum in minimal residual disease (MRD) of multiple myeloma (MM) with focus on possible treatment targets.

Methods: Aberrant plasma cells were collected according to surface markers CD38, CD45, CD56 and CD19 from 7 MRD patients treated with Velcade based regimen. DNA was isolated and amplified by the Single cell amplification kit (QIAGEN). SureSelect Human All Exon V6 Kit was used to prepare libraries. 100 bp reads were sequenced on Illumina HiSeq 4000 platform with expected coverage 100x. Data were bioinformatically processed by BWA (hg38), VarScan2 and custom post-processing pipeline for annotation and filtering of variants. All resulting genes were compared with the M3P panel.

Results: Sequencing data of the patient's cohort revealed at least one single nucleotide variant (SNV) in 1324 affected genes. Median number of affected genes was 288 per patient (min 213, max 313). Variants in 8 genes were shared by all 7 patients. Variants in 340 genes were shared by at least 2 patients and variants in 984 genes were patient-specific. We further compared the list of all genes possessing SNV (1324) with M3P which was created as a list of 88 most commonly mutated genes in MM. We found mutations in 13 genes also presented in M3P. From those, 3 genes (out of 13) were shared by at least 2 patients and 10 genes were patient specific. Search in the Drug Gene Interaction database showed that products of 24 genes (out of all 1324 genes) interact with drugs used for MM treatment (e.g. Bortezomib, Carfilzomib, Lenalidomide).

Conclusion: We were able to detect genomic variants in 7 patients with MM MRD. This work represents a primer step towards the identification of new therapeutic targets in multiple myeloma minimal residual disease.

Supported by Ministry of Health (17-30089A); SGS18/PřF/2017-2018 and RVO-FNOs/2018.

P29

IMPACT OF THE GLOBAL DNA METHYLATION ON GENE EXPRESSIONS OF THE METHYLATED PDLIM4 AND THE UNMETHYLATED CDKN2A IN MULTIPLE MYELOMA PATIENTS

Minarik J.^{1,2,4}, Smesny Trtkova K.^{1,5}, Flodrova P.^{1,2}, Janovska L.³, Luzna P.¹

¹Department of Clinical and Molecular Pathology, Faculty of Medicine and Dentistry, University Palacky Olomouc, Czech Republic

²Department of Hematooncology, Faculty of Medicine and Dentistry, University Palacky Olomouc, Czech Republic

³Department of Microbiology, Faculty of Medicine and Dentistry, University Palacky Olomouc, Czech Republic

⁴University Hospital Olomouc, Olomouc, Czech Republic

⁵Department of Clinical and Molecular Pathology, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, University Palacky Olomouc, Czech Republic

Aim: Apart from genetic abnormalities, epigenetic modifications are known to participate in pathogenesis of monoclonal gammopathies and multiple myeloma. The most studied epigenetic modification in multiple myeloma is DNA methylation. Genome-wide hypomethylation and hypermethylation at CpG promoters are accompanied by changes in expression of key genes of the antitumor action, leading to their inactivation. DNA methylation of both CDKN2B, representing one of inhibitor cyclin dependent kinases, and PDLIM4, one of potential tumor suppressor genes, together with the analysis of their expressions were evaluated in three groups of patients divided on the basis of % 5-methylcytosine.

Methods: Nucleic acid was obtained from unsorted cell population in the bone marrow aspirates of 50 patients with multiple myeloma. Bisulfite-treated DNA was used as a template for PCR reaction, whose product was used for subsequent pyrosequencing. Global methylation state was determined in the isolated DNA using colorimetric detection. After reverse transcription of the isolated RNA, the cDNA was used for CDKN2B and PDLIM4 gene expression analysis by the real-time PCR.

Results: In studied patients, the % 5-methylcytosine in monitored CpGs of the 216 bp promotor region of the PDLIM4 gene was higher (9–28%) in comparison to CDKN2B gene (2–9%). We detected the highest level of PDLIM4 expression in the group of patients with the lowest range of global methylation (0–0.699%).

Conclusion: Analysed CDKN2AB gene regions indicate hypomethylation state, whereas PDLIM4 ge-

ne tested region have showed hypermethylation. Expression of studied genes is not dependent on their methylation status in groups of patients with both moderately (0.7–1.199%) and high range (1.2 % and higher) of global methylation, in which, unlike current studies, the increased CDKN2B expression was detected. This finding could indicate functional un-methylated CDKN2B gene, in contrast to methylated tumor-suppressor PDLIM4 gene in studied multiple myeloma patients.

This study was supported in part by NV18-03-0050 from the Czech Ministry of Health, DRO (FNOL 00098892) from the Ministry of Health of the Czech Republic and LF_2018_001 from Palacky University Olomouc.

P30

NEWLY DESIGNED 11-GENE PANEL REVEALS FIRST CASE OF HEREDITARY AMYLOIDOSIS CAPTURED BY MASSIVE PARALLEL SEQUENCING

Ševčíková T.^{1,2}, Chyra Z.^{1,2}, Januška J.³, Jelínek T.¹, Kryukov F.^{1,2}, Hájek R.^{1,2}

¹Department of Hematooncology, University Hospital Ostrava, Czech Republic

²Department of Clinical Studies, Faculty of Medicine, University of Ostrava, Czech Republic

³Cardiocentre Podlesí, Třinec, Czech Republic

Aim: Hereditary amyloidosis is a disease caused by deposits of misfolded proteins in various tissues resulting in end organ damage. Formation of hereditary amyloidosis has been associated with germline mutations in 7 genes coding for amyloidogenic precursor proteins. We designed a panel of 11 amyloidogenic genes including 7 common genes involved in hereditary amyloidosis along with 4 genes associated with other “amyloid diseases”.

Methods: Amyloidosis panel was designed using HaloPlex target enrichment kit (Agilent Technologies). This panel includes TTR, FGA, APOA1, APOA2, LYZ, GSN, CST3 together with 4 genes PRNP, APP, B2M, ITM2 associated with “amyloid diseases”. The set of capture probes was created to cover entire gene lengths spanning finally 53 kb. Cohort of 43 patients with hypertrophic cardiomyopathy was analyzed together with 4 positive and 4 negative control samples validated previously by Sanger sequencing. Next-generation sequencing was performed using MiSeq Reagent Kit V2 – 500 cycles (Illumina, Inc., San Diego, CA).

POSTEROVÁ SEKCE

Results: Positive and negative controls (identified by Sanger sequencing) were confirmed by NGS. Our data show one positive case with p.Glu62Lys mutation in TTR gene and various SNPs, predominantly in genes CST3, CSN and PRNP, which are associated with predisposition to amyloid formation. Detailed analysis and interpretation of sequencing results will be presented.

Discussion & conclusions: We designed and validated target sequencing for 11 genes associated with predisposition to amyloid formation. Next-generation sequencing provides higher amount of data for significantly lower price compared to standard sequencing methods. Employment of high throughput techniques is especially beneficial for large cohort analysis.

Ministry of Health of the Czech Republic (15-29667A), MH CZ – DRO – FNOs/2018, Ministry of Education, Youth and Sports (IRP201550), SGS10/LF/2016-17.

P31

NOVEL APPROACH TO STUDY RELATIONSHIP BETWEEN COPY NUMBER VARIATION AND GENE EXPRESSION IN MULTIPLE MYELOMA

Šimíček M.^{2,3,4}, Brožová L.^{1,3}, Kryukov F.^{2,3}, Filipová J.^{2,3,4}, Ševčíková T.^{2,3}, Kufová Z.^{2,3,5}, Growková K.^{2,3,4}, Kryukova E.^{2,3}, Smetana J.^{6,7}, Němec P.⁶, Jarkovský J.¹, Hájek R.^{2,3}

¹Institute of Biostatistics and Analyses, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

²Department of Haemato-Oncology, University Hospital Ostrava, Czech Republic

³Department of Clinical Studies, Faculty of Medicine, University of Ostrava, Czech Republic

⁴Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Ostrava, Czech Republic

⁵Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic

⁶Babak Myeloma Group, Department of Pathological Physiology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

⁷Laboratory of Molecular Cytogenetics, Institute of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Aim: Pathogenesis of multiple myeloma (MM) represents a complex combination of genomic alterations and transcriptomic shifts. Our study integrates omics analysis of paired genomic and transcriptomic datasets

to reveal the impact of DNA copy number variants (CNV) on the gene expression (GE).

Methods: Analysis included 66 newly diagnosed (ND) and 39 relapsed MM patients. Only autosomes and DNA segments with frequency of gain or loss $\geq 10\%$ were investigated. CNV and GE data from microarray platforms were analysed using co-inertia analysis (CIA), a multivariate correlation method. Based on weights on CIA axes, only the most important features (GE and CNV) entered the correlation and regression analysis. Final regression model included CNV as predictor, variability of GE which cannot be explained by CNV and ploidy status as response variable.

Results: CIA showed stronger correspondence between CNV and GE data in relapsed (RV = 0.64) compared to ND patients (RV = 0.44). The most important CNV for relapse belong to 1p, 1q, 8p, 12p, 13, 14, 16q. Regression analysis revealed transcriptome changes in CNVunrelated genes, especially in relapse cohort. Known role in MM pathogenesis have CCND1 (11q) and CCND2 (12p) that can be affected by CNV in 1q, 13 and 1q, 4p, 13, 14, respectively. Further significant associations between the GE with CNV segments are: PLK2 (5q) with 1p or 19p, VPREB3 (22) with 13 or 19p, ADAM28 (8p) with 13 or 16q and CD79A (19q) with 1q, 13, 14 or 16q. Various CNVs can also affect members of SNORD families.

Conclusion: Our analysis confirmed that GE is not direct consequence of CNV. Association of CNV and GE on different chromosomes was revealed. The results pinpoint molecular targets for further investigation.

This work was supported by the institutional plan of the University of Ostrava no. IRP201550 and by the Ministry of Health (15-29667A).

P32

HIGH LEVELS OF NEURAL STEM CELL MARKER NESTIN AS A NOVEL UNFAVORABLE PROGNOSTIC MARKER FOR MULTIPLE MYELOMA

Šváchová H.¹, Říhová L.^{2,4}, Pour L.⁴, Jarkovský J.⁵, Hájek R.^{2,6}, Minařík J.^{1,7}

¹Faculty Hospital Olomouc, Department of Haematology, Czech Republic

²Babak Myeloma Group, Department of Pathological Physiology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Czech Republic

³Department of Clinical Hematology, Faculty Hospital Brno, Czech Republic

⁴Department of Internal Medicine and Hematology, Faculty Hospital Brno, Czech Republic

⁵Institute of Biostatistics and Analyses, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

⁶Faculty of Medicine, University of Ostrava and Department of Haematology, University Hospital Ostrava, Czech Republic

⁷Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc, Czech Republic

Background: Neural stem cell marker nestin is a suitable diagnostic and prognostic indicator of malignancy in solid tumors but its role in hematological malignancies remains unknown. Nestin has been confirmed as a tumor-specific marker for CD138+38+ plasma cells (PC) of multiple myeloma (MM) and a potential predictor of worse response to novel therapy. However, prognostic potential of nestin has never been studied in MM so far.

Aim: The aim of this study was to evaluate whether pretreatment levels of nestin can predict overall (OS) and progression-free (PFS) survival.

Methods: Nestin was detected in CD138+38+PC of 84 newly diagnosed MM patients (36M/48F; median age 70 years) by flow cytometry. Nestin was assessed as the percentage of nestin-positive PC (Nes+PC) and the ratio of median fluorescence intensity of nestin (MFI ratio) and isotypic control. Cox proportional hazards models were used to assess the association of prognostic factors with OS and PFS. Survival rates were estimated using the Kaplan-Meier method. Differences in survival among subgroups of patients were compared using the logrank test. Survival cut-off points were established based on time-dependent ROC analysis. P-values below 0.05 were considered as statistically significant in all analyses.

Results: Univariate Cox model showed prognostic impact for %Nes+ (HR 1.023 [HR 95%CI: 1.008; 1.038]; $p = 0.002$) and for MFI ratio (HR: 1.058 [HR 95%CI: 1.014;

1.104]; $p = 0.010$). Multivariate Cox model showed that %Nes+PC is significantly associated with OS ($p = 0.023$). High %Nes+PC subgroup was associated with shorter OS ($p = 0.025$) and PFS ($p = 0.003$). High MFI ratio subgroup was significantly associated with shorter OS ($p = 0.003$); and PFS ($p = 0.025$).

Conclusion: These data demonstrated that nestin protein might represent a novel prognostic biomarker for MM. Furthermore, %Nes+PC appears to be an independent prognostic factor for OS. This pilot study needs to be further validated on a larger cohort of patients. Funded by NT14575.

P33

MOLEKULÁRNĚ CYTOGENETICKÁ ANALÝZA U MM/PCL PACIENTŮ S CIRKULUJÍCÍMI PLAZMATICKÝMI BUŇKAMI

Balcárková J.¹, Mlynářčiková M.¹, Žmolíková J.², Minařík J.¹, Píka T.¹, Krhovská P.¹, Urbánková H.¹, Papajík T.¹

¹Hemato-onkologická klinika FN a UP, Olomouc

²CGB Laboratoře, Ostrava

Společným znakem primární plazmocelulární leukemie (pPCL) a mnohočetného myelomu (MM) s cirkulujícími plazmatickými buňkami (CPB) je expanze plazmatických buněk mimo mikroprostředí kostní dřeně. Přítomnost CPB je považována za známku vysoké proliferativní aktivity onemocnění a je spojena s nepříznivou prognózou. Cytogenetické studie ukazují, že CPB jsou charakterizovány celou řadou cytogenetických změn. Většinou je prokázána non-hyperdiploidie spojená s vyšším výskytem IgH translokací zejména t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16;q32) a t(14;16)(q32;q23). Mezi další časté genetické změny patří delece 13q/monozomie 13, delece 17p a abnormality chromozomu 1 (zmnožení 1q/delece 1p). Cílem této práce je analyzovat cytogenetické změny ve skupině osmi pacientů (3 pPCL a 5 MM s CPB) pomocí metod arrayCGH a FICTION s komerčně dostupnými sondami pro RB1/c15, IgH, 1q21/1p32, TP53/c17, určit frekvenci jednotlivých cytogenetických změn a u pacientů vyšetřených z kostní dřeně a CPB studovat klonální vývoj. Translokaci IgH genu jsme prokázali u 5/8 pacientů: 3krát t(11;14)(q13;q32), 1krát t(4;14)(p16;q32) a 1krát t(14;20)(q32;q12). U jedné pacientky byla zjištěna přítomnost der(4)t(4;7)(p16;q?)ins(4;7)(p16;q?), který zahrnoval abnormalitu genů FGFR3/MMSET. Zmnožení oblasti 1q21 bylo prokázáno u 6/8 pacientů. Delece RB1 genu byla zjištěna u čtyř pacientů

POSTEROVÁ SEKCE

a delece genu TP53 u dvou pacientů. Pomocí arrayCGH byly zjištěny delece 1p, 6q, 13q, 16q zmnožení 1q a abnormality chromozomu X (monozomie/ zmnožení Xq). Chromotripse chromozomu 8 a hyperdiploidie spojená s trizomiemi chromozomů 3, 5, 7, 9, 11, 15 a 19 byly zjištěny u dvou dalších pacientů. Abnormality zjištěné v kostní dřeni byly u tří pacientů shodné s abnormalitami v CPB a u jednoho pacienta se lišily. V našem souboru jsme zjistili chromozomální abnormality u všech pacientů s pPCL a MM s CPB. Naše výsledky ukazují, že genetické abnormality u pPCL a MM s CPB jsou shodné jako u MM, ale jsou více komplexní. Byl pozorován relativně četnější výskyt zmnožení oblasti 1q21 a delece genu TP53. Použití arrayCGH přispělo k rozpoznání dalších abnormalit nedetekovaných metodou FICTION.

Podpořeno granty IGA LF 2018-004, MZ ČR – RVO (FNOL 00098892).

P34

LAB GUIDELINE OPTIMIZATION FOR PRE-PROCESSING OF SAMPLES WITH SMALL AMOUNT OF INPUT MATERIAL IN MONOCLONAL GAMMOPATHIES

Ševčíková T.^{1,2,3}, Growková K.^{1,2,3}, Filipová J.^{1,2,3}, Kuřová Z.^{1,2}, Hanusová H.^{1,2}, Vrublová P.^{1,2}, Kryukova E.^{1,2}, Zahradová L.¹, Kryukov F.^{1,2}, Hájek R.^{1,2}

¹Department of Haematology, University Hospital Ostrava, Czech Republic

²Department of Clinical Studies, Faculty of Medicine, University of Ostrava, Czech Republic

³Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Ostrava, Czech Republic

Aim: To optimize processing of monoclonal gammopathies (MGs) samples with minor target cell populations to provide products suitable for genome-wide molecular techniques.

Methods: This study was approved by institutional ethical review boards and individuals provided written informed consent. Mononuclear cells (MNC) were isolated by density gradient centrifugation and aliquots with 10×10^6 cells were frozen in 1 ml FBS containing 10% DMSO. Bone marrow aberrant plasma cells (aPC; CD45dimCD38+CD19-CD56+) were sorted by FACS Aria III (Becton Dickinson). DNA was isolated using: AllPrep DNA/RNA Micro Kit or QIAamp DNA Mini Kit (both Qiagen). RNA was isolated using: AllPrep DNA/RNA Micro Kit (Qiagen), RNeasy Micro Kit (Qiagen),

MagMAX Total RNA Isolation Kit (Life Technologies), μ MACS mRNA Isolation Kit (MiltenyiBiotec). Nucleic acid amplification kits: REPLI-g Mini Kit, REPLI-g Single Cell Kit (both Qiagen).

Results: From MGs with minor target cell populations (e.i. AL amyloidosis, MGUS) usually 104–105 cells can be collected. Both tested DNA isolation kits yielded comparable results. For RNA isolation, the best performance showed AllPrep DNA/RNA Micro Kit (Qiagen). When less than 105 cells was available, it was necessary to perform nucleic acid amplification. For 5×10^3 to 105 cells, we selected REPLI-g Mini Kit (Qiagen). For less than 5×10^3 cells, the only option was the REPLI-g Single Cell Kit (Qiagen).

Conclusion: The lab guideline for processing of MGs samples with minor target cell populations was prepared to present the optimal procedure from sample biobanking and target cells collection to selection of kit for nucleic acid isolation which provide best performance in terms of product yield and purity. Isolated nucleic acids are intended for use in next-gen sequencing, array comparative genomic hybridisation or gene expression profiling.

Supported by The Ministry of Education, Youth and Sports of Czech Republic, University of Ostrava project SGS01/LF/2018-2019 and MH CZ – DRO – FNOs/2018.

P35

VYUŽITÍ OPTICKÉHO MAPOVÁNÍ PŘI STUDIU STRUKTURNÍCH GENOVÝCH VARIANT U MNOHOČETNÉHO MYELOMU

Fillerová R.¹, Minařík J.², Gajdoš P.³, Běhálek M.³, Mikulková Z.¹, Papajík T.², Kriegová E.¹

¹Ústav imunologie LF UK a FN, Olomouc

²Hemato-onkologická klinika LF UK a FN, Olomouc

³Fakulta elektrotechniky a informatiky, Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava

Úvod: Mnohočetný myelom (MM) patří k onemocněním charakteristickým velkou genetickou heterogenitou, která následně ovlivňuje nejen vývoj onemocnění, ale i léčebnou odpověď.

Metody: Přestože současné sekvenační metody významně přispěly k poznání MM genomu a identifikaci klíčových mutací a dalších genetických změn, znalost strukturních a početních genomických variant je vzhledem k metodickým limitacím těchto metod stále nedostatečná.

Ke studiu genomických a početních variant u MM se nabízí nová technologie optického mapování (IRYS, Bionano Genomics). Tato metoda umožňuje detekci nejen translokací, ale také inverzí, delecí a inzercí různého rozsahu (3–300 kb) a změn počtu kopií genů pomocí vizualizace nativních ultradlouhých fluorescenčně značených DNA molekul linearizovaných na mikročipu.

Výsledky: Získané Rmapy se porovnávají s *in silico* restričními mapami referenční lidské DNA sekvence. Nezbytným předpokladem získání kvalitní optické mapy je izolace ultradlouhé vysoce kvalitní DNA z MM buněk uložených v agarózových bločcích, případně periferních mononukleárních buněk u zdravých jedinců. Tento způsob uložení buněk a následná izolace přímo v agarózovém bločku umožňuje získání velmi dlouhých fragmentů o délce 100–500 a více kilobází. Po

enzymatickém značení pomocí fluorescenčních značek se ultra-dlouhá DNA nanese na nanofluidní čip, kde dochází k regulované a reprodukovatelné linearizaci molekul DNA. Práce shrnuje první výsledky optických map u zdravých jedinců českého původu a pacientů s MM. Prezentujeme bioinformatickou pipeline a popisujeme genomické změny asociované s MM.

Závěr: Naše práce ukazuje velký potenciál využití technologie optického mapování k identifikaci nových strukturních a početních změn u MM, které mohou přispět nejen k pochopení patogeneze onemocnění, ale v budoucnosti také ke zpřesnění diagnostiky, stratifikaci pacientů i volbu léčby.

Práce vznikla za finanční podpory firmy Celgene a MZ ČR – RVO (FNOI 00098892).

CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKEMIE

P36

ANALÝZA SÉROVÝCH LIPIDŮ, KARDIOVASKULÁRNÍHO RIZIKA A INDIKACE K HYPOLIPIDEMICKÉ TERAPII U NEMOCNÝCH S *DE NOVO* CML LÉČENÝCH IMATINIBEM A NILOTINIBEM – VÝSLEDKY Z PROSPEKTIVNÍ STUDIE

Horňák T.¹, Semerád L.¹, Žáčková D.¹, Weinbergerová B.¹, Šustková Z.¹, Procházková J.¹, Bělohlávková P.², Stejskal L.³, Rohoň P.⁴, Mayer J.¹, Ráčil Z.¹

¹Interní, hematologická a onkologická klinika MU a FN, Brno

²IV. interní hematologická klinika FN, Hradec Králové

³Klinika hematonekologie FN, Ostrava

⁴Hemato-onkologická klinika FN, Olomouc

Cíle: 1. Analýza hladin sérových lipidů a kardiovaskulárního rizika u *de novo* CML pacientů na začátku a během terapie imatinibem (IMA) a nilotinibem (NILO). 2. Identifikace pacientů splňujících kritéria k hypolipidemické terapii během terapie TKI.

Metody: Klinické a laboratorní sledování včetně stanovení kardiovaskulárního rizika u CML pacientů v první linii léčby IMA nebo NILO na začátku terapie a v 3měsíčních intervalech. Iniciální volba TKI proběhla dle indikace ošetřujícího lékaře. Hladiny sérových lipidů byly analyzovány u pacientů neužívajících hypolipidemika v čase studiové vizity.

Výsledky: Do studie bylo zapojeno 34 pacientů léčených IMA a 23 léčených NILO (medián follow-up IMA = 12 m, NILO = 9 m). Pacienti léčení NILO byli mladší (medián věku 45 vs. 67 let, $p = 0,0006$) a měli méně komorbidit (diabetes mellitus 0% vs. 32%, $p = 0,0018$; ischemická choroba srdeční - 0% vs. 24%; $p = 0,0163$). Kardiovaskulární riziko bylo u pacientů s NILO na vstupní vizitě nižší (medián CV SCORE - 1% vs. 6%, $p = 0,009$) než u nemocných s IMA. Počet pacientů, kteří již užívali statin a/nebo byli nově indikováni k hypolipidemické terapii, byl u vstupní vizity vyšší u pacientů léčených IMA (NILO - 30%, IMA - 68%, $p = 0,0076$). Po 6 měsících léčby NILO došlo k signifikantnímu zvýšení hladiny celkového cholesterolu, HDL- a LDL-cholesterolu. IMA zvýšil signifikantně pouze hladinu HDL. Změna kardiovaskulárního rizika z nízkého na vysoké/velmi vysoké byla pozorována u 13 % pacientů s NILO a 6 % pacientů s IMA (ns). Počet pacientů nově indikovaných k terapii statinem během terapie TKI byl v obou skupinách srovnatelný (NILO 9 %, IMA 6 %).

Závěr: Výsledky analýzy ukazují na přirozenou selekci iniciálního TKI ošetřujícím lékařem na základě známých nežádoucích účinků, kdy u komorbidnějších a starších nemocných je volen IMA. Při startu TKI je zásadní zhodnocení kardiovaskulárního rizika a indikace hypolipidemické terapie, neboť více jak polovina pacientů v době startu TKI splňuje kritéria pro zahájení hypolipidemické terapie. K dalšímu významnému nárůstu indikací (i přes nárůst celkového a LDL-cholesterolu u nemocných s NILO) v průběhu terapie IMA ale i NILO pak již nedochází.

P37

VÝSLEDKY LÉČBY NILOTINIBEM V 1. LINII PACIENTŮ S CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMIÍ

Stejskal L.^{1,2,3}, Benková K.^{1,2}, Kořístek Z.^{1,2}, Richterová P.^{1,2}, Zuchnická J.^{1,2}, Tóthová E.^{1,2}, Hájek R.^{1,2}

¹Klinika hematonekologie FN, Ostrava

²Lékařská fakulta, Ostravská univerzita

³Hematologicko-transfuzní oddělení Slezská nemocnice v Opavě

Cíle: Zhodnotit účinnost a bezpečnost léčby TKI 2. generace v 1. linii pacientů s CML.

Metody: Data pacientů s CML léčených v 4 letech (2014–2017) v KHO FN Ostrava, léčba probíhala dle platných doporučení/standardizace ELN. Toxicita léčby byla hodnocena dle CTCAEv4.03.

Výsledky: Celkem 14 pacientů (medián věku 37,5 let, rozmezí 22–63, 64,4 % mužů) s CML BCR/ABL pozitivní, diagnostikovanou v letech 2014–2017, všichni v CP, nikdo v AP/BC, riziková skóre Sokal 7/4/3 LR/IR/HR, Hasford 9/4/1 LR/IR/HR, Eutos 9/4/1 LR/IR/HR, podtyp BCR/ABL - 7krát b3a2, 7krát b2a2. U čtyř pacientů byly vstupně zachyceny přídatné chromozomální aberace (3krát CCA/Ph+ der 22, der 21, del 20q a 1krát CCA/Ph-Robertsonská translokace t(14,15)(q10,q10). Všichni pacienti žijí při mediánu doby sledování 29 měsíců, rozmezí 18–46 měsíců. V první linii léčby nilotinibem dosaženo ve 3. měsíci 11krát CCyR, ve 12. měsíci léčby 12krát MMR, z toho 3krát na úrovni MR4.0. Aktuálně na nilotinibu pokračuje 57 % (8/14) pacientů. Tři pacienti jsme z důvodu toxicity převedli na jiný TKI: 2krát imatinib, 1krát dasatinib (důvody: 1krát hepatotoxicita

POSTEROVÁ SEKCE

grade 3, 1krát kožní toxicita grade 2, 1krát protrahované bolesti skeletu grade 1). U tří pacientů jsme zaznamenali selhání léčby (dva nedosáhli CCyR ve 12. měsíci) a byli převedeni na dasatinib po 12, resp. 27 měsíci, u jednoho pacienta diagnostikovaného již v pozdní chronické fázi s HR dle Sokala došlo ve 3. měsíci při léčbě nilotinibem ke vzniku mutace T315I v BCR/ABL doméně a byl indikován k alogenní transplantaci krvetvorby. Všichni tři naši pacienti, kteří selhali na léčbě nilotinibem, měli již ve 3. měsíci varovné známky dle ELN 2013 nebo nutnost redukce dávky pro toxicitu.

Závěr: Nilotinib v první linii léčby Ph+CML v CP má velmi dobrou účinnost zvláště u pacientů, kteří již ve 3. měsíci léčby dosáhli CCyR (v našem souboru 11/14) a ti pak ve 12. měsíci dosáhli i MMR. Pro část pacientů byl nilotinib v první linii příliš toxický 3/14 a u dalších 3/14 onemocnění progredovalo a byla nutná časná změna léčebného postupu.

P38

PROGNOSTICKÁ ÚLOHA RECIDIVUJÍCÍ RELATIVNÍ BAZOFILIE (RB) BEHOM CYTOREDUKCE PACIENTOV S CHRONICKOU MYELOIDOVOU LEUKÉMIÍ (CML)

Vráblová L.¹, Benešová L.¹, Maiwaldová B.¹, Fürst T.², Skoumalová I.¹, Rohoň P.¹, Indrák K.¹, Urbanová H.¹, Divoká M.¹, Faber E.¹

¹Hemato-onkologická klinika, FN Olomouc

²Katedra matematické analýzy a aplikací matematiky PŘF UP, Olomouc

Ciele: Bazofília je u pacientov s CML častá, ale jej etiopatogenéza nie je objasnená. Biologické vlastnosti CML zrejme ovplyvňuje bazofilmi produkovaný zápalový chemokín CCL3, bazofília preto nemusí predstavovať len sprevádzajúci fenomén.

Metódy: RB sme definovali ako zvýšenie relatívneho počtu bazofilov v diferenciálnom rozpočte leukocytov v porovnaní so vstupnými hodnotami, ktoré bolo pozorované behom prvého mesiaca cytoredukčnej terapie hydroxyureou a/alebo imatinibom. Krvné obrázky u pacientov s CML liečených na našej klinike v 1. línii liečby imatinibom sme z hľadiska RB hodnotili retrospektívne. Pre štatistickú analýzu boli použité test podľa Kaplana a Meiera, Kruskal-Wallisov a log-rank test.

Výsledky: Do analýzy sme zahrnuli 41 žien a 63 mužov s mediánom veku 54 rokov (20–88), medián sledovania pacientov bol 3,1 roku (3,5 mesiaca – 10,9 roka).

Objavili sme 65 prípadov RB, u 7 pacientov nárast bazofilov splnil kritériá akcelerácie CML. Štatisticky bola potvrdená asociácia RB s nižším vekom ($p = 0,0224$) a Sokalovým skóre ($p = 0,02$). V porovnaní s pacientmi bez RB (medián = 0 cm) mali pacienti s RB (medián = 5 cm) významne väčšiu veľkosť sleziny ($p = 0,0189$). Podľa analýzy „scatter plot“ mladší pacienti s RB zomierali častejšie na progresiu CML, zatiaľ čo starší s RB zomierali následkom komorbidity. Pacienti s RB častejšie vyžadovali terapiu druhou líniou (38,9 %) v porovnaní s kontrolnou skupinou (22 %; $p = 0,06$). Pacienti s RB mali horší PFS, ale rozdiel nebol štatisticky významný (63 % vs. 75 %; $p = 0,346$). Pravdepodobnosť dosiahnuť kompletnú cytogenetickú a veľkú molekulovú odpoveď po 6, resp. 12 mesiacoch liečby sa nelíšila (81,5 % s RB vs. 81,2 % bez RB, $p = 0,967$ a 80 % vs. 78 %, $p = 0,49$).

Záver: RB je etiologicky nejasný fenomén pozorovateľný asi u polovice pacientov s CML. RB môže mať význam pri prognostickej stratifikácii mladších pacientov s CML, na overenie je však potrebné uskutočniť analýzy väčších skupín pacientov.

Podporeno grantom IGA_LF_2018_04.

P39

DETEKCE A KVANTIFIKACE PACIENT-SPECIFICKÉ GENOMICKÉ FÚZE BCR-ABL1 U PACIENTŮ S CML ZPŮSOBILÝCH PRO VYSAZENÍ TKI VÝZNAMNĚ ZLEPŠUJE ANALÝZU MINIMÁLNÍ REZIDUÁLNÍ NEMOCI V POROVNÁNÍ S ANALÝZOU TRANSKRIPTU S POUŽITÍM REAL-TIME PCR NEBO DIGITÁLNÍ PCR

Motlová E.¹, Žižková H.¹, Pecherková P.¹, Zuna J.², Hovorková L.², Zimmermannová O.², Jurček T.³, Vlčanová K.¹, Klamová H.¹, Cross N.^{4,5}, Hochhaus A.⁶, Ernst T.⁶, Machová Poláková K.¹

¹Oddělení molekulární genetiky, Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

²CLIP, Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol, Praha

³Centrum molekulární biologie a genové terapie, Klinika interní hematologie a onkologie LFMU a FN, Brno

⁴Wessex Regional Genetics Laboratory, Salisbury NHS Foundation Trust, Salisbury

⁵Faculty of Medicine, University of Southampton, Southampton, United Kingdom

⁶Abteilung Hämatologie/Onkologie, Klinik für Innere Medizin II, University of Jena, Jena, Germany

Úvod: Výsledky klinických studií vysazování léčby tyrosin-kinázovými inhibitory (TKI) u chronické myeloidní leukemie (CML) ukazují, že u 40–60 % pacientů přetrvává hluboká molekulární odpověď (DMR) po zastavení léčby. Pro bezpečné vysazení TKI je zásadní přesné a citlivé monitorování minimální reziduální nemoci (MRD). Předpokládáme, že sledováním MRD na úrovni DNA a/nebo použitím metody digitální PCR (ddPCR) lze zvýšit přesnost i citlivost měření.

Cíl: Zevrubné porovnání čtyř metod pro sledování MRD u pacientů s CML v DMR; mRNA-qPCR, DNA-qPCR, mRNA-ddPCR, DNA-ddPCR.

Metody: U 78 CML pacientů v DMR byly identifikovány genomické fúze BCR-ABL1. Dosud bylo navrženo 49 pacient-specifických esejí. DNA a RNA byly extrahovány ze stejného počtu buněk. Pro každou metodu byla stanovena kritéria pro vyhodnocování. Kostní dřeň byla analyzována u sedmi pacientů s nedetekovatelnými transkripty BCR-ABL1 v periferní krvi (PK) pro zjištění přítomnosti CML krvetvorných buněk. Bylo analyzováno 993 párových vzorků (PV) pomocí mRNA-qPCR a DNA-qPCR, a 574 PV pomocí mRNA-ddPCR a DNA-ddPCR. Pro statistickou analýzu byl aplikován test podílu.

Výsledky: DNA-qPCR vykazovala vyšší citlivost měření u 46 % (456/993) PV v porovnání s RNAqPCR ($p < 0,0001$). Při sjednocení PV dle množství kopií kontrolních genů odpovídajícího DMR4-DMR4.5 nebo DMR5, poskytovala DNA-qPCR analýza vyšší citlivost u 39 % ($p < 0,0001$), respektive 54 % PV ($p < 0,0001$). DNA-ddPCR analýzy měřily s vyšší citlivostí u 41 % PV v porovnání s mRNA-ddPCR ($p < 0,0001$). DdPCR zvýšila citlivost a přesnost měření transkriptů v porovnání s qPCR u 17 % PV ($p < 0,0001$) a DNA u 12 % PV ($p < 0,0007$). Použitím všech čtyř metod nebyl zjištěn rozdíl v detekci BCR-ABL1 mezi vzorky kostní dřene a periferní krve.

Závěr: Detekce DNA BCR-ABL1 významně zlepšuje měření MRD v porovnání s analýzou mRNA při použití qPCR nebo ddPCR. Zda DNA analýzy mají dopad na lepší předpověď průběhu onemocnění po zastavení TKI, je nutné ověřit.

Podpořeno AZV15-31540A, AZV16-30186A, EUTOS2016, MZCR00023736.

P40

SLEDOVÁNÍ HLADIN BCR-ABL1 POMOCÍ DIGITÁLNÍ PCR – ADAPTACE EAC PROTOKOLU A POROVNÁNÍ SE STANDARDNÍ DIAGNOSTICKOU RT-QPCR A GENEXPERT SYSTÉMEM

Smitalová D.^{1,3}, Romžová M.¹, Jurček T.², Dvořáková D.², Mayer J.^{1,2}, Ráčil Z.^{1,2}

¹Středoevropský technologický institut MU, Brno

²Interní hematologická a onkologická klinika FN, Brno

³Lékařská fakulta MU, Brno

Úvod: Molekulární detekce BCR-ABL1 pomocí kvantitativní PCR (RT-qPCR) je standardem pro sledování zbytkové choroby u chronické myeloidní leukemie (CML). Navzdory snahám o normalizaci zůstává variabilita RT-qPCR esejí napříč laboratořemi problémem z hlediska reprodukovatelnosti a citlivosti. Digitální PCR (dPCR) je v současnosti testována jako robustní a reprodukovatelná alternativní metoda. Cílem studie bylo určit funkčnost a citlivost standardní BCR-ABL1 esejí měřené na dvou dPCR systémech, porovnání dPCR a RT-qPCR a určení vhodnosti dPCR pro sledování hladin BCR-ABL1 u CML pacientů v porovnání s GeneXpert systémem.

Metody: Míra falešné positivity (FPR) a limit detekce (LOB) QX200 a QS3D dPCR systémů byly testovány na 100 negativních kontrolách s použitím esejí z EAC protokolu. Porovnání BCR-ABL1 kvantifikace pomocí dPCR a RT-qPCR bylo provedeno na ředící řadě z CML buněčné linie. Pro komparativní analýzu dPCR a GeneXpert systému bylo použito 70 CML vzorků.

Výsledky: QX200 systém detekoval falešnou pozitivitu u 6 % negativních kontrol, FPR QS3D byla 20%. Nejvyšší detekované množství BCR-ABL1 v negativních vzorcích bylo tři kopie/vzorek pro oba dPCR systémy. dPCR byla schopná kvantifikovat na hladině 0,0001% BCR-ABL1, avšak vzhledem k falešné pozitivitě byla konečná citlivost obou dPCR systémů na hladině 0,01% BCR-ABL1 (MR4.0). Navzdory vysoké korelaci BCR-ABL1/ABL1% mezi dPCR a RT-qPCR byly u vzorků pod 0,01% BCR-ABL1 (MR3.0) zjištěny značné rozdíly v naměřených počtech kopií. Oba dPCR systémy byly schopné detekovat velmi nízké koncentrace BCR-ABL1 u klinických vzorků, což u CML pacientů s MR3.0 až MR4.5 vedlo k posunu hladiny molekulární odpovědi až o jeden řád výše oproti GeneXpertu.

Závěr: dPCR byla schopná dosáhnout úrovně MR5.5, nicméně po zohlednění FPR dosahovala citlivosti standardní RT-qPCR (MR4.0). V klinických vzorcích dPCR detekovala až o řád vyšší hladiny BCR-ABL1 než

POSTEROVÁ SEKCE

GeneXpert. Metoda dPCR umožňuje vysoce citlivou detekci BCR-ABL1 pro sledování zbytkové nemoci, avšak před jejím zavedením do praxe je třeba zohledňovat některé technické aspekty jako vhodnost esejí.

Podpořeno MUNI/A/0968/2017.

P41

MONITOROVÁNÍ TRANSKRIPTU BCR-ABL1 POMOCÍ NOVÉHO KITU CEPHEID XPERT BCR-ABL1 ULTRA NA ÚROVNI MR4.5

Jurček T.¹, Kubešová B.¹, Fischerová K.¹, Ježíšková I.¹, Dvořáková D.^{1,2}, Semerád L.², Šustková Z.², Žáčková D.^{1,2}, Mayer J.^{1,2}, Ráčil Z.^{1,2}

¹Interní hematologická a onkologická klinika FN, Brno

²Lékařská fakulta, Masarykova Univerzita, Brno

Cíle: Porovnat nový kit Cepheid Xpert BCR-ABL1 Ultra pro automatizovanou analýzu kvantitativního sledování transkriptu fúzního genu BCR-ABL1 s validovanou detekcí na úrovni MR4.5 s rutinní standardizovanou metodou RQ RT-PCR certifikovanou na úroveň MR4.5 u pacientů s chronickou myeloidní leukémií (CML).

Metody: Analyzováno bylo celkem 36 vzorků (26 periferních krví a 10 kostních dřeví) pacientů s CML sledovaných na léčbě tyrosinkinázovými inhibitory (TKI). Srovnávaná metoda GeneXpert (GX, Cepheid) je uzavřený a plně automatizovaný systém. S využitím nové soupravy Xpert BCR-ABL1 Ultra (CE IVD) detekuje hladiny transkriptu BCR-ABL1 a referenčního genu ABL1 až na úrovni molekulární odpovědi MR4.5. Výsledkem analýzy je poměr exprese obou genů vyjádřený již v jednotkách IS. Jako srovnávací metoda byly použity standardizovaná RQ RT-PCR s certifikací MR4.5. Shoda porovnání obou metod byla stanovena podle Müller et al. Leukemie 2009; 23: 1957-1963.

Výsledky: Soubor pro srovnání byl tvořen celkem 36 vzorky s hladinou transkriptu BCR-ABL1 v rozmezí 10-0,001 % IS, které byly analyzovány oběma metodami. Hodnoty získané pomocí GX Ultra vysoce korelovaly s hodnotami naměřenými pomocí standardní RQ RT-PCR ($R^2 = 0,9741$) a vykazovaly velmi malou odchylku, čímž potvrdily vysokou podobnost výsledků obou metod. Validační kritéria shody mezi analyzovanými vzorky oběma metodami byla splněna: 92 % srovnávaných vzorků leží ve dvjnásobném rozsahu (0,5-2), 97 % v trojnásobném rozsahu (0,33-3) a 100 %

v pětinasobném rozsahu (0,2-5) standardizované metody RQ RT-PCR.

Závěr: Korelace výsledků ukázala vysokou shodu stanovení kvantitativních hodnot transkriptu fúzního genu BCR-ABL1 v klinických vzorcích. Přístroj GeneXpert je automatizovaný, uzavřený systém a spolu se soupravou nové generace Xpert Ultra validovanou na MR4.5 je tak vhodný pro sledování hluboké molekulární odpovědi u pacientů s CML s dostatečnou citlivostí.

Podpořeno z projektu MZ ČR – RVO (FNBr 65269705).

P42

VYŠETŘENÍ CÍRKULUJÍCÍCH MIKROPARTIKULÍ U BCR-ABL1 NEGATIVNÍCH MYELOPROLIFERATIVNÍCH CHOROB V ZÁVISLOSTI NA PŘÍTOMNOSTI MUTACE JAK2V617F

Aswad M. H.^{1,2}, Kisoová J.^{1,2}, Ovesná P.³, Říhová L.¹, Penka M.^{1,2}

¹Oddělení klinické hematologie FN, Brno

²Lékařská fakulta Masarykovy University, Brno

³Institut Biostatistiky a analýz s.r.o.

Úvod: Mikropartikule jsou membránové fragmenty velikosti v rozmezí 0,1-1 µm, uvolněné ze všech typů buněk při jejich aktivaci či apoptóze. Mikropartikulím je přičítána prokoagulační funkce, navozená přítomností fosfolipidů na jejich vnějším povrchu. Mutace JAK2V617F hraje významnou roli u myeloproliferativních chorob (MPN); dle posledních studií je spojována se zvýšenou frekvencí trombotických komplikací.

Cíle: Cílem práce je vyhodnocení cirkulujících mikropartikulí v souboru nemocných s BCR-ABL1 negativními myeloproliferacemi ve vztahu k přítomnosti mutace JAK2V617F.

Metody: Do souboru 179 pacientů s BCR/ABL1 negativními MPN (77 mužů, 102 žen) byla zařazeno 99 pacientů s esenciální trombocytemií (ET), 51 pacientů s pravou polycytemií (PV) a 29 s primární myelofibrózou (MF). V souboru byla analyzována přítomnost trombocytárních mikropartikulí (PMP) metodou flowcytometrie (FC500 Beckman Coulter). Velikost vyšetřených vzorků dosáhla počtu 417 analýz.

Výsledky: Absolutní i relativní počet PMP u nemocných s MPN vykazoval statisticky významný rozdíl při srovnání s vyšetřením zdravých dárců ($p = 0,001$; $p = 0,043$). Pacienti s MF měli statisticky významně nižší hladiny PMP ($p = 0,008$; $p = 0,014$) než pacienti s ET

a PV. U nemocných s mutací JAK2V617F byly zaznamenány statisticky významně vyšší hladiny PMP ($p = 0,032$; $p = 0,014$). Pacienti s anamnézou trombóz měli nižší PMP než pacienti bez anamnézy trombóz, statisticky významný rozdíl byl u nemocných s trombózami vzniklými po stanovení dg. MPN ($p = 0,002$) a ve skupině JAK2V617F pozitivních ET ($0,013$; $0,006$).

Závěr: Přítomnost mutace JAK2V617F je spojována s vyšší incidencí trombotických komplikací u nemocných s MPN. Zvýšené hladiny trombocytárních mikroparticulí u JAK2V617F pozitivních nemocných mohou ukazovat na protrombotický fenotyp charakteristický pro tuto skupinu pacientů.

LITERATURA

1. Lussana F, et al. Association of V617F JAK2 mutation with the risk of thrombosis among patients with essential thrombocythaemia or idiopathic myelofibrosis: A systematic review. *Thromb Res* 2009.
2. Zhang W, et al. Clinical significance of circulating microparticles in Ph- myeloproliferative neoplasms. *Oncology Letters* 2017.

Podpořeno granty MUNI/A/0968/2017 a MZ ČR – RVO (FNBr 65269705).

MYELOYDYSPLASTICKÝ SYNDROM A Ph-NEGATIVNÍ MYELOPROLIFERACE

P43

MOLEKULÁRNĚ CYTOGENETICKÁ ANALÝZA ABERACÍ CHROMOZOMU 7 U HEMATOLOGICKÝCH ONEMOCNĚNÍ MYELOIDNÍ ŘADY

Ransdorfová Š.¹, Březinová J.¹, Šárová I.^{1,2}, Zemanová Z.², Izáková S.², Lizcová L.², Pavlišťová L.², Čermák J.¹, Šálek C.¹, Jonášová A.³, Michalová K.^{1,2}

¹Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

²Centrum nádorové cytogenetiky, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky I. LF UK a VFN, Praha

³I. interní klinika – klinika hematologie I. LF UK a VFN, Praha

Úvod: Úplná či částečná ztráta chromozomu 7 patří k rekurentním cytogenetickým změnám u nemocných s myeloidními onemocněními, jako jsou myelodysplastické syndromy (MDS) a akutní myeloidní leukemie (AML). Nález je důležitým prognostickým ukazatelem – aberace je spojena se špatnou odezvou na léčbu a rychlejší progresí onemocnění.

Cíle: Cílem studie bylo mapování přestavb chromozomu 7 pomocí molekulárně cytogenetických metod a ověření zlomových míst s použitím lokus-specifických sond. Dále, ve spolupráci s Centrem nádorové cytogenetiky VFN, určení rozdílů ve frekvenci výskytu aberací na krátkých a dlouhých ramenech (7p/7q) metodou SNP/aCGH.

Metody: V letech 2007–2017 bylo vyšetřeno 683 dospělých s AML a 840 nemocných s MDS. V buňkách kostní dřeně byla u 164 pacientů nalezena monozomie 7, delece 7q/7p nebo jiné strukturní přestavby chromozomu 7. Karyotypy byly analyzovány pomocí konvenčních a molekulárně cytogenetických technik: FISH (Abbott, Kreatech), mFISH / mBAND (MetaSystems) a array CGH / SNP (Illumina, Agilent).

Výsledky: U 151 pacientů (92 %) byla aberace chromozomu 7 prokázána v kombinaci s dalšími změnami nebo jako součást komplexního karyotypu, pouze u 13 pacientů (8 %) byla monozomie 7 jedinou aberací. Nejčastější zlomová místa byla lokalizována v oblastech 7q22, 7q31 a 7q33-7q35. Ring chromozom 7 byl nalezen v jedenácti (7 %) případech, dicentrický chromozom 7 byl prokázán u 27 (18 %) pacientů. Translokace chromozomu 7 nejčastěji zahrnovaly partnerské chromozomy 17 (n = 9,8 %), 2 (n = 6,4 %) a 11 (n = 6,4 %). Ve dvou případech byly prokázány následné klonální aberace chromozomu 7.

Závěr: Aberace chromozomu 7 byla prokázána u 11 % nemocných s MDS a AML. Byla potvrzena značná heterogenita zlomových míst, a to jak na krátkých, tak dlouhých ramenech. To vede k vysoké nestabilitě chromozomu 7 a jeho dalším změnám. Jejich detekce je nezbytná k zpřesnění diagnostiky a vyhodnocení prognostického rizika nemocných.

Podpořeno MHCR 00023736, RVO – VFN64165, GA ČR P302/12/G15.

P44

PROGNOSTICKÝ VÝZNAM ALTERACÍ GENU ASXL1 U NEMOCNÝCH SE SAMOSTATNOU DELECÍ 20Q

Březinová J.¹, Šárová I.¹, Svobodová K.², Lhotská H.², Ransdorfová Š.¹, Izáková S.², Pavlišťová L.², Lizcová L.², Skípalová K.², Hodaňová L.², Marková J.¹, Zemanová Z.², Čermák J.¹, Jonášová A.³, Michalová K.^{1,2}

¹Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

²Centrum nádorové cytogenetiky, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky I. LF UK a VFN, Praha

³I. interní klinika I. LF UK a VFN, Praha

Úvod: Alterace genu ASXL1 (20q11.21) mají důležitou úlohu v patogenezi hematologických malignit. Mutace, nalézající se především v exonu 12, představují nepříznivý faktor pro další vývoj onemocnění, na rozdíl od samostatné delece 20q-del(20q), jejíž nález v kostní dřeni řadí nemocné do skupiny s příznivou prognózou.

Cíle: Cílem naší studie bylo v souboru nemocných se samostatnou del(20q) určit frekvenci parciálních/úplných delecí genu ASXL1, identifikovat zlomová místa v tomto genu pomocí molekulárně cytogenetických/genetických technik a vyhodnotit rozdíl v přežívání mezi skupinami nemocných s parciální či totální delecí ASXL1 a bez této aberace.

Metody: U 39 nemocných (29 mužů, 10 žen) s hematologickým onemocněním: MDS (24), MPS (10), NHL (2), AML (1), trombocytémie (1), anémie (1) a samostatnou del(20q) jsme mapovali zlomová místa pomocí BAC sond, pokrývajících oblast 20q11.21 až 20q13.2 (BlueGnome, Empire Genomics). Metodou aCGH/SNP

POSTEROVÁ SEKCE

(Illumina, Agilent) jsme charakterizovali zlomová místa u devíti nemocných s parciální delecí *ASXL1*.

Výsledky: Zlom v genu *ASXL1* společně s parciální delecí 3' konce jsme identifikovali u devíti nemocných (23 %), u jedenácti (28 %) došlo ke ztrátě celé alely genu *ASXL1*, u 19 nemocných (49 %) zůstal gen na deletovaném chromozomu 20 zachován. Metoda aCGH/SNP odhalila nejčastější zlomové místo ve/za 4. exonem, exon 12 byl deletován u všech nemocných se zlomem v genu *ASXL1*. Prokázali jsme statisticky významně kratší přežívání ve skupině nemocných s alterovaným *ASXL1* genem ve srovnání se skupinou bez alterace (OS 48,6/119,0).

Závěr: Alteraci genu *ASXL1*, provázenou kratším přežíváním, jsme prokázali u 51 % nemocných se samostatnou del(20q). Aberace je významným prognostickým faktorem u nízkorizikových MDS a použitá technika umožní rychle identifikovat pacienty, u nichž je potřeba podrobnější a častější monitorování klinického stavu a průběhu onemocnění.

Podpořeno granty MZ ČR – RVO ÚHK 00023736, RVO – VFN 64165, GA ČR P302/12/G157, Progres-Q28/LFI.

P45

VÝZNAM ZÍSKANÉ UNIPARENTÁLNÍ DIZOMIE 17p VE VÝVOJI PATOLOGICKÉHO KLONU U NEMOCNÝCH S MYELODYSPLASTICKÝMI SYNDROMY A 5-del(5q)

Svobodová K.¹, Zemanová Z.¹, Lhotská H.¹, Beličková M.², Březinová J.², Lizcová L.¹, Berková A.¹, Hodaňová L.¹, Jonášová A.³, Čermák J.², Michalová K.^{1,2}

¹Centrum nádorové cytogenetiky, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky I. LFUK a VFN, Praha

²Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

³I. interní klinika – klinika hematologie I. LFUK a VFN, Praha

Nejčastější cytogenetickou aberací u nemocných s myelodysplastickými syndromy (MDS) je delece dlouhých ramen chromozomu 5-del(5q). Zisk dalších aberací během evoluce klonu je spojen s proliferací patologických buněk, vede k potlačení apoptózy a zhoršuje prognózu pacienta. Jednou z příčin zvýšené genomové nestability a vzniku nových chromozomových přestaveb by mohla být inaktivace důležitých genů v důsledku získané uniparentální disomie (UPD). Cílem práce bylo podrobně analyzovat genetické změny u pěti pacientů s del(5q) a prokázaným klonálním vývojem a posoudit význam UPD ve vývoji patologického klonu. Provedli

j jsme detailní molekulárně cytogenetickou analýzu (G-pruhování, FISH, mFISH/mBAND) buněk kostní dřeně pěti nemocných s MDS, u kterých jsme detekovali původní patologický klon se samostatnou aberací del(5q) a příbuzné subklony s del(5q) a dalšími změnami. Nebalancované změny a UPD jsme detekovali pomocí čipů CytoChip Cancer SNP 4x180K (Illumina). Mutace genu *TP53* jsme analyzovali metodou NGS (454 GS Junior, Roche). Rozsah intersticiální delece 5q se pohyboval v oblasti 5q13.4 až 5q35.2 a vždy byla prokázána ztráta často deletovaných oblastí 5q31 a 5q33. V důsledku klonálního vývoje došlo u jednoho pacienta k duplikaci del(5q) a u jednoho nemocného byl chromozom 5 zahrnut do nově vzniklé translokace t(X;5)(q13;q12). U čtyř z pěti nemocných s del(5q) jsme detekovali UPD 17p a s tím související homozygotní mutaci genu *TP53*. Velikost patologického klonu s mutací *TP53* se pohybovala od 60 do 89 % a korespondovala s procentuálním zastoupením del(5q) ve vzorku. Chybná mitotická rekombinace vede k duplikaci oblasti nesoucí heterozygotní mutaci genu. Tím vzniká UPD obsahující dvě kopie mutovaného genu a dochází k inaktivaci jeho tumor supresorové funkce nebo aktivaci onkogenu. Předpokládáme, že výskyt UPD 17p a homozygotních mutací genu *TP53* může být jedním ze spouštěcích mechanismů evoluce patologického klonu a příčinou progresu onemocnění u pacientů s MDS.

Podpořeno granty RVO – VFN 64165, GA ČR P302/12/G157, Progres-Q28/LFI.

P46

STANOVENÍ HLADIN MIRNA V KREVNI PLAZMĚ PACIENTŮ S MDS A JEJICH VYUŽITÍ V DIAGNOSTICE

Hruštincová A., Krejčík Z., Szikszai K., Ratajová E., Čermák J., Beličková M., Dostálová Merkerová M. Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

Cíle: MikroRNA (miRNA) jsou krátké molekuly podílející se na posttranskripční regulaci genové exprese. Zasahují do regulace základních buněčných procesů, jako je proliferace, diferenciace, apoptóza a další. Abnormální exprese miRNA přispívá k různým hematologickým onemocněním. Hojně zkoumány jsou miRNA z krevní plazmy, tzv. cirkulující miRNA. Výhodou je zde snadná dostupnost vzorků krevní plazmy od pacientů. Cílem studie je analýza profilů miRNA v krevní plazmě pacientů s myelodysplastickým syndromem

(MDS), porovnání hladin miRNA mezi jednotlivými subtypy MDS a identifikace miRNA s potenciálním využitím v diagnostice MDS.

Metody: RNA byla izolována z krevní plazmy pacientů s různými subtypy MDS a zdravých dárců. Profil cirkulujících miRNA byl změřen pomocí microarrays (Agilent Human miRNA Microarrays) a metodou small RNA-seq (QiaSeq, Qiagen). Výsledky byly dále ověřeny pomocí metody droplet digital PCR (Biorad), která umožnila absolutní kvantifikaci a stanovení miRNA, které by mohly být potenciálně vhodnými prognostickými markery.

Výsledky: V rámci studie jsme identifikovali změny v hladinách plazmatických miRNA u pacientů s MDS v porovnání se zdravými dárci, dále mezi jednotlivými subtypy a rizikovými skupinami (dle IPSS-R) tohoto onemocnění. V krevní plazmě pacientů s MDS jsme pozorovali signifikantně ($p < 0,01$) změněnou hladinu 48 miRNA (např. snížení miR-451a, miR-92a-3p, miR-320a/b/d/e a miR-142-3p/5p, zvýšení miR-150-5p, miR-188-5p a miR-371b-5p). Hladina několika miRNA asociovaných s hematologickými a onkologickými onemocněními (miR-27a-3p, miR-150-5p, miR-199a-5p, miR-223-3p a miR-451a) byla významně snížena u pacientů se subtypy MDS s vyšším rizikem. Multivariantní analýza prokázala, že hladina miR-451a je nezávislým prediktorem přežívání bez progresu (HR = 0,072, $p = 0,006$) a že s celkovým přežitím je významně asociovaná hladina miR-223-3p (HR = 0,039, $p = 0,032$).

Závěr: Výsledky ukazují, že profil miRNA cirkulujících v krevní plazmě by mohl přispět ke stanovení diagnózy a prognózy MDS pacientů. Nejvýznamnějšími ukazateli se zdají být hladiny miR-451a a miR-223-3p.

Podpořeno granty AZV ČR 16-33617A a 17-31398A, výzkumný záměr MZ ČR 00023736.

P47

CELOGENOMOVÝ SCREENING DLOUHÝCH NEKÓDUJÍCÍCH RNA U MYELOYDYSPLASTICKÉHO SYNDROMU

Szikszai K.¹, Krejčík Z.¹, Loudová N.¹, Hruštinová A.¹, Kléma J.², Čermák J.¹, Jonášová A.³, Beličková M.¹, Dostálová Merkerová M.¹

¹Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

²Katedra počítačů, FEL, ČVUT, Praha

³I. interní klinika – klinika hematologie I. LF UK a VFN, Praha

Cíle: Dlouhé nekódující RNA (lncRNA) regulují diferenciaci krevních buněk na mnoha úrovních a jejich

abnormální exprese přispívá k různým hematologickým onemocněním. Cílem studie je celogenomový screening lncRNA u pacientů s myelodysplastickým syndromem (MDS), srovnání expresních profilů mezi různými skupinami pacientů a identifikace lncRNA s potenciálním využitím v diagnostice MDS.

Metody: RNA byla izolována z CD34+ buněk kostní dřeně 54 pacientů s různými subtypy MDS, 14 pacientů s akutní myeloidní leukémií s myelodysplastickými rysy (AML-MRC) a devíti zdravých dárců. Expresní profily 22001 lncRNA a 17535 protein-kódujících genů byly stanoveny pomocí microarrays (Agilent).

Výsledky: Napříč všemi skupinami MDS byly (v porovnání se zdravými dárci) upregulovány lncRNA H19, MEG3, DLX6-AS1 a PRKAR2A-AS1 a naopak downregulovány PRR7-AS1, MEF2CAS1, TTN-AS1 a U3. Expresní profily pacientů s diagnózami MDS-SLD, MDS-MLD a MDS s del(5q) se více podobaly profilům zdravých dárců, přičemž profily pacientů se subtypy MDS-EB1/2 se blížily profilům pacientů s AML-MRC. Pro vytipování prognosticky významných lncRNA jsme porovnali expresní profily pacientů rozdělených podle IPSS-R. Sníženou hladinu ve skupině pacientů s vysokým/velmi vysokým rizikem (v porovnání se skupinou velmi nízké/nízké riziko) vykazovaly lncRNA TCL6, LEF1-AS1, PCED1B-AS1 a CXADRP3, naopak zvýšení bylo pozorováno u RBPMS-AS1, BAIAP2-AS1 a MCM3AP-AS41. Pacienti s del(5q) vykazovali specifický profil s nízkou expresí genů pro EPB41L4A-AS1, CTB-118N6 a MEF2C-AS1. Některé z výše uvedených lncRNA již byly publikovány v souvislosti s krvetvorbou, nicméně funkce většiny deregulovaných lncRNA dosud nebyly popsány. Bioinformatickým modelováním využívajícím naměřená expresní data lncRNA, protein-kódujících genů a anotační databáze vytváříme korelační sítě umožňující zkoumat potenciální funkce těchto lncRNA.

Závěr: Výsledky studie odhalily řadu diferenciálně exprimovaných lncRNA u různých podskupin pacientů. Podrobnější charakterizace těchto lncRNA umožňuje lepší porozumění úlohy nekódujících RNA u MDS. Výsledky dále prokazují potenciál konkrétních lncRNA jako významných diagnostických či prognostických markerů tohoto onemocnění.

Podpořeno granty AZV ČR 16-33617A a 17-31398A, výzkumný záměr MZ ČR 00023736.

P48

SLEDOVÁNÍ HLADIN VYBRANÝCH lncRNA U MYELODYSPLASTICKÉHO SYNDROMU METODOU REAL-TIME PCR

Loudová N.¹, Krejčík Z.¹, Szikszai K.¹, Hruštinová A.¹, Čermák J.¹, Jonášová A.², Beličková M.¹, Dostálová Merkerová M.¹

¹Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

²I. interní klinika – klinika hematologie 1. LF UK a VFN, Praha

Cíle: Myelodysplastický syndrom (MDS) je heterogenní onemocnění hematopoetických kmenových buněk s neúplně objasněnou patogenezi. Nedávné práce ukázaly, že dlouhé nekódující RNA (lncRNA) hrají zásadní roli v biologických procesech tím, že modifikují chromatin či regulují expresi genů zúčastněných v různých signálních drahách. Dosud existují jen omezené údaje o tom, jak jsou lncRNA zapojeny do normální a maligní hematopoézy. Cílem naší práce bylo studium vybraných hematopoeticky/onkologicky významných lncRNA ve vztahu k MDS.

Metody: Míru transkripce vybraných lncRNA (EGOT, EPB41L4, FAM225A, HOTAIRM, CHRM3A82, LEF1-AS1, LEF1, MEG3 a PVT1) jsme měřili v CD34+ buňkách kostní dřeně 81 pacientů s různými subtypy MDS, 14 pacientů s akutní myeloidní leukemií s myelodysplastickými rysy (AML-MRC) a 13 zdravých dárců pomocí real-time PCR s využitím reverzní transkripce (SuperScript IV VILO) a TaqMan Gene Expression Assays (vše Thermo Fisher Scientific).

Výsledky: V rámci studované kohorty jsme detekovali změny v hladinách exprese testovaných lncRNA mezi zdravými dárci a pacienty s MDS, na úrovni jednotlivých subtypů MDS, rizikových skupin dle IPSS-R či lncRNA asociované s konkrétním karyotypem. Např. hladina transkriptu LEF1-AS1 (lymphoid enhancer binding protein antisense RNA 1) byla u pacientů s MDS/AML-MRC významně snížena ($p < 0,0001$). Tato downregulace se s narůstajícím rizikem progresu do AML-MRC signifikantně prohlubovala (cca 6násobné snížení u MDS vyššího rizika oproti pacientům v nižším riziku, $p < 0,0001$). Míra exprese LEF1-AS1 rovněž korelovala ($r = 0,924$, $p < 0,0001$) s hladinou protein-kódujícího genu LEF1. Gen EPB41L4-AS1 (erythrocyte membrane protein band 4.1-like 4A antisense1) měl sníženou expresi u pacientů nesoucích del(5q) ($p < 0,0001$). Naopak gen PVT1 (PVT1 oncogene) vykazoval dvojnásobně vyšší hladinu exprese u MDS s del(5q) ($p = 0,0153$).

Závěr: Výsledky studie prokázaly, že transkripce konkrétních lncRNA je u MDS specificky změněna. To poukazuje na jejich význam v patogenezi onemocnění

a zároveň naznačuje jejich potenciální využití jako molekulárních markerů MDS.

Podpořeno granty AZV ČR 16-33617A a 17-31398A, výzkumný záměr MZ ČR 00023736.

P49

IMUNOHISTOLOGICKÁ EXPRESE FLI1 NA KRVETVORNÝCH BUŇKÁCH KOSTNÍ DŘENĚ SE LIŠÍ U ERYTROPOÉZY A OSTATNÍCH ŘAD

Campř V.¹, Fuchs O.², Strítěský J.³, Jonášová A.⁴, Neuwirtová R.⁴

¹Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN Motol, Praha

²Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

³Ústav patologie 1. LF UK a VFN, Praha

⁴I. interní klinika – klinika hematologie 1. LF UK a VFN, Praha

Cíle: Erytroidní buňky a megakaryocyty mají společnou progenitorovou buňku, zvanou MEP (megakaryocytární a erytroidní progenitor). Diferenciace do erytroidní nebo megakaryocytární řady je řízena řadou transkripčních faktorů a mikroRNA. Důležitým faktorem, který má úlohu v diferenciaci megakaryocytů, je Fli1. Jak již bylo publikováno, hladina mRNA pro Fli1 je zvýšena v mononukleárních buňkách krve i dřeně u MDS s izolovanou delecí chromozomu 5. Při této chromozomální aberaci se postižením RPS14 vysvětluje vznik ribozomálního stressu a následné apoptózy. Otázkou je, proč k těmto změnám dochází především v erytropoéze a nikoliv v jiných řadách, zejména megakaryocytární. Vysvětlením může být rozdílná exprese Fli1, o němž je z myšího modelu známo, že indukuje expresi antiapoptotických genů a proliferaci. Cílem naší práce bylo potvrdit odlišnou expresi Fli1 v hematopoetických buňkách jednotlivých řad.

Metody: Celkem byly vyšetřeny vzorky od 33 pacientů. V sestavě bylo 22 žen a 11 mužů s průměrným věkem 61 roků (rozmezí 15-79). Trepanobiopsie byly odebrány z různých indikací (8krát reaktivní stav, 10krát MDS del(5q), 7krát MDS non-del(5q), 4krát MPN, 3krát AML-MRC a 1krát RARS-T. Pro detekci proteinu Fli1 jsme provedli imunohistochemické vyšetření na formolem fixovaném, odvápněném a do parafinu zalitém vzorku kostní dřeně. U všech případů byla stanovena exprese Fli1 a pro přesné určení buněčných populací bylo doplněno vyšetření s dvojím značením (kombinace Fli1+glykoforin A, Fli1+E-cadherin, Fli1+CD34, Fli1+CD45).

Výsledky: Ve všech vyšetřených případech byla prokázána jaderná pozitivita na megakaryocytech, na buňkách granulocytární řady včetně blastů a na lymfocytech. Naproti tomu buňky erytroidní řady znázorněné expresí glykoforinu A, resp. E-cadherinu v případě nezralých elementů, byly zcela negativní.

Závěr: Imunohistologicky jsme prokázali expresi Fli1 na všech hematopoetických buňkách vyjma erytroidních. Expresie Fli1 se neměnila s věkem ani typem základního onemocnění. Expresie Fli1 na megakaryocytech podporuje naši domněnku o významu Fli1 pro efektivní megakaryopoézu u del(5q) syndromu, přičemž absence Fli1 v buňkách erytropoézy je nechrání před apoptózou vznikající na podkladě ribozomálního stresu.

P50

VLIV ÚČINKŮ CHELÁTORŮ ŽELEZA NA BUŇKY PACIENTŮ S MYELODYSPLASTICKÝM SYNDROMEM

Urbanová Z.^{1,2}, Veselá J.¹, Krejčík Z.¹, Dostálová Merkerová M.¹, Pejšová B.¹, Mucksová K.¹, Jonášová A.³, Čermák J.¹, Beličková M.¹

¹Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

²1. lékařská fakulta UK, Praha

³I. interní klinika 1. LF UK a VFN, Praha

Cíle: Chelatační terapie podávaná transfuzně dependentním pacientům s MDS významně prodlužuje jejich celkové přežívání a oddaluje leukemickou transformaci. Kromě vlastní chelatace toxických iontů železa bylo u chelátorů železa prokázáno i výrazné antiproliferační a proapoptotické působení na nádorové buňky a dále antimikrobiální účinky. Cílem této práce bylo zhodnotit účinky chelátoru železa deferasiroxu ve vzorcích získaných od pacientů s nízkým rizikovým MDS.

Metody: Bylo zpracováno celkem 53 vzorků CD34+ buněk z kostní dřeně od 41 pacientů s MDS s nízkým rizikem, kterým nebyla podávána imunomodulační ani hypometylační terapie. Vzorky pacientů byly rozděleny do čtyř skupin dle hodnoty feritinu a léčby chelátorem (neléčení nepřetížení, neléčení přetížení, léčení přetížení, léčení nepřetížení). Celková RNA byla reverzně a poté *in vitro* transkribována. Výsledná cRNA byla hybridizována na celogenomový expresní čip za účelem stanovení a následné analýzy profilu exprese mRNA.

Výsledky: Na základě statistické analýzy nepárovým t-testem byly identifikovány geny, u kterých se

expresie mRNA v CD34+ buňkách po podané chelataci signifikantně změnila ($p < 0,05$, min. změna 35%). Porovnáním skupiny pacientů neléčených přetížených se skupinou léčených přetížených jsme zjistili zvýšenou expresi genu *LEF1* (snížená expresie je asociovaná s progresí MDS) a genů kódující antimikrobiální proteiny *DEFA1*, *DEFA1B*, *DEFA3* a *CAMP* a sníženou expresi genu *DUSP10* (regulace MAP kináz účastnících se proliferace). Naproti tomu porovnáním neléčených nepřetížených s neléčenými přetíženými došlo k přesně opačné změně exprese u těchto genů. Dále porovnáním skupiny neléčených přetížených pacientů s léčenými nepřetíženými jsme detekovali vyšší expresi genů účastnících se odpovědi na DNA poškození a indukce apoptózy (*BRCA1*, *CASP9*, *DIABLO*).

Závěr: Z dosavadních výsledků vyplývá, že deferasirox mění expresní profil i u pacientů, u kterých nebylo po léčbě dosaženo nízkých hladin feritinu, a to tak, že pravděpodobně zpomaluje progresi onemocnění a má antimikrobiální účinky. U pacientů, u kterých bylo docíleno i dostatečné chelatace, byla zjištěna zvýšená aktivita proapoptotických genů.

Podpořeno projektem AZV 16-31689A.

P51

HYPOPLASTICKÝ MDS S MYELOFIBRÓZOU JAKO PROJEV VROZENÉHO DEFICITU RUNX1

Suková M.¹, Froňková E.², Svatoň M.², Keslová P.¹, Zdráhalová K.¹, Ptoszková H.³, Starý J.¹

¹Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol, Praha

²Childhood Leukemia Prague 2. LF UK a FN Motol, Praha

³Dětská klinika FN, Ostrava

Transkripční faktor RUNX1 (CBFA2) hraje klíčovou roli v regulaci myeloidní diferenciaci a má i zásadní význam v angiogenezi. Zatímco somatické mutace v genu *RUNX1* jsou považovány za spouštěč klonálního vývoje u myeloidních malignit (AML, MDS), zárodečné mutace jsou podkladem vzácného autozomálně dominantního onemocnění – familiární trombocytopenie s predispozicí k myeloidním malignitám (FPDMM).

Prezentujeme neobvyklý případ časně manifestace myelodysplastického syndromu s dominující myelofibrózou, jehož genetickým podkladem byla germinální mutace *RUNX1*. Devítiletá dívka sledovaná dlouhodobě pro mírnou trombocytopenii byla v roce 2002 referována na hematologii pro progredující bicytopenii (plt: $12 \times 10^9/l$, Hb: 9,4 g/l). Porucha krvetvorby byla

POSTEROVÁ SEKCE

na základě několika konsektivních vyšetření kostní dřeně uzavřena jako hypoplastický MDS s myelofibrózou (MF-2) a normálním karyotypem. V následujících 2 letech pacientka zůstala asymptomatická, bez transfuzí. Progrese nastala pod obrazem rekurentních horeček se splenomegalií a pancytopenií v prosinci 2004. Histologie kostní dřeně potvrdila progresivní myelofibrózu bez excesu blastů. Genetické analýzy vyloučily mutace v *JAK2V617F*, exon12, *CALR* i mutace asociované s myeloidní malignitou. Pro selhání krvetvorby byla pacientka indikována k HSCT (MUD-9/10, PBSC, RIC-conditioning FluMel), s nekomplikovaným potransplantačním průběhem. Jeden rok po HSCT byla dokumentována plná regenerace krvetvorby včetně vymizení myelofibrózy, remise s kompletním dárcovským chimerismem trvá 13 let po HSCT. V následně provedených celogenomových analýzách zaměřených na odhalení klonálního podkladu myelofibrózy byla prokázána mutace zasahující splice-receptor v exonu 4 genu *RUNX1* (c.271-1G>T), dříve popsána jako kauzální pro *CBFA2* haploisuficienci v rodině s *FPDMM*. Stejná mutace byla potvrzena u 12leté sestry s mírnou trombocytopenií. Idiopatická myelofibróza (IMF) je v dětském věku extrémně vzácné onemocnění, od jiných hypoplastických nebo myeloproliferativních poruch krvetvorby odlišitelné pouze na základě histopatologie. Morfologický obraz kostní dřeně u naší pacientky nesplňoval kritéria ani IMF ani RCC, proto byla diagnóza popisně uzavřena jako hypoplastický MDS s myelofibrózou. Teprve následně dostupné metody celogenomového sekvenování umožnily vysvětlit neobvyklý průběh onemocnění. Detekce zárodečné *RUNX1* mutace asociované s *FPDMM* byla sice neočekávaná, ale dalším vývojem zapadající do kontextu predispozičních syndromů k myeloidním malignitám.

Podpořeno MZ ČR – RVO FN Motol 0064203 a 15-30626A.

P52

HLADINY SOLUBILNÍCH ADHEZNÍCH MOLEKUL SOUVISÍ S LÉČEBNOU ODPOVĚDÍ NA AZACYTIDIN U NEMOCNÝCH S MYELOYDYSPLASTICKÝM SYNDROMEM VYSOKÉHO RIZIKA – VÝSLEDKY PILOTNÍ STUDIE

Kupsa T.^{1,2}, Bělohávková P.², Jebavý L.^{1,2}, Žák P.², Horáček J. M.^{1,2}

¹Katedra vojenského vnitřního lékařství a vojenské hygieny, Univerzita obrany, Fakulta vojenského zdravotnictví, Hradec Králové

²IV. interní hematologická klinika LF a FN, Hradec Králové

Cíl: Cílem projektu bylo zhodnotit vstupní hladiny vybraných cytokinů a solubilních adhezivních molekul a jejich vztah k léčebné odpovědi na azacytidin.

Metody: Byl vyšetřen vstupní vzorek séra 19 nemocných s MDS vysokého rizika, věk 70,7 ± 3,5 let, medián 72 let, léčených v letech 2015–2017. Tito nemocní byli léčeni azacytidinem 75 mg/m² v prvních 7 pracovních dnech v každém cyklu s redukcí dávky dle tolerance léčby a parametrů krevního obrazu. Léčebná odpověď byla posuzována dle IWG kritérií. V průběhu šesti cyklů byly dle léčebné odpovědi identifikovány dvě podskupiny. Do analýzy jsme dále zahrnuli věk, IPSS, karyotyp a infiltraci kostní dřeně blasty nad 15 %. Hodnotili jsme 17 analytů: interleukiny (IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10), EGF, interferon-γ, monocyte chemotactic protein-1, TNF-α, VEGF, E-selektin (E-SEL), L-selektin (L-SEL), P-selektin (P-SEL), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). Biomarkery byly měřeny za použití biochip array technologie na analyzátoru Evidence Investigator (Randox). Odchylky s (p) < 0,05 byly považovány za statisticky signifikantní.

Výsledky: Byly identifikovány podskupiny respondérů (n = 9, 47%) a rezistentních (n = 10, 53 %) k léčbě. Kompletní remise bylo dosaženo u tří nemocných (16 %). Podskupiny se nelišily věkem, IPSS, blastickou infiltrací kostní dřeně ani zastoupením normálního či komplexního karyotypu. Respondéři měli nižší hladiny ICAM-1 (229,08 ± 37,85 μg/l vs. 290,97 ± 45,3 μg/l; p = 0,0363), E-SEL (6,16 ± 1,85 μg/l vs. 16,38 ± 9,89 μg/l; p = 0,0431) a L-SEL (759,84 ± 206,74 μg/l vs. 1166,16 ± 359,83 μg/l; p = 0,0383).

Závěr: Výsledky ukazují, že nemocné s MDS vysokého rizika lze dle indikátorů nádorového mikroprostředí dále stratifikovat. Využití cytokinů a solubilních adhezivních molekul jako prognostických markerů u MDS bude předmětem dalších analýz.

Práce byla podpořena z projektu DZRO 1011 (FVZ).

P53

STUDIUM MECHANISMU VZRŮSTU HLADINY MEDIÁTOROVÉ RNA PRO CEREBLON PO PŘIDÁNÍ ERYTROPOETINU K LENALIDOMIDU U NÍZKORIZIKOVÝCH PACIENTŮ MDS PŘI ZTRÁTĚ JEJICH CITLIVOSTI NA TERAPII SAMOTNÝM LENALIDOMIDEM

Fuchs O.¹, Bokorová R.¹, Polák J.¹, Neuwirtová R.², Stopka T.², Lauermannová M.¹, Šálek C.¹, Soukupová Maaloufová J.¹, Mikulenková D.¹, Čermák J.¹, Březinová J.¹, Zemanová Z.³, Michalová K.^{1,3}, Jonášová A.²

¹Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

²I. interní klinika-klinika hematologie 1. LF UK a VFN, Praha

³Centrum onkocytogenetiky1. LF UK a VFN, Praha

Úvod a cíle: Přidání erythropoetinu (EPO) k lenalidomidu (LEN) stabilizuje EPO receptor (1). Naším cílem bylo zjistit, jak se mění hladina mRNA pro CRBN o plné délce po přidání EPO k LEN a popsat možný mechanismus. Již dříve jsme ukázali, že vysoká hladina CRBN mRNA o plné délce v mononukleárních buňkách kostní dřeně i periferní krve je předpokladem pro úspěšnou terapii lenalidomidem u nízkorizikových pacientů MDS. Účast transkripčního faktoru Nrf2 (NF-E2 related factor 2) v regulaci exprese genu pro CRBN (2) a stimulace Nrf2 pomocí EPO (3) byla popsána na jiném typu buněk.

Metody: Hladiny CRBN mRNA a Nrf2 mRNA byly měřeny v průběhu terapie LEN a po přidání EPO k LEN. Všichni pacienti byli závislí na transfuzích před začátkem terapie LEN. Rekombinantní lidský EPO (40000IU/týden) byl kombinován s LEN (5 nebo 10 mg/den) u devíti nízkorizikových pacientů MDS s del(5q) a u tří nízkorizikových pacientů MDS s normálním karyotypem. Mononukleární buňky byly izolovány na gradientu Ficoll-Paque PLUS. Hladiny plnodélkové CRBN mRNA a Nrf2 mRNA byly měřeny pomocí kvantitativní TaqMan PCR. Protein CRBN byl detekován Western blotem.

Výsledky: Zjistili jsme, že průběh hladiny Nrf2 mRNA odpovídá průběhu hladiny CRBN mRNA u nízkorizikových pacientů MDS s normálním karyotypem, ale ne u nízkorizikových pacientů MDS s del(5q). Toto jsme potvrdili u nízkorizikových pacientů MDS, kteří byli pouze na terapii EPO.

Závěr: U nízkorizikových pacientů MDS s normálním karyotypem by se podle našich předběžných analýz mohl na vzrůstu hladiny CRBN mRNA a odpovídajícího proteinu CRBN po přidání EPO k LEN podílet transkripční faktor Nrf2.

Práce byla podpořena grantem pro koncepční rozvoj výzkumné organizace (23736; ÚHKT Praha), grantem TA ČR 006 a grantem GA UK (Mgr. Radka Bokorová).

LITERATURA

1. Basiorka, et al. Cancer Res 2016; 76: 3531-3540
2. Lee, et al. Biochem Biophys Res Commun 2010; 399: 711-715.
3. Jin, et al. Ann Clin Lab Sci 2011; 41: 25-32.

P54

STUDIE GA-MDS/2013 - PŘÍSPĚVEK K OVĚŘENÍ ÚČINNOSTI PŘIDÁNÍ GRANULOCYTY STIMULUJÍCÍHO FAKTORU (G-CSF) K DOSAVADNÍ TERAPII (5-AZACYTIDINEM) U NEMOCNÝCH S MYELOYDYSPLASTICKÝM SYNDROMEM

Minařík L.^{1,2}, Dusílková N.^{1,2}, Stopka T.^{1,2}, Jonášová A.¹

¹BIOCEV1. LF UK, Vestec

²I. interní klinika - klinika hematologie 1. LF UK a VFN, Praha

Myelodysplastický syndrom (MDS) je klonální onemocnění s vysokou mortalitou a stoupající incidencí s věkem. MDS vede k blokadě diferenciaci a progresi do akutní myeloidní leukemie (AML). Výsledky léčby MDS vyššího rizika (IPSS) nejsou uspokojivé; u pacientů nevhodných pro transplantaci je lékem volby azacytidin (AZA). Terapie s AZA přes relativně nadějně výsledky nevede k dlouhodobým remisím, a proto je předmětem výzkumu. Studie GA-MDS/2013 porovnává účinky ve dvou ramenech: kombinační terapie AZA a granulocyty stimuluujícího faktoru (G-CSF) vs. monoterapie AZA. AZA je podávána standardně 75 mg/m² v režimu 5+2+2. Terapie s G-CSF je podávána den - 2 a 6. Studie GA-MDS/2013 vychází z preklinických studií prokazujících synergický efekt preinkubace s G-CSF před AZA 1, 2. V průběhu 5 let je v plánu klinické hodnocení 134 pacientů s MDS vyššího rizika. Primárními cíli studie je zhodnocení celkového přežívání (overall survival - OS), počet navozených léčebných odpovědí, tj. kompletních/parciálních remisí a hematologických odpovědí dle IWG (International Working Group), doba transformace do AML (progression free survival - PFS) a dosažení transfuzní nezávislosti. Sekundárními cíli studie je zhodnocení získaných genetických změn pomocí next generation sequencing (NGS) a zhodnocení epigenetických změn na molekulární úrovni pomocí průtokové cytometrie a měření DNA metylace. V průběhu 1. roku klinického hodnocení bylo zařazeno 18

POSTEROVÁ SEKCE

pacientů do ramena s G-CSF (G-AZA), sedm pacientů do ramena s monoterapií azacytidinem (AZA). Celkem bylo zařazeno 16 mužů a devět žen, průměrný věk byl 73 let. Každý z pacientů absolvoval alespoň jeden cyklus terapie. Studie je bezpečná ve smyslu srovnatelné progresy do akutní myeloidní leukemie v obou ramenech. Předběžné výsledky průtokové cytometrie (v markerech CD10, CD16) ukazují na prodiferenční efekt G-CSF v rameni GA. Ve vybraných parametrech klinického hodnocení existují trendy v OS a PFS, jež naznačují benefit kombinační terapie.

LITERATURA

1. Hu Z, et al. Mol Cancer Ther 2010; 9(6): 1536–1543.
2. Curik N, et al. Leukemia 2012; 26(8): 1804–1811.

P55

ALOTRANSPLANTÁCIA KRVOTVORNÝCH BUNIEK PRE MYELOYDYSPLASTICKÝ SYNDRÓM – SKÚSENOSTI CENTRA

Mistrík M., Magyaricsová L., Fliegová S., Martišová M., Bátorová A.

Klinika hematológie a transfuziológie LF UK, SZU a UN, Bratislava

Myelodysplastický syndróm (MDS) tvorí heterogénna skupina klonálnych chorôb vychádzajúcich z kmeňovej krvotvornej bunky, ktorá sa vyskytuje hlavne vo vyššom veku, čo značne limituje využitie alogénnej transplantácie krvotvorných buniek (TKB), jedinej potenciálne kuratívnej terapie. Priebežné skúsenosti ukazovali na zvýšené riziko mortality v súvislosti s transplantačnou, ale i netransplantačnou terapiou.

Cieľ: Retrospektívna analýza súboru alogénne transplantovaných na Klinike hematológie a transfuziológie LF UK, SZU a UN v Bratislave pre MDS.

Metódy: Súbor tvorí 34 pacientov s medianom veku 41 rokov (20–68 rokov), 21 mužov a 13 žien, ktorí boli transplantovaní v rokoch 2007–2014 pre MDS RAEB II (12 pacientov), RAEB I II, RCMD 6 a MDS RA 5 pacientov. Štep periférnych krvotvorných buniek pochádzal od nepríbuzného darcu 28-krát (20-krát zhoda 10/10 a 8-krát 9/10), 6-krát od HLA identického súrodenca. Myeloablatívny režim sme použili u 27 pacientov a 7-krát režim s redukovanou intenzitou.

Výsledky: Prihodenie sme pozorovali u 29 chorých, granulocyty v mediáne 14 dní (11–26), trombocyty v mediáne 13 dní (6–25). U 3 chorých sa štep neprihojil alebo bola regenerácia krvotvorby neúplná, 2 exitovali

zavčasu pred možným prihobením. Akútna reakcia štepu proti hostiteľovi (GvHD) bola u 16 pacientov, chronická GvHD u 7 pacientov. V čase analýzy žilo 13 (38 %) chorých v mediáne 712 dní (157–3607 dní), 21 exitovalo (8-krát GvHD; 7-krát infekcia; 3-krát CNS hemoragia a 3-krát iná príčina). Štatisticky významné rizikové faktory boli: štádium choroby ($p = 0,0195$), počet dní do transplantácie ($p < 0,01$), počet blastov v kostnej dreni pred transplantáciou ($p = 0,0107$) a hladina feritínu ($p < 0,01$).

Záver: Výsledky potvrdzujú kuratívny potenciál alotransplantácie, jej dostupnosť na Slovensku, ale aj zvýšené riziko komplikácií a mortality v súvislosti s nielen touto terapiou pri MDS.

P56

MANAGEMENT DIAGNOSTIKY A LÉČBY MYELOYDYSPLASTICKÉHO SYNDROMU V DLOUHODOBÉM ČASOVÉM HORIZONTU V PODMÍNKÁCH KRAJSKÉHO HEMATOLOGICKÉHO PRACOVÍŠTĚ

Kadlčková E.¹, Rohoň P.², Fürst T.³, Šálek T.⁴, Tesař J.⁵, Pelková J.¹

¹Hematologicko-transfúzní oddělení Krajské nemocnice T. Bati ve Zlíně

²Hemato-onkologická klinika LF UP a FN, Olomouc

³Katedra matematické analýzy a aplikací matematiky PŘF UP, Olomouc

⁴Oddělení klinické biochemie Krajské nemocnice T. Bati ve Zlíně

⁵Oddělení zobrazovacích metod Krajské nemocnice T. Bati ve Zlíně

Cíle: Myelodysplastický syndrom (MDS) je různorodý soubor neoplastických onemocnění, charakterizovaných selháním kostní dřeně a rizikem klonální progresy. Pro výběr terapeutické modality je důležitá stratifikace se zaměřením na riziko progresy do akutní leukemie. Přes významné pokroky v léčbě těchto onemocnění zůstává více než polovina nemocných závislých na transfuzích erytrocytů s následnou hrozbou poškození orgánů při přetížení organismu nadbytečným železem. Cílem práce bylo zmapovat diagnostiku a léčbu MDS, ověřit účinnost mezinárodních prognostických skóre a sledovat dopad ukazatelů přetížení organismu Fe na přežívání transfuzně závislých pacientů v běžné praxi.

Metódy: Studie zahrnuje 73 pacientů s MDS, kteří byli diagnostikováni a léčeni ve zlínské nemocnici v průběhu 12,5 let. Statistická analýza hodnotila prediktivní sílu IPSS, IPSS-R a WPSS (Mezinárodního,

Revidovaného mezinárodního a WHO – prognostického systému) na OS (celkové přežívání) a EFS (přežití bez události) a porovnávala je s účinností PS (performance status) a CACI (komorbiditní index). Pomocí statistických metod byl hodnocen vliv počtu podaných erytrocytárních přípravků a hladiny feritinu na přežívání transfuzně závislých pacientů.

Výsledky: Medián věku při diagnóze byl 69,5 roku, mediány přežívání celého souboru byly 7,04 roku pro OS a 2,78 roku pro EFS. Hladiny konkordancí IPSS, IPSS-R a WPSS dosahovaly 0,812, 0,892 a 0,889 pro a 0,785, 0,847 a 0,827 pro EFS. Pro OS bylo hazard ratio (HR) = 1,2 ($p < 0,0001$) mezi skupinami lišícími se v hladině feritinu o 100 jednotek, v případě EFS je toto číslo HR = 1,14 ($p = 0,001$).

Závěr: Analýza prokázala, že i v neselektovaném souboru pacientů je dostatečně účinným prediktorem přežívání kterýkoliv z trojice mezinárodně užívaných prognostických indexů, zatímco PS a CACI jsou pouze pomocným vodítkem pro určení rizika a pro výběr terapeutického přístupu MDS pacientů. Follow-up odhalil, že narůstající hladina sérového feritinu a zvyšující se počet transfuzí jsou negativními prediktory OS a EFS u transfuzně závislých a zároveň nechelatovaných pacientů.

P57

FRAKCE NEZRALÝCH TROMBOCYTŮ U NEMOCNÝCH S ESENCIÁLNÍ TROMBOCYTEMÍÍ

Kissová J.^{1,2}, Ovesná P.³, Aswad M. H.^{1,2}, Bourková L.^{1,2}, Penka M.^{1,2}

¹Oddělení klinické hematologie FN, Brno

²Lékařská fakulta MU, Brno

³Institut biostatistiky a analýz s.r.o.

Úvod: Trombotické komplikace jsou nejčastější příčinou morbidit i mortality nemocných s esenciální trombocytemií (ET). Nezralé trombocyty jsou trombocyty bohaté na RNA, nově uvolněné z kostní dřeně. Jejich

množství odráží intenzitu trombopoézy, jsou větší velikosti a hemostaticky aktivnější než zralé trombocyty.

Cíle: Cílem práce je analýza frakce nezralých trombocytů v souboru nemocných s ET.

Metody: V souboru 182 nemocných s BCR/ABL negativními myeloproliferacemi (MPN) byla analyzována frakce nezralých trombocytů (IPF a H-IPF) v době diagnózy; na základě výsledků této analýzy byla detailněji studována skupina 158 nemocných s ET (103 mužů a 55 žen). Množství nezralých trombocytů bylo vyjádřeno procentuálním zastoupením IPF a H-IPF (Sysmex XE-5000).

Výsledky: V souboru nemocných s BCR/ABL negativními MPN vykazovala skupina nemocných s ET signifikantně nižší hodnoty IPF a H-IPF ($p = 0,003$; $p = 0,001$) při srovnání s ostatními typy MPN. Srovnání nemocných s anamnézou trombózy či bez ní nevykazovalo statistickou významnost; pacienti s ET a trombózou měli vyšší IPF a H-IPF než pacienti bez trombózy ($p = 0,073$; $p = 0,054$). Vyšší hladiny IPF byly identifikovány u nemocných JAK2V617F pozitivních ($p = 0,030$), u nemocných s ET se jevila zřejmá tendence k vyšším hodnotám IPF u JAK2V617F pozitivních, rozdíl však nebyl statisticky významný. Významně vyšší hodnoty IPF a H-IPF byly zjištěny u nemocných s anamnézou tepenné trombózy před diagnózou ET ($p = 0,021$; $p = 0,012$). Pacienti s ET a kardiovaskulárními rizikovými faktory měli vyšší hladiny IPF a H-IPF ($p = 0,088$; $p = 0,042$).

Závěr: V souladu s literárními daty, která uvádějí vyšší hladiny IPF u nemocných s tepennými trombózami a kardiovaskulárními rizikovými faktory, naše analýza potvrzuje obdobné výsledky ve skupině nemocných s ET.

Podpořeno MZ ČR – RVO (FNBr 65269705).

LITERATURA

1. Barbui T, Falanga A. Molecular biomarkers of thrombosis in myeloproliferative neoplasms. *Thrombosis Research* 2016.
2. Strati P, et al. Novel hematological parameters for the evaluation of patients with myeloproliferative neoplasms: the immature platelet and reticulocyte fraction. *Ann Hematol* 2017.

AKUTNÍ LEUKEMIE

P58

STUDIUM KLONALITY AML V IMUNODEFICIENTNÍM MYŠÍM MODELU

Kosařová Z.¹, Čulen M.^{1,2,3}, Ježíšková I.², Folta A.², Janečková V.², Černá J.^{2,3}, Loja T.³, Tom N.^{2,3}, Semerád L.², Šustková Z.², Dvořáková D.^{1,2}, Mayer J.^{1,2,3}, Ráčil Z.^{1,2,3}

¹Lékařská fakulta Masarykovy Univerzity, Brno

²Interní hematologická a onkologická klinika, Brno

³Středoevropský technologický institut (CEITEC), Masarykova univerzita, Brno

Cíle: Porovnat klonalitu a frekvence mutací mezi primárním AML vzorkem a odpovídajícím xenografem a posoudit jejich proliferační význam.

Metody: Leukocyty kostní dřeně (KD) AML pacientů byly xenotransplantovány do NOD scid gamma myši. AML buňky před a po xenotransplantaci byly sekvenovány pomocí ClearSeq AML Haloplex (Agilent) na přístrojích MiSeq a NextSeq (Illumina). Výsledky byly vyhodnoceny algoritmy Pindel, VarDict a VarScan. Mutace FLT3-ITD byly hodnoceny pomocí fragmentační analýzy. Relativní VAF (relVAF) popisuje zastoupení mutace v celé populaci leukemických buněk.

Výsledky: Mutační analýza byla provedena na 22 primárních vzorcích a odpovídajících xenograftech. U 18/22 primárních vzorků byly identifikovány dominantní/zakládající klony definované mutacemi s mediánem relVAF 95 % (rozsah: 67–100 %). U 9/18 vzorků byly navíc identifikovány minoritní subklony. U 4/22 vzorků nebyla identifikována žádná mutace reprezentující dominantní/zakládající klon. Dále byla srovnávána frekvence jednotlivých mutací mezi primárním vzorkem a xenografem.

Mutace v genech DNMT3A (7/22), IDH2 (4/22), TET2 (3/22), a ASXL1 (3/22) byly identifikovány s rozdílem relVAF ≤ 15 %. Mutace v genu NPM1 detekované v primárních vzorcích byly zachovány u všech xenograftech, avšak u 3/13 vzorků došlo k nárůstu > 15 % relVAF. Mutace v genu U2AF1 zůstala zachována u 3/4 vzorků s rozdílem < 5 % relVAF, u jednoho vzorku byla detekována nově po xenotransplantaci. Mutace v genu NRAS byly po xenotransplantaci získány u 1/5 a naopak ztraceny u 3/5 vzorků. Mutace v genu FLT3-ITD nebyly zachyceny v xenograftech odvozených od 3/10 primárních vzorků, naopak byly získány v 5/10 případech. Navíc byl pozorován signifikantní trend FLT3-ITD k expanzi v xenograftech.

Závěr: Uchycení dominantních/zakládajících klonů u 18/22 xenotransplantovaných vzorků demonstruje obecnou schopnost myšního modelu simulovat klonalitu AML. Mutace reprezentující zakládající klon se vyznačují stabilní relVAF, což naznačuje jejich brzký výskyt v leukemogenezi nebo zásadní roli v klonálním vývoji. FLT3-ITD subklony vykazují preferenční růst v xenograftech způsobený vyšší proliferační kapacitou nebo nízkou závislostí na specifickém mikroprostředí.

Podpořeno z projektu MUNI/A/0968/2017 a projektu MZ ČR s reg. č. 15-25809A.

P59

STANOVENÍ METYLAČNÍHO, HYDROXYMETYLAČNÍHO A EXPRESNÍHO PROFILU U PACIENTŮ S AKUTNÍ MYELOIDNÍ LEUKEMIÍ SE SPECIFICKÝM GENETICKÝM POZADÍM

Šestáková Š.¹, Šálek C.¹, Krejčík Z.¹, Dostálová Merkerová M.¹, Cerovská E.¹, Ráčil Z.², Cetkovský P.¹, Remešová H.¹

¹Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

²Interní hematologická a onkologická klinika FN, Brno

Cíle: Pro akutní myeloidní leukemii (AML) jsou typické změny na úrovni hydroxymetylace a metylace DNA. Mutace v genu DNMT3A (30 % AML) je spojována s celkovou hypometylací genomu. Při mutaci v genech IDH1 a IDH2 (19 % AML) naopak dochází k hypermetylacii DNA. Mutace v genech DNMT3A a IDH1/2 se často vyskytují společně. Cílem bylo analyzovat specifický metylační, hydroxymetylační a expresní profil u AML pacientů s mutacemi v genech DNMT3A a IDH1/2 jednotlivě a v kombinacích.

Metody: DNA ze vzorků AML (n = 24) a zdravých kontrol (n = 4) byla podrobena bisulfitové a oxidativně bisulfitové konverzi a analyzována na čipu Infinium MethylationEPIC BeadChip (850,000 CpG). Výsledky hydroxy-/metylačních dat byly validovány metodou pyrosequencing. Pro vyšetření exprese byl použit čip HumanHT-12 v4 Expression BeadChip.

Výsledky: Klastrovací analýza na základě celkového metylačního profilu vzorky rozdělila do tří hlavních skupin: DNMT3A+, IDH1/2+ a zdravé kontroly. Vzorky s mutací v obou genech (DNMT3A&IDH1/2+) klastrovaly

preferenčně ke skupině zdravých dárců. CpG lokusy odlišně metylované (DMPs) a hydroxymetylované (DhmpPs) u AML oproti kontrolám byly nejčastěji spojovány s dráhou apoptózy a imunitní odpovědi. U skupiny DNMT3A+ byla výrazná hypometylace, naopak u vzorků IDH1/2+ převažovaly hypermetylované oblasti. Vzorky s kombinací mutací DNMT3A⁺IDH1/2+ měly výrazně menší počet DMPs a vyvážený poměr hyper- a hypometylace. U IDH2+ pacientů jsme detekovali asi 3krát více DMPs i DhmpPs než u IDH1+. Celkové počty DhmpPs byly u všech skupin o dva řády menší než u DNA metylace. Validace metylačních a hydroxymetylačních výsledků proběhla na 4 genech (CHFR, GZMB, MYB a RNF216). U genu CHFR jsme prokázali snížení transkripce ve spojitosti s DNA metylací.

Závěr: Určité genetické pozadí je spojeno se specifickým hydroxy-/metylačním profilem. Výsledkem kombinace dvou protichůdných mutací u vzorků DNMT3A⁺IDH1/2+ je směsný epigenetický profil. Mutace v genech IDH1 a IDH2 mají rozdílný vliv na hydroxy-/metylační změny v DNA. Hydroxymetylace DNA byla detekována jen u malé frakce zkoumaných lokusů (cca 0,1%), což ukazuje na menší zapojení lokus-specifickým změn v patogenezi AML v porovnání s metylací DNA.

Podpořeno grantem AZV ČR 15-25809A a MZ ČR – RVO (ÚHK 00023736).

P60

SERUM LEVELS OF CYTOKINES AND ADHESION MOLECULES IN B-CELL PRECURSOR ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA AND THEIR ASSOCIATION WITH OVERALL SURVIVAL

Horacek J. M.^{1,2}, Kupsa T.^{1,2}, Vanek J.³, Jebavy L.^{1,2}, Zak P.²

¹Department of Military Internal Medicine and Military Hygiene, University of Defence, Faculty of Military Health Sciences, Hradec Kralove

²Department of Internal Medicine IV – Hematology, University Hospital and Charles University, Faculty of Medicine, Hradec Kralove

³Department of Informatics and Quantitative Methods, University of Hradec Kralove, Faculty of Informatics and Management, Hradec Kralove

Aim: To evaluate serum levels of selected cytokines and adhesion molecules in newly diagnosed B-ALL and in complete remission (CR), and their association with overall survival (OS).

Methods: A total of 40 B-ALL patients (median age 49, range 19–75 years, 27 males) were studied. Serum samples were taken at diagnosis and in CR. The following analytes were evaluated: Interleukins (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10), IFN- γ , TNF- α , EGF, VEGF, MCP-1, Selectins (E-SEL, L-SEL, P-SEL), ICAM-1 and VCAM-1. All analytes were measured by biochip array technology on Evidence Investigator analyzer (Randox). Correlations between analytes and OS were evaluated separately in both clinical situations. Statistical evaluation was done by a professional statistician using software R 3.4.3 (R Core Team 2017). Probability values ($p < 0.01$) were considered statistically significant.

Results: At diagnosis of B-ALL, we found significantly higher levels of IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , ESEL, L-SEL, ICAM-1, VCAM-1 ($p < 0.01$) and significantly lower levels of EGF, P-SEL ($p < 0.01$) in comparison with CR. In CR, EGF correlated with P-SEL ($r = 0.755$; $p < 0.001$) and IL-1 α with IL-4 ($r = 0.612$; $p = 0.007$). Other correlations between analytes did not reach statistical significance. Inferior OS was associated with higher IL-2 levels at diagnosis ($r = 0.448$; $p = 0.003$) and higher LSEL levels in CR ($r = 0.410$; $p = 0.001$).

Conclusion: Our results show that serum levels of some cytokines and adhesion molecules are significantly altered in newly diagnosed B-ALL, reflecting activity of the disease. In our cohort of B-ALL patients, we found statistically significant correlations between inferior OS and higher IL-2 levels at diagnosis and higher L-SEL levels in CR. Better understanding of leukemia microenvironment is essential for development of new treatment approaches. Further studies in this field are warranted.

This work was supported by a long-term organization development plan 1011 (FMHS) and by program PROGRES Q40/08.

P61

MUTACE V GENU NRAS U PACIENTŮ S AKUTNÍ MYELOIDNÍ LEUKEMIÍ (AML)

Đuríníková A.¹, Ježíšková I.², Folta A.², Al Tukmachi D.¹, Kosařová Z.¹, Čulen M.^{1,2}, Dvořáková D.^{1,2}, Tom N.¹, Cetkovský P.³, Jindra P.⁶, Szotkowski T.⁵, Žák P.⁴, Mayer J.^{1,2}, Ráčil Z.^{1,2}

¹Lékařská fakulta MU, Brno

²Interní hematologická a onkologická klinika FN, Brno

³Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

⁴IV. interní hematologická klinika FN, Hradec Králové

⁵Hemato-onkologická klinika FN, Olomouc

⁶Hematologicko-onkologické oddělení FN, Plzeň

Cíle: Popsat frekvenci a typ mutací v genu NRAS u pacientů s AML a analyzovat polyklonalitu detekovaných mutací.

Metody: Analyzovány byly vzorky periferních krví z doby diagnózy 258 konsekutivních de novo AML pacientů s kurativním přístupem léčby (medián 54 let, rozpětí 19–72 let). NGS knihovny byly připraveny pomocí panelu ClearSeq AML (Agilent Technologies) a sekvenovány na přístroji NextSeq (Illumina). NGS NRAS pozitivita byla u vzorků s frekvencí variantní alely (VAF) $\geq 1\%$ ověřována analýzou na hybridizačních stripech za pomoci kitu NRAS StripAssay (ViennaLab). Testování klonality vícečetných bodových mutací bylo provedeno za pomoci kitu TA Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific), získané bakteriální klony byly sekvenovány metodou dle Sangeru.

Výsledky: NGS analýzou bylo identifikováno 58/258 (22,5 %) pacientů s mutací v genu NRAS. NGS NRAS pozitivita byla u všech vzorků (58/58, 100 %) potvrzena stripovou analýzou. U 42/58 pacientů (72,4 %) byla detekována jedna mutace genu, u zbylých 16/58 (27,6 %) pacientů byly identifikovány vícečetné bodové mutace – 12/58 (20,7 %) pacientů neslo dvě bodové mutace, 3/58 (5,2 %) 3 mutace a 1/58 (1,7 %) čtyři mutace. Celkově bylo identifikováno 13 různých genových aberací; nejfrekventovanější mutace v souboru byly: G12D (23/58; 39,7 %), G12S (14/58; 24,1 %) a G13D (12/58; 20,7 %). Polyklonalita NRAS mutací byla analyzována u tří pacientů s přítomností bodových mutací ve dvou různých kodonech. U všech tří testovaných pacientů byla každá z vícečetných NRAS mutací identifikována samostatně na separátní alele.

Závěr: U více než pětiny všech de novo AML pacientů byly identifikovány somatické mutace genu NRAS. Nejfrekventovanější byly detekovány mutace G12D, G12S a G13D. U čtvrtiny NRAS pozitivních pacientů byla zachycena polyklonalita mutací. Každá z vícečetných

bodových mutací byla identifikována na separátní alele, což ukazuje na společný výskyt více různých AML klonů současně.

Podpořeno z projektu MŠMT (MUNI/A/0968/2017), MZ ČR 15-25809A a MZ ČR – RVO (FNBr 65269705).

P62

STANOVENÍ HLADINY PROTEINU PAP V KREVNÍM SÉRU PACIENTŮ S AKUTNÍ LYMFBLASTICKOU LEUKEMIÍ JAKO MOŽNÉHO PREDIKČNÍHO MARKERU AKUTNÍ PANKREATITIDY

Starková J.^{1,2}, Wolthers B. O.³, Uhrinová K.^{1,2}, Škvárová Kramaržová K.^{1,2}, Stuchlý J.^{1,2}, Heřmanová I.^{1,2}, Šperková K.^{1,2}, Kubričanová Žaliová M.^{1,2}, Schmiegelow K.³, Šrámková L.^{1,2}, Starý J.^{1,2}, Trka J.^{1,2}

¹CLIP – Childhood Leukaemia Investigation Prague

²Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol, Praha

³Pediatrics and Adolescent Medicine, University Hospital Rigshospitalet, Copenhagen, Dánsko

Cíle: Akutní pankreatitida je jedním z nežádoucích vedlejších účinků L-asparaginázy (ASNázy), která se používá při léčbě akutní lymfoblastické leukemie (ALL) a non-Hodgkinských lymfomů. S asparaginázou asociovaná pankreatitida (AAP) se vyskytuje u 2–10 % pacientů s ALL. Zatím však není známa příčina vzniku AAP, ani neexistuje žádný predikční marker, který by pomohl časně diagnostikovat AAP a předejít vážným projevům onemocnění. V naší práci jsme měřili hladinu proteinu PAP (pancreatic-associated protein) v průběhu léčby ALL, jehož zvýšená hladina byla popsána u akutní fáze pankreatitidy.

Metody: Celkově jsme vyšetřili 33 ALL dánských pacientů (332 vzorků) léčených protokolem NOPHO ALL2008, z nichž 14 prodělalo AAP. Vzorky krevního séra byly odebrány v čase diagnózy ALL a před/po podání ASNázy. Hladina PAP byla detekována pomocí PancrePAP imunoenzymatického kitu. Výsledky byly korelovány s hladinou amylázy a lipázy, jejichž zvýšené hladiny jsou jedním z kritérií stanovení diagnózy AAP. Na základě ROC analýzy byla stanovena predikční hodnota hladiny proteinu PAP.

Výsledky: Abnormální hladinu PAP (> 95% kvantil hodnot PAP u pacientů bez AAP) překročilo alespoň jednou 14/14 pacientů s AAP a 4/17 pacientů bez AAP. Abnormální hladina PAP u pacientů s AAP byla detekována signifikantně dříve (medián 23 dní před AAP) než

POSTEROVÁ SEKCE

v případě amylázy a lipázy ($p \leq 0,0001$, resp. $p = 0,0164$). Predikční hodnota PAP ve smyslu AUC byla k 60. dni 0,72 (0,53–0,92), a dosáhla 0,83 (0,67–0,99) v den 90. U 10/11 AAP přetrvávala abnormální hladina PAP také po diagnóze na rozdíl od amylázy/lipázy, jejichž zvýšení bylo pouze transienční v době diagnózy AAP.

Závěr: Prokázali jsme, že lze stabilně měřit hladinu PAP v zamražených vzorcích krevního séra pacientů s ALL. Kinetika hladiny PAP v séru je odlišná od amylázy/lipázy. Ze statistické analýzy vyplývá, že od 60. dne léčby ALL lze zvýšení hladiny PAP použít jako prediktor manifestace AAP. V současnosti probíhá měření a analýza dat české ALL kohorty.

Podpořeno MZ ČR AZV NV18-07-00129 a GAUK 976218.

P63

LYMFOCYTY INFILTRUJÚCE LEUKÉMIU (LIL) U HLA-DR NEGATIVNÝCH AML

Cingelová S.¹, Mlčáková A.¹, Mikušková E.¹, Demitrovičová L.¹, Oravcová I.¹, Mikudová V.¹, Kevická S.¹, Slobodová A.¹, Gyárfáš J.¹, Mego M.², Drgoňa L.¹

¹Klinika onkohematologie LF UK a NOÚ, Bratislava

²II. Onkologická klinika LF UK a NOÚ, Bratislava

Úvod: Lymfocyty infiltrující leukémii (LIL) sú významnou súčasťou mikroprostredia leukemickej kostnej drene. Aktivácia cytotoxických T-lymfocytov vyžaduje kostimuláciu pomocnými CD4+ lymfocytmi. CD4+ lymfocyty sa stretnú s malígnym antigénom prostredníctvom molekúl systému HLA II na povrchu APC (antigén prezentujúcich buniek), ktoré fagocytujú apoptotické a nekrotické malígne bunky. Malígne bunky exprimujúce HLA II môžu amplifikovať túto imunitnú odpoveď. Cieľom našej práce je charakterizovať lymfocyty infiltrujúce kostnú dreň pacientov s HLA-DR negatívnou AML v porovnaní s HLA-DR pozitívnymi AML, ako aj vplyv HLA-DR negativity na počet blastov a prognózu.

Metódy: V retrospektívnej štúdií sme analyzovali údaje 73 novodiagnostikovaných pacientov s AML (okrem APL) liečených v Národnom onkologickom ústave v Bratislave v období 2012–2017. Diagnózu AML sme potvrdili morfológickým, fenotypovým a genetickým vyšetrením punktátu kostnej drene. Imunofenotypizáciou sme stanovili aj počet a subtypy lymfocytov (T-Ly, B-Ly, NK-Ly a CD4+). Asociáciu medzi imunofenotypovou charakteristikou blastov

kostnej drene, profilom LIL a percentom blastov sme testovali pomocou Kruskal-Wallisovho testu, celkové prežívanie a podiel odpovedí na liečbu sme hodnotili pomocou log-rank testu a Fisherovho testu, v multivariačnej analýze pomocou Coxovho regresného modelu a logistického regresného modelu vzhľadom na genetické riziko.

Výsledky: HLA-DR pozitívnych bolo 65 pacientov (89 %) a HLA-DR negatívnych bolo 8 pacientov (11 %). HLA-DR negatívni pacienti mali v kostnej dreni signifikantne vyšší počet blastov (medián 92,2 % vs. 63,3 %, $p = 0,005$), menej lymfocytov (medián 3,5 % vs. 8,0 %, $p = 0,01$), menej T-lymfocytov (medián 2,5 % vs. 6,8 %, $p = 0,007$) a menej CD4+ lymfocytov (medián 1,2 % vs. 3 %, $p = 0,01$), v počte B-lymfocytov a NK-buniek nebol signifikantný rozdiel. V počte infekcií, v celkovom prežívaní a odpovedi na liečbu sme tiež významný rozdiel nezaznamenali.

Záver: Pacienti s akútnou myeloblastovou leukémiou HLA-DR negatívnou majú profil LIL odlišný od tých s HLA-DR pozitivitou, čo môže mať vplyv na počet blastov v kostnej dreni, klinický význam si však vyžaduje ďalšie štúdie.

P64

CENTRÁLNÍ NEUROTOXICITA JAKO KOMPLIKACE LÉČBY AKUTNÍ LYMFBLASTICKÉ LEUKEMIE U DĚTÍ V ČESKÉ REPUBLICE

Šípek J.¹, Sadílková P.¹, Šrámková L.¹, Janotová I.¹, Štěrba J.², Pospíšilová D.³, Timr P.⁴, Blažek B.⁵, Votava T.⁶, Procházková D.⁷, Hak J.⁸, Starý J.¹

¹Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol, Praha

²Klinika dětské onkologie FN, Brno

³Dětská klinika FN, Olomouc

⁴Dětská oddělení, Nemocnice České Budějovice

⁵Klinika dětského lékařství FN, Ostrava

⁶Dětská klinika FN, Plzeň

⁷Dětské oddělení, Masarykova nemocnice, Ústí nad Labem

⁸Dětská klinika FN, Hradec Králové

Cíle: Centrální neurotoxicita v průběhu léčby akutní lymfoblastické leukemie (ALL) je poměrně častou a závažnou komplikací, která podle své tíže nejen negativně ovlivňuje intenzitu a účinnost léčby, ale také může pacienty přímo ohrožovat na životě a způsobit závažné trvalé následky. Naším cílem bylo zmapovat četnost, charakter a závažnost neurotoxických epizod včetně jejich následků.

Metoda: Hodnotili jsme centrální neurotoxicitu v průběhu léčby ALL na protokolech ALL IC BFM 2002 a AIEOP BFM ALL 2009, kdy byly toxické události systematicky hlášeny, detailní informace o jednotlivých událostech jsou k dispozici až na protokolu AIEOP BFM ALL 2009. V této skupině pacientů jsme jednotlivé události definovali podle obecně uznávaných kritérií jako stroke-like syndrom (SLS), posterior reverse encephalopathy syndrom (PRES), steroidní psychózu a centrální neurotoxicitu vyvolanou nepřímo, tj. krvácením, metabolickou nebo trombotickou etiologií.

Výsledek: V průběhu protokolu ALL IC BFM 2002 bylo léčeno 291 pacientů, počet hlášených centrálních neurotoxicit byl 29, což odpovídá necelým 10%. Na protokolu AIEOP BFM ALL 2009 bylo léčeno 407 pacientů, výskyt centrální neurotoxicity léčby byl obdobný a byl zaznamenan u 32 pacientů, což odpovídá necelým 8 % léčených. Nejčastěji reportovanou neurotoxiciou byl PRES, celkem 18 hlášení. Z důvodu závažné centrální neurotoxicity bylo 20 pacientů přeloženo na JIP/ARO, sedm vyžadovalo intubaci, tři pacienti i oběhovou podporu, u 12 pacientů došlo k opakovaným epizodám. Minimálně u deseti pacientů (tj. u 30 %) přetrvávají dosud následky proběhlé neurotoxicity.

Závěr: Moderní léčebné protokoly jsou velmi intenzivní, což zvyšuje úspěšnost léčby základního onemocnění avšak za cenu významné nežádoucí toxicity. Centrální neurotoxickou epizodu vyvine během léčby ALL přibližně 8 % pacientů, což je nezanedbatelný počet. Pochopení mechanismů centrální neurotoxicity a možnosti její prevence a léčby přispívají ke zlepšení péče o pacienty s ALL.

Podpořeno MZ ČR – RVO, FN Motol 00064203.

P65

REÁLNÉ SKÚSENOSTI JEDNÉHO CENTRA S LIEČBOU DOSPELÝCH PACIENTOV S AKÚTNOU PROMYELOCYTOVOU LEUKÉMIOU – VČASNÉ ÚMRTIA (2002–2018)

Oravcová I.^{1,2}, Mikušková E.¹, Demitrovičová L.¹, Mikudová V.¹, Cingelová S.¹, Kevická S.¹, Slobodová A.¹, Drgoňa L.^{1,2}

¹Oddelenie onkohematológie II, Klinika onkohematológie LF UK a NOÚ, Bratislava

²Oddelenie onkohematológie I, Klinika onkohematológie LF UK a NOÚ, Bratislava

Cieľ: Reálny výskyt včasnej smrti (ED) pri akútnej promyelocytovej leukémii (APL) je vyšší, než sa uvádza

v klinických štúdiách. Analyzovali sme biologické a laboratórne charakteristiky vo vzťahu k ED u pacientov s APL.

Metódy: ED sme definovali ako smrť z akejkoľvek príčiny počas indukcie. Pacientov nad 18 rokov sme liečili podľa španielskych liečebných protokolov (LPA96, LPA99, LPA2005) a od júna 2017 protokolom talianskej a nemeckej skupiny (GIMEMA + DSIL, APL 0406). Analyzovali sme vek, pohlavie, leukocyty, trombocyty, blasty v periférnej krvi (PK) a kostnej dreni (KD), laktátdehydrogenázu, HLA-DR, expresiu CD56, fibrinogén, PT, APTT, prídavné chromozomálne abnormality a podtyp PML/RARA transkriptu vo vzťahu k ED.

Výsledky: 25 pacientov s APL sme diagnostikovali a liečili od 10/2002 do 3/2018. Pozorovali sme celkovo sedem ED (28 %), ktoré tvorili 70 % všetkých APL úmrtí. Šesť (24 %) ED bolo z hemoragickej príčiny, štyri (16 %) pacienti mali intracerebrálnu a dva (8 %) pacienti pľúcnu hemorágiu. Jeden (4 %) pacient zomrel na syndróm spôsobený rozpadom nádoru. 17 (68 %) pacientov dosiahlo prvú kompletnú molekulovú remisiu, dva pacienti zomreli v relapse a jedna žena s primárnym promyelocytovým sarkómom prsníkov nedosiahla kompletnú remisiu, odmietla ďalšiu liečbu a zomrela. V mediáne sledovania 45 mesiacov (0,16–159 mesiacov) bol odhad 3-r OS a RFS 73,7% CI 95% (55,5–91,8%) a 68,8% CI 95% (49,5–88,1%). Univariačná analýza preukázala vzťah nasledovných faktorov, najviac ovplyvňujúcich prežívanie: počet leukocytov $\geq 10 \times 10^9/l$ ($p = 0,01$), blasty v PK $\geq 70\%$ ($p = 0,005$), PT-INR $> 1,5$ ($p = 0,001$), APTT ≥ 35 s ($p = 0,012$). Rizikové faktory spojené s včasnou smrťou boli: Le $\geq 10 \times 10^9/l$ ($p = 0,007$), blasty v PK $\geq 70\%$ ($p = 0,005$), PT-INR $> 1,5$ ($p = 0,003$) a LDH $> 4 \mu\text{kat/l}$ ($p = 0,001$).

Záver: Hemorágia je najčastejšou príčinou ED. Rýchly transport do špecializovaného centra, rozpoznanie vysokorizikového pacienta a podporná liečba sú kľúčovými postupmi na dosiahnutie priaznivého prežívania pacientov s APL. Naše výsledky sú porovnateľné s údajmi z epidemiologických štúdií a onkologických registrov.

P66

OXID ARSENITÝ (ATO) V KOMBINACI S TRETINOINEM (ATRA) V PRVNÍ LINII LÉČBY AKUTNÍ PROMYELOCYTÁRNÍ LEUKEMIE (APL)

Kořístek Z.^{1,2}, Richterová P.^{1,2}, Navrátil M.¹, Benková K.^{1,2}, Stejskal L.^{1,2}, Hájek R.^{1,2}

¹Klinika hematologie FN, Ostrava

²Lékařská fakulta, Ostravská univerzita v Ostravě

Cíle: Necytostatická indukční léčba s využitím kombinace ATO + ATRA je u pacientů s akutní promyelocytární leukémií nízkého a středního rizika dle Sanze velmi dobře tolerovaná, šetrnější a z dlouhodobé perspektivy účinnější, než léčba založená na kombinaci chemoterapie a ATRA, což jednoznačně prokázala studie APL 0406 (Platzbecker et al. JCO 2017). Cílem sdělení je informovat o našich zkušenostech s uvedenou terapií.

Metody: Od 3/2016 do 4/2018 zahájilo léčbu kombinací ATO + ATRA 5 pacientů (tři ženy, dva muži) ve věku 21–82 let (medián 54 let) s PML/RARa pozitivní APL. Indukční léčba zahrnovala podávání ATO v dávce 0,15 mg/kg/den a ATRA v dávce 45 mg/m²/den. Na indukční léčbu navazovala konsolidační terapie, opět kombinace ATO + ATRA (popsaná ve studii APL0406).

Výsledky: ATO byl u čtyř pacientů podáván 26–28 dnů, u jednoho pacienta 42 dnů. Všichni pacienti dosáhli po indukci hematologické kompletní remise a čtyři pacienti molekulární remise v mediánu 43 dnů od zahájení ATO (den 34–49). Koncentrace granulocytů se normalizovala (koncentrace v periferní krvi > 1 × 10⁹/l) v mediánu 6 dnů (5–33) od startu ATO. Průměrně si indukční léčba vyžádala podání 7 trombokonzentrátů (0–19, medián 3), přičemž jeden pacient podstoupil během indukce resekci plíce pro mykotické ložisko, které bylo přítomné již v době stanovení diagnózy. Jeden pacient s mikrogranulární variantou APL prodělal nekomplikovaný diferenciační syndrom. Všichni nemocní žijí, u čtyř pacientů trvá molekulární remise (130–729 dnů), jedna pacientka v současnosti podstupuje konsolidační terapii (ATO + ATRA).

Závěr: Necytostatická indukční léčba APL byla dobře tolerovaná a nevedla k útlumu krvetvorby a komplikacím vyplývajícím z protražované neutropenie. Diferenční syndrom se rozvinul pouze u jednoho pacienta. Indukční léčba ATO + ATRA byla vysoce účinná a navodila u 4/5 pacientů molekulární remisi. Nízký výskyt komplikací, dobrá snášenlivost a vysoká účinnost je bohužel vykoupena vyššími náklady na léčebný přípravek obsahující ATO.

TRANSPLANTACE

P67

STARŠÍ PACIENTI S RELABOVANÝMI ČI REFRAKTERNÍMI NEHODGKINSKÝMI LYMFOMY (NHL) INDIKOVANÍ K AUTOLOGNÍ TRANSPLANTACI (ASCT) – ZKUŠENOSTI Z JEDNOHO PRACOVISŤE

Pytlík R.^{1,2}, Vacková B.², Trnková M.², Blahovcová P.², Pohleisch D.², Polgárová K.², Konířová E.², Klener P.^{2,3}, Benešová K.², Cetkovský P.¹, Trněný M.²

¹Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

²I. interní klinika I. LF UK a VFN, Praha

³Ústav patologické fyziologie I. LF UK, Praha

Cíle: Zhodnotit výsledky léčby u starších pacientů (≥ 60 let) s R/R NHL konsekutivně indikovaných k ASCT na I. interní klinice I. LF UK a VFN Praha v letech 2006–2016.

Metody: Pacienti s R/R NHL ≥ 60 let indikovaní k ASCT byli identifikováni podle týdenních záznamů transplantační skupiny. Kategorická data byla srovnána pomocí chí-square testu, kontinuálně Mannovým-Whitneyovým U testem. Křivky přežití byly konstruovány dle Kaplan-Meiera a srovnány log-rank testem.

Výsledky: Věkový medián 114 identifikovaných pacientů byl 64 let (60–71); 52 % byli muži, nejčastějšími diagnózami byly difuzní velkobuněčný B-lymfom (DLBCL, 43 %) a folikulární lymfom (FL, 31 %, včetně transformovaných FL), 31 % nemocných mělo indolentní a 69 % agresivní histologie. 94 pacienti (82 %) byli mobilizováni a 62 (54 %) byli transplantováni. Nejčastějším důvodem pro nepodání ASCT byla rezistentní choroba (20 nemocných) a selhání mobilizace (14 nemocných). 69 % pacientů dosáhlo léčebné odpovědi (ORR) po záchranné léčbě ± ASCT, z toho 54 % kompletní remise (CR). Po ASCT bylo 85 % ORR a 72 % CR. Medián celkového přežití (OS) byl 53,7 měsíce a přežití bez progresu (PFS) 22,6 měsíce při mediánu sledování žijících pacientů 50,3 měsíce (5,9–131,3). Nezávislými vstupními negativními prognostickými faktory pro OS před zahájením léčby byly agresivní histologie, věk (≥ 65 let, ECOG ≥ 2 a LDH nad normu, pro PFS pak šlo o agresivní histologii, vyšší věk a vysoký ECOG. U pacientů s odpovědí na záchrannou léčbu podání ASCT významně prodlužovalo PFS (60,1 vs. 10 měsíců, p = 0,015), pro OS nebyly rozdíly statisticky významné (94,3 vs. 55,7 měsíce, p = 0,09).

Závěr: Přes 50 % pacientů s R/R NHL ≥ 60 let indikovaných k ASCT nakonec transplantace dosáhlo.

Chybějící statistická signifikance provedené ASCT pro OS je patrně dána malým počtem nemocných. ASCT by měla být rutinně nabízena pacientům s R/R NHL ve věku 60–70 let, zejména při odpovědi na záchrannou léčbu.

Podpořeno granty AZV16-310092A a AZV 17-28980A.

P68

TKÁŇOVÁ DETEKCE VIROVÉ DNA U NEMOCNÝCH SE SYMPTOMY STŘEVNÍ AKUTNÍ NEMOCI ŠTĚPU PROTI HOSTITELI (aGVHD) A JEJÍ VÝZNAM PRO DIFERENCIÁLNÍ DIAGNOSTIKU A KOMPLEXNÍ LÉČBU

Raida L.¹, Rusiňáková Z.¹, Kuba A.¹, Szotkowská R.¹, Faber E.¹, Skoumalová I.¹, Rohoň P.¹, Brychtová S.², Bartková M.^{3,4}, Papajík T.¹

¹Hemato-onkologická klinika LF UP a FN, Olomouc

²Ústav molekulární patologie LF UP a FN, Olomouc

³Ústav mikrobiologie LF UP a FN, Olomouc

⁴Oddělení klinické biochemie FN, Olomouc

Cíle: Zhodnotit význam vyšetřování DNA vybraných virů v endoskopicky biopsované rektální/kolické sliznici nemocných s rozvojem klinických symptomů možné střevní aGVHD z hlediska diferenciální diagnostiky, léčby a bezprostřední prognózy po alogenní HSCT.

Metody: 39 dospělých s příhobenou dárcovskou krvetvorbou a rozvojem průjmů v mediánu 40 (12–140) dní po alogenní HSCT podstoupilo rektoskopii a/nebo koloskopii s biopsií střevní sliznice k histologickému a virologickému vyšetření. Vyšetření spočívala v posouzení histopatologických známek a event. stupně střevní aGVHD, PCR analýze přítomnosti CMV, EBV, HHV6, PVB19 a ADV DNA v biopsované sliznici. Nálezy byly analyzovány ve vztahu k rozsahu možné aGVHD, rezistenci na komplexní, jak imunosupresivní, tak antivirovou léčbu a úmrtí v souvislosti s transplantací (TRM).

Výsledky: Žádné histopatologické známky, stupeň I, II a III/IV střevní aGVHD byly patologie potvrzeny v devíti (23,1 %), devíti (23,1 %), jedenácti (28,2 %) a deseti (25,6 %) případech. Klinické postižení gastrointestinálního traktu stadia III/IV bylo vstupně pozorováno u jedenácti (28,2 %) příjemců. Dvacet (51,3 %) nemocných

POSTEROVÁ SEKCE

primárně rozvinulo celkové symptomy aGVHD stupně III/IV. Dvacet pět (64,1 %) bylo při manifestaci příznaků febrilních. CMV (5; 12,8 %), EBV (12; 33,3 %), HHV6 (34; 87,2 %) a/nebo PVB19 (21; 53,8 %) DNA byly nalezeny ve sliznici střeva 37 (94,9 %) příjemců. Histopatologický stupeň, střevní stádium ani celkový rozsah aGVHD nebyly významně ovlivněny detekcí virových DNA ve sliznici. U deseti (25,6 %) nemocných symptomy ustoupily pouze na antivirové a podpůrné léčbě. U 18 (62,1 %) pacientů rezistentních na imunosupresiva byla přidána antivirová léčba, ve čtyřech (22,2 %) případech s následným dosažením kompletní klinické odpovědi. Refrakterita na komplexní léčbu (14; 35,9 %) a incidence TRM nebyly ovlivněny virologickým nálezem ve sliznici ani střevním stádiem a celkovým stupněm aGVHD. Riziko TRM signifikantně zvýšila terapeutická rezistence (92% [95% CI 80,2–100%] vs. 12,9% [95% CI 0–26,2%]; $p < 0,00001$).

Závěr: PCR virologická analýza biotovaných postižených tkání může hrát významnou roli v diferenciální diagnostice aGVHD a následné komplexní léčbě nemocných po alogenní HSCT.

Podpořeno MZ ČR – RVO (FNOI 00098892) a IGA-LF-2018-004.

P69

VÝSLEDKY ALLOGENNÍ TRANSPLANTACE U PACIENTŮ S CML V ÉŘE TYROSINKINÁZOVÝCH INHIBITORŮ

Šťastná Marková M., Vydra J., Válková V., Klamová H., Nováková L., Čemusová B., Kolář M., Cetkovský P., Vítek A.

Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

Úvod: Zavedení tyrosinkinázových inhibitorů (TKI) do léčby CML změnilo osud většiny pacientů. Allogenní transplantace pak zůstává volbou pro pacienty, u kterých není užití TKI z jakýchkoliv důvodů vhodné.

Metody: Hodnotili jsme 46 pacientů transplantovaných s diagnózou CML v letech 2005–2017, tj. v období s dostupností TKI jako 1. linie léčby. Jedenáct bylo transplantováno před vyčkáním plného efektu TKI, osm pacientů bylo diagnostikováno v pokročilé fázi onemocnění, pět pacientů bylo komplikováno toxicitou TKI a 18 pacientů progredovalo na terapii TKI. Kromě dvou pacientů byli transplantováni plným přípravným režimem s použitím ATC u nepříbuzných dárců. Bylo hodnoceno celkové přežití a incidence relapsu na podkladě důvodu k transplantaci, stavu onemocnění a přítomnosti GVHD.

Výsledky: Přežití ve 2 a 10 letech bylo 75%, resp. 70%. Významně se lišilo mezi up-front transplantovanými a pacienty v pokročilé fázi či s nedostatečnou odpovědí na TKI: v 5 letech 100%, resp. 64% a v 10 letech 92%, resp. 62%. Přežití pacientů diagnostikovaných v pokročilé fázi (AP), kteří dostali indukční chemoterapii spolu s TKI ve srovnání s pacienty v chronické fázi (CP) se selhávající odpovědí na TKI byla ve 2 letech 88%, resp. 65%, v 5 letech 85%, resp. 58% statisticky v tomto počtu nevýznamně. Při srovnání pacientů diagnostikovaných a zůstávajících v CP (CP1) (bez up-front transplantací) měli diagnostikovaní v CP progredující do AP při TKI (CP2) a diagnostikovaní v AP (AP) horší přežití (CP1 – 92%, CP2 – 27%, AP – 87%). Výskyt aGVHD gr. 2–3 snižoval přežití, výskyt c GVHD zlepšil přežití v 5 letech na 83% vs. 70%.

Závěr: Zavedení TKI do léčby CML vyselektovalo pacienty s biologicky špatným onemocněním. Pacienti diagnostikovaní v pokročilém onemocnění, ale transplantováni v remisi navozené chemoterapií spolu s TKI mají lepší výsledky než primárně či sekundárně TKI rezistentní. Zdá se, že graft versus leukemia effect podobně jako u historických transplantací hraje úlohu i u této skupiny.

P70

PROGNOSTICKÝ VÝZNAM MINIMÁLNÍ REZIDUÁLNÍ NEMOCI PŘED ALOGENNÍ TRANSPLANTACÍ U PACIENTŮ S AML A MUTOVANÝM NPM1

Válková V., Vydra J., Vítek A., Šťastná Marková M., Polák J., Petrboková R., Cerovská E., Nováková L., Čemusová B., Kolář M., Šálek C., Cetkovský P.

Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

Cíle: Zhodnotit význam MRD u pacientů s AML a mutovaným NPM1, kteří podstoupili alogenní transplantaci.

Metody: Analyzovali jsme 60 pacientů transplantovaných v období 3/2004 – 6/2017, věkový medián byl 52 let, medián sledování 19 měsíců; 43% pacientů bylo FLT3-ITD pozitivních. Při alo-SCT bylo 44 pacientů v CR1, 12 v CR2 a čtyři byli refrakterní. Přípravný režim byl u 42 myeloablativní, u 18 redukované intenzity. Dárci byli 10krát IS, 4krát haploidentičtí, 31krát MUD a 15krát MMUD. Štěp byl 53krát PBPC, 7krát BM. Předtransplantační NPM1-MRD bylo vyšetřováno z periferální krve. Za MRD negativní byli považováni pacienti s hodnotou ≤ 10 mutovaných kopií NPM1/10 000 kopií

ABL. Při alo-SCT bylo 47 pacientů MRD negativních a 13 pozitivních.

Výsledky: Pravděpodobnost relapsu (RI), non-relapsového úmrtí (NRM), přežití bez relapsu či úmrtí (EFS), celkového přežití (OS) a chronické GVHD pro celý soubor ve 3 letech byla 21 %, 32 %, 43 %, 53 % a 84 %; 31 pacientů mělo akutní GVHD. 18 pacientů dostalo DL. Signifikantně lepší EFS a nižší RI bylo u MRD neg. pacientů (RI a EFS 19 % a 54 % a 64 % a 13 % u MRD neg. a MRD poz., $p = 0,001$). OS se mezi oběma skupinami statisticky významně nelišilo. V multivariantní analýze jsme z hlediska EFS pozorovali horší výsledky u FLT3-ITD pozitivních pacientů (HR 2,34; 95%CI 1,08-5,07; $p = 0,03$). NPM1 negativita byla spojena s nižším (HR 0,17 (0,05-0,61) $p = 0,006$) a FLT3-ITD pozitivita s vyšším RI (HR 7,76 (1,5-40), $p = 0,014$).

Závěry: V našem souboru NPM1 pozitivních pacientů s AML byla MRD pozitivita před alo-SCT spojená s vyšší incidencí relapsu. Celková NRM byla relativně vysoká, stejně tak incidence GVHD. Nicméně právě rozvoj GVL efektu (v souvislosti s GVHD) vedl pravděpodobně k překonání negativního dopadu vyšší incidence relapsů u MRD pozitivních pacientů a celkové přežití se oproti MRD negativním statisticky významně nelišilo.

P71

MINIMÁLNÁ DÁVKA KRVOTVORNÝCH BUNIEK PŘI AUTOLÓGNEJ TRANSPLANTÁCI PŘE MNOHOPOČETNÝ MYELÓM

Mistrík M., Hrubíško M., Pribulová H., Jánošová O., Harrachová D., Martinka J., Sopko L., Simančíková I., Skraková M., Bátorová A.

Klinika hematologie a transfuziologie LF UK, SZU a UN, Bratislava

Úvod: Autológna transplantácia krvotvorných buniek (ATKB) predstavuje štandardnú súčasť liečby pacientov s mnohopočetným myelómom (MM), ktorá je často spojená s radom výrazných komplikácií vrcholiacimi počas granulocytopenie. Viaceré štúdie dokumentovali vzťah medzi počtom CD34+ buniek a rýchlosťou hematologického zotavenia a definovali štandardné množstvo CD34+ buniek v štepe ($3,0-5,0 \times 10^6/\text{kg}$). Ovšem, nie vždy sa podarí mobilizácia, ktorá umožní odber optimálneho množstva krvotvorných kmeňových buniek. Navyše, predbežné údaje na našom pracovisku naznačovali, že transfúzia menšej ako štandardnej dávky $3,0-5,0 \times 10^6$ CD34+ buniek/kg hmotnosti pacienta pri ATKB je dostatočná a nesúvisí s dlhším časom do prihojenia.

Ciel': Stanoviť minimálne množstvo CD34+ buniek a CFU v štepe, ktoré je potrebné na spoľahlivú regeneráciu krvotvorby u pacientov s MM, ktorí sa podrobili ATKB po vysokej dávke melfalanu, 200 mg/m².

Metódy: Retrospektívne sme vyhodnotili prihojenie granulocytov (Gr) ako dosiahnutie $>1 \times 10^9/\text{l}$ a trombocytov (Tr) $>20 \times 10^9/\text{l}$ v závislosti na množstve transfundovaných CD34+ buniek a CFU u 143 pacientov transplantovaných na KHaT LF UK, SZU a UN Bratislava v rokoch 2014-2018 pre mnohopočetný myelóm. Súbor tvorí 74 mužov a 69 žien s mediánom veku 65 rokov (rozsah 33-74 ku dňu vyhodnotenia).

Výsledky: Množstvo podaných CD34+ buniek sa pohybovalo od 1,05 do $6,8 \times 10^6/\text{kg}$ ($F = 2,7$) a CFU 38,9-329,5 $\times 10^4/\text{kg}$ ($F = 121,3$). Prihojenie v prípade Gr bolo v rozmedzí 8-22 dní ($F = 11,0$) a pri Tr $>20 \times 10^9/\text{l}$ (= nezávislosť na transfúziách a možnosť prepustenia pacienta) od 8-22 dní ($F = 11,5$). Najdlhšie doby prihojenia sme nepozorovali u kvantitatívne najmenších štepov, korelácia rýchlosti prihojenia s počtom podaných CD34+ buniek nebola významná (v prípade Le R2 = 0,032 a Tr R2 = 0,048). Nevyskytla sa žiadna mortalita v súvislosti s terapiou.

Záver: Pokiaľ transplantát spĺňa minimálne požiadavky na dostatočný štep ($\geq 1,0 \times 10^6$ CD34+ buniek/kg), ďalšie zvyšovanie množstva podaných buniek významnejšie neurýchlovalo regeneráciu krvotvorby. Transfúzia nižšej ako štandardnej dávky autológných kmeňových buniek po vysoko-dávkovanej chemoterapii nesúvisí s neskorším prihojením po ATKB pre MM.

P72

VÝZNAM IMUNOHISTOCHEMICKÉ DETEKCE KI67, P16 A CD3+ T-LYMFOCYTŮ V BIOPTOVANÉ STŘEVNÍ SLIZNICI U NEMOCNÝCH SE SYMPTOMY AKUTNÍ NEMOCI ŠTĚPU PROTI HOSTITELI (aGVHD)

Kuba A.¹, Raida L.¹, Brychtová S.², Faber E.¹, Papajík T.¹

¹Hemato-onkologická klinika LF UP a FN, Olomouc

²Ústav klinické a molekulární patologie LF UP a FN, Olomouc

Cíle: Zhodnotit vzájemný vztah vybraných markerů buněčné proliferace (Ki67), senescence (p16) a průvodní zánětlivé reakce (CD3+ T-lymfocyty) v biopsované střevní sliznici nemocných s projevy aGVHD a zda ovlivňují její intenzitu, rozsah a úmrtnost na komplikace transplantace (TRM).

POSTEROVÁ SEKCE

Metody: 43 pacientů s rozvojem symptomů aGVHD podstoupilo endoskopickou biopsii tlustého střeva v mediánu 40 (12–140) dnů po alogenní transplantaci krvetvorných buněk. Morfologický obraz byl hodnocen dvěma patology. Imunohistochemická detekce Ki67 a p16 v enterocytech morfologicky normálních střevních krypt byla hodnocena semikvantitativně (stupeň snížení Ki67 0–3, stupeň zvýšení p16 0–2). Infiltrace krypt CD3⁺T-lymfocyty byla dána jejich počtem na 100 enterocytů. Statisticky byly posouzeny možné vztahy mezi imunohistochemickými nálezy, histopatologickou a klinickou manifestací aGVHD, včetně TRM. Analyzována byla i exprese Ki67 a p16 ve vztahu k infiltraci střevních krypt CD3⁺T-lymfocyty.

Výsledky: Histopatologický stupeň aGVHD I, II a III/IV byly potvrzeny u deseti (23,3 %), 13 (30,1 %) a deset (23,3 %) příjemců. Expresce Ki67, p16 a infiltrace krypt CD3⁺T-lymfocyty nekorelovaly s histopatologickým stupněm aGVHD a neovlivnily významně ani rozvoj stadia nebo celkového stupně III/IV aGVHD. Redukovaná exprese Ki67 korelovala se sníženým za-

stoupením CD3⁺T-lymfocytů ve střevních kryptách ($R = 0,39$, $p = 0,03$). Zvýšená exprese p16 korelovala se zvýšeným zastoupením CD3⁺T-lymfocytů ve střevních kryptách ($R = 0,4$, $p = 0,02$). Rovněž zvýšená exprese p16 byla častěji detekována u příjemců s rozvojem symptomů střevní aGVHD až po dni +40 (48 % vs. 19 %; $p = 0,04$). Nižší exprese Ki67 byla spojena s vyšší TRM (57,1 % vs. 22,7 %; $p = 0,03$), avšak obdobný vztah u p16 prokázán nebyl.

Závěr: Uvedené pilotní výsledky neumožňují využít uvedené imunohistochemické markery v diferenciální diagnostice gastrointestinální aGVHD. Odrážejí alteraci regenerace enterocytů (snížená exprese Ki67) s prognostickým dopadem (TRM) a možnou návaznost dalšího potenciálního patogenetického mechanismu aGVHD, jakým je buněčná senescence (zvýšená exprese p16) s průvodní zánětlivou reakcí (infiltrace krypt CD3⁺T-lymfocyty).

Podpořeno projekty MZ ČR – RVO (FNOL, 00098892), IGA-LF-2018-004.

NEONKOLOGICKÁ HEMATOLOGIE

P73

SOUSTŘEDĚNÁ PÉČE ZVYŠUJE ZÁCHYT A ZLEPŠUJE PROGNÓZU PACIENTŮ S TROMBOTICKÝMI MIKROANGIOPATIEMI

Gumulec J.^{1,6}, Kasprák D.¹, Kořístek Z.^{1,6}, Šimetka O.^{2,6}, Čermáková Z.^{3,6}, Šuláková T.⁴, Zaoral T.⁴, Kovářová P.³, Navrátil M.^{1,6}, Richterová P.¹, Mihalyová Fečková J.¹, Doležálková E.², Gregorová L.², Martínek J.⁵, Hájek R.^{1,6}

¹Klinika hematologie FN, Ostrava

²Gynekologicko-porodnická klinika FN, Ostrava

³Krevní centrum FN, Ostrava

⁴Klinika dětského lékařství FN, Ostrava

⁵Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě

⁶Lékařská fakulta OU, Ostrava

Úvod: Trombotické mikroangiopatie (TMA) jsou vzácně se vyskytující onemocnění spojená se závažnou morbiditou a mortalitou, jsou-li nepoznaná, pozdě nebo neadekvátně léčená. S cílem poskytování komplexní péče o pacienty s TMA bylo v roce 2016 ve Fakultní nemocnici v Ostravě založeno Centrum pro trombotické mikroangiopatie Ostrava (C4TMO).

Metody: Od roku 2014 byl do klinické praxe FN Ostrava zaveden diagnosticko-terapeutický algoritmus, který je postupně validován v klinické praxi. Do klinického použití byly zavedeny metody vyšetření důležité pro diagnostiku a diferenciální diagnostiku TMA a další jsou postupně zaváděny a validovány. U všech pacientů je v době akutní ataky před zahájením léčby odebírán a archivován biologický materiál.

Výsledky: Provedení vyšetření a strategie péče je diskutována interdisciplinárním poradním sborem C4TMO. Paralelně byla prezentována řada edukačních přednášek a edukačně je zaměřen i web www.c4tmo.cz. Výsledky Od zavedení projektu do klinické praxe bylo nově diagnostikováno šest pacientů se získanou trombotickou trombocytopenickou purpurou (TTP), pět pacientů s atypickým hemolyticko-uremickým syndromem (aHUS), šest pacientek s postpartálně manifestovaným trombotickým mikroangiopatickým syndromem a tři pacienti s jinou, blíže zatím neurčenou TMA. Zavedený diagnosticko-terapeutický protokol umožnil archivaci vzorků od celkem 28 pacientů. Výměnnou plazmaferézou bylo v období fungování centra léčeno celkem 22 pacientů a léčba eculizumabem byla zahájena u čtyř pacientů s projevy aHUS nereagujících na komplexní léčbu včetně série výměnných plazmaferéz.

Po zavedení algoritmu do praxe došlo k významnému zkrácení doby do zahájení léčby sérií výměnných plazmaferéz a ke zvýšení zachytu nových pacientů s TMA. Paralelně běží péče o pět pacientů s vrozenou TTP a dispenzarizace pacientů s anamnézou TMA.

Závěr: Díky multioborové spolupráci, rychlé diagnostice a komplexní péči byla zkrácena doba do zahájení adekvátní terapie pacientů s různými typy TMA. Archivace vzorků z odběrů krve nabírané v době akutní ataky TMA umožní další cílené vyšetření a přesnější diferenciální diagnostiku TMA.

Podpora projektu MZ ČR – RVO FNOs/2017a Edukační grant fy Alexion.

P74

HIERARCHY BETWEEN ERYTHROPOIETIC ACTIVITY AND IRON OVERLOAD IN THE CONTROL OF HEPCIDIN EXPRESSION

Vokurka M.¹, Krijt J.¹, Frýdlová J.¹, Rogalsky D. W.¹, Truksa J.²

¹Institute of Pathological Physiology, First Faculty of Medicine Charles University, Prague

²Institute of Biotechnology, BIOCEV Research Center, Czech Academy of Sciences, Vestec, Czech Republic

Iron absorption from the diet is controlled by the hepatocyte-derived peptide hepcidin, which blocks the transfer of iron from the enterocyte into the bloodstream. It is known that hepcidin synthesis is controlled both by iron overload (hepcidin upregulation) and erythropoietic activity (hepcidin downregulation). The main signaling pathway responsible for the transcriptional control of hepcidin expression is the bone morphogenetic protein/SMAD pathway. The purpose of the present study was to determine the effect of erythropoietin (EPO) administration, iron administration, and the combination of both treatments on the level of phosphorylated SMAD 1 and 5 proteins (pSMADs) in the liver of C57BL/6 mice. Iron overload was achieved by injection of 5 mg of iron one week prior to the start of the experiment; erythropoietic activity was stimulated by injection of 50 U of erythropoietin on four consecutive days. Phosphorylated SMADs were deter-

POSTEROVÁ SEKCE

mined by Abcam ab92698 antibody. Administration of iron resulted in a marked increase of phosphorylated SMAD proteins; interestingly, administration of EPO lowered the iron-induced pSMADs back to control values. Similarly, hepcidin mRNA content was induced by iron pretreatment; while administration of EPO to iron-treated animals again lowered the induced hepcidin mRNA content back to control values. These results indicate that EPO administration partially overrides the iron-induced increase in hepcidin expression - a result which is in agreement with the pathophysiology of iron-loading anemias. The data also suggest that erythroferrone, the newly discovered soluble factor produced by erythroblasts, can efficiently interfere with the induced pSMAD signaling pathway. Interestingly, EPO administration did not have an obvious effect on increased liver pSMAD protein content of *mask* mice, in which the BMP pathway is stimulated by inactivation of matriptase-2. These results apparently support the concept that matriptase-2, a protease mutated in iron-refractory iron deficiency anemia, could be necessary for functional erythroferrone signaling.

P75

DIAGNOSTIKA LEHKÉ FORMY HEMOFILIE A NENÍ LEHKÁ

Provazníková D., Radovská A., Šimoníková M., Housková K., Češpivová D., Zemanová M., Hrachovinová I.

Laboratoř pro poruchy hemostázy, Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

Úvod: Hemofilie A (HA) je jedna z nejčastějších vrozených krvácivých poruch krevního srážení. HA je způsobena mutacemi v genu pro faktor 8 (F8), které vedou k nedostatku nebo nefunkčnosti koagulačního faktoru VIII (FVIII). Ačkoli jsou současné metody schopné spolehlivě odhalit většinu mutací způsobujících HA, u lehké formy onemocnění stále zůstává část pacientů bez nalezené kauzální mutace v genu F8.

Cíl: Zhodnotit stanovení kauzality lehké formy HA.

Metody: Vyšetřili jsme DNA 117 lehkých hemofiliků (indexových pacientů) - byla stanovena hladina FVIII, vWF (von Willebrandův faktor) aktivita, antigen a vazba na FVIII pro vyloučení vWCH (von Willebrandova choroba) subtyp 2N. Všechny kódující oblasti (exony) F8 s přilehlými intronovými oblastmi byly sekvenovány. Byla sekvenována také oblast promotoru a úseky intronu (nekódující části genu), u nichž je z literatury

známý výskyt mutací, a cDNA pro případ, že by se objevil abnormální transkript. Bylo provedeno vyšetření velkých delecí/duplikací pomocí metody MLPA.

Výsledky: Kauzální mutaci jsme našli u 87 % lehkých hemofiliků v exonech. U zbylých 13 % (15 ze 117) jsme mutaci sekvenováním ani metodou MLPA nenašli, ačkoli klinicky splňovali kritéria lehké hemofilie - hladina FVIII snižená (FVIII:C 11-39%, FVIII:Ag 9-15%). Proto jsme přistoupili k sekvenování oblastí promotoru a intronů. U sedmi pacientů byla nalezena mutace hluboko v intronu v části, která není běžně analyzována.

Závěr: Přesto, že jde o monogenní chorobu, nepodařilo se nám u části lehkých hemofiliků (7 %) objasnit příčinu HA, což ovšem odpovídá údajům ze zahraničí.

P76

TERCIÁRNÍ PROFYLAXE U PACIENTŮ S HEMOFILIÍ A S INHIBITOREM FVIII

Smejkal P.^{1,2}, Romanová G.^{1,2}, Polák P.¹, Penka M.^{1,3}

¹Oddělení klinické hematologie FN, Brno

²Katedra laboratorních metod LF MU, Brno

³Interní hematologická a onkologická klinika LF MU a FN, Brno

Cíl: Zhodnotit přínos terciární profylaxe u pacientů s hemofilií A a inhibítorem FVIII.

Metoda: Terciární profylaxe byla z důvodů klinicky závažného a/nebo frekventního krvácení na našem pracovišti zavedena u tří pacientů s hemofilií A a setrvalým inhibítorem FVIII typu „high responder“. U pacienta 1 (*1975) to bylo při pokročilé artropatii pro 19 (z toho 18 kloubních) krvácivých epizod během 8 měsíců a vzhledem k nízkému titru inhibítoru a plánované imunotoleranci byl použit rFVIIa: cca 90 mg/kg denně měsíc, pak 4 měsíce obden a pak téměř dva roky á 3-4 dny. U dalších dvou pacientů jsme použili aPCC. U pacienta 2 (*1956) pro dvě ataky závažného krvácení v oblasti jizvy po implantaci protézy kyčelního kloubu (za měsíc a 4 měsíce od operace), u pacienta 3 (*1941) pro za poslední rok dvě krvácení do stehenního svalu a 5krát obou kolen s přetrvávající synovialitidou přes provedenou radiační synoviortézu. Dávka byla 3, resp. 11 týdnů cca 50 U/kg obden a následně 35 U/kg obden, resp. 3krát týdně, což trvá již rok, resp. 7 měsíců.

Výsledky: U prvního pacienta během 1. roku profylaxe bylo devět krvácení (osm kloubních), během 2. roku osm (sedm kloubních). Spotřeba rFVIIa byla 1829 mg za první rok a 1500 mg za druhý rok profylaxe. U pacientů 2 a 3 jsme během profylaxe nezaznamenali žádné kloubní krvácení; pouze podkožní hematom

stehna u pacienta 2 a po zavedení midline u pacienta 3. Pacient 2 spotřeboval na profylaxi první rok 604 000 U aPCC, resp. za poslední rok 547 500 U aPCC. Pacient 3 první měsíc profylaxe aplikoval 62500 U aPCC, během následujícího půl roku pak 234000 U aPCC.

Závěr: Profylaxe bypassovou aktivitou výrazně zredukovala frekvenci krvácení, která byla prakticky nulová u dvou pacientů a poklesla na cca 1/3 u pacienta s výrazným krvácivým fenotypem.

P77

PRAKTICKÉ ASPEKTY POUŽITÍ PŘÍPRAVKŮ REKOMBINANTNÍHO FVIII S PRODLOUŽENOU DOBOU ÚČINKU

Čermáková Z., Blahutová Š., Hrdličková R.

Krevní centrum – Centrum komplexní péče o pacienty s vrozenými poruchami krvácivosti FN, Ostrava

Cíl: Počet přípravků rFVIII s prodlouženou dobou účinku (EHL – Extended Half Life). V nejbližší době pravděpodobně budou na našem trhu dostupné dva přípravky s prodlouženým účinkem; pegylovaný přípravek rurioctogoc alfa pegol (Adynovi[®], Shire) a rekombinantní lidský koagulační faktor VIII Fc fúzní protein efmoroktogoc alfa (Elocta[®], Sobi). Předmětem sdělení je v souladu s komplexním přístupem k léčbě pacientů s hemofilii A zhodnotit možnosti použití obou EHL.

Metoda: Rozhodování o možnostech léčby u pacientů s hemofilii je dnes postaveno na personalizované medicíně, která mj. řeší farmakokinetiku (PK) a životní styl pacientů s hemofilii. Interindividuální variabilita používaných přípravků ovlivňuje individuální farmakokinetiku. Zdá se, že pro přípravky se standardní dobou poločasu neplatí stejná PK jako u přípravků s prodlouženým účinkem. Guidelines UKHCDO doporučují, aby při přechodu z přípravků se standardní dobou účinku na EHL byla změřena PK. Pro stanovení individuální PK je u přípravku Adynovi (Shire) určena certifikovaná medicínská pomůcka MyPKFit. Po stanovení aktivity FVIII u pacienta, které je/bude léčen přípravkem Adynovi (možné koagulační i chromogenní stanovení), je ze dvou odběrů farmakokinetika vyhodnocena. Pro stanovení aktivity FVIII u pacienta, které je/bude léčen přípravkem Elocta (možné chromogenní i koagulační stanovení), je farmakokinetika vyhodnocena z 5 až 6 odběrů, anebo ev. s využitím programu WAPPS-Hemo. Doporučené dávkování je pro Adynovi 40–50 IU/kg 2krát týdně v 3–4denních intervalech (po až čt; po až pá); pro Eloctu je doporučené dávkování

50 IU/kg každých 3–5 dnů, dávka může být upravena podle odpovědi pacienta v rozmezí od 25 do 65 IU/kg.

Závěr: Počet přípravků, určených k léčbě hemofilie A neustále roste. V úvahách o rozhodování vhodného přípravku tak významně narůstá komplexnost přístupu k pacientům s hemofilii A.

LITERATURA

- Collins P. et al. Haemophilia 2016: 487–498.
- Chowdary, et al. Therapeutic and routine prophylactic properties of rFactor VIII Fc (efraloctocog alfa, Eloctate[®]) in Hemophilia A. J of Blood Med 2016; 7: 187–198.

P78

MOŽNOSTI LABORATORNÍ DIAGNOSTIKY VON WILLEBRANDOVY CHROBY TYP 1 A TYP 3

Mareček F., Provazníková D., Zemanová M., Housková K., Češpivová D., Němcová J., Lišková R., Kalinová L., Hrachovinová I.

Laboratoř pro poruchy hemostázy, Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

Cíle: Cílem práce bylo poukázat na to, že stanovení koncentrace vWF (vWF:Ag) není dostačující parametr laboratorního potvrzení vWD typ 3. Deficit vWF může být způsoben chybějící (sníženou) syntézou nebo zvýšenou clearancí vWF. Pro odlišení vWD typu 1 od typu 3 je klíčové stanovit poměr mezi syntézou a clearancí vWF. Oba děje charakterizuje poměr koncentrací propeptidu vWF WFpp) a vWF:Ag v plazmě. Normálně se poměr blíží jedné. V několika případech (dosud uzavřených jako vWD 3) jsme proto stanovili hodnoty vWFpp, vypočetli poměr vWFpp/vWF:Ag a vyšetřili stav multimerů vWF.

Metody: Koncentrace vWF:Ag byla stanovena imunochemicky soupravou BioMérieux na analyzátoru Mini VIDAS a soupravou Werfen na analyzátoru AccuStar. Hodnoty vWF:RCo byly stanoveny soupravou Siemens na analyzátoru STA-R. Koncentrace vWFpp byla stanovena imunochemicky s fotometrickou detekcí ELISA soupravou Life Code. Multimery vWF byly vyšetřeny pomocí SDS elektroforézy s přenosem na nitrocelulózovou membránu (western blotting) s imunochemickou detekcí.

Výsledky: Koncentrace vWF:Ag se pohybovala v rozmezí pod 2–3 % normálu, aktivita vWF (vWF:RiCo) byla 3–5%. Byly stanoveny koncentrace vWFpp a vypočten poměr vWFpp/vWF:Ag (hodnoty 0 až 8). V jednom

POSTEROVÁ SEKCE

případě byl nalezen difuzní obraz multimerů v celém hmotnostním spektru s oddělenými zónami prvních čtyř multimerů. Ve druhém případě byla prokázána přítomnost zóny odpovídající přibližně prvnímu multimeru. Elektroforetické zóny multimerů byly difuzní a bez tripletového uspořádání.

Závěr: Analýzou případů dosud uzavřených jako vWD 3 jsme v jednom případě zjistili syntézu vWF neodpovídající aktuální hodnotě vWF:Ag a následně i tvorbu multimerů vWF. Domníváme se, že jde o vWD 1 s velmi těžkým průběhem se zvýšenou clearancí vWF. Pro odlišení těžkých případů vWD1 od vWD3 je klíčová hodnota vWFpp. Měřitelná hodnota vWFpp svědčí o probíhající syntéze vWF. Hodnota poměru (vWFpp/vWF:Ag) 8 odpovídá vysoké míře syntézy a následné clearance vWF. Pokud se hodnota poměru liší od normálu, je možné ověřit i případnou přítomnost multimerů vWF nebo jejich zbytků.

P79

INDEX CIRKULUJÍCÍHO ANTIKOAGULANS V DIFERENCIÁLNÍ DIAGNOSTICE ZÍSKANÉ HEMOFILIE, LUPUS ANTIKOAGULANS A DEFICITU KOAGULAČNÍHO FAKTORU

Bradáčová P., Ullrychová J.

Oddělení klinické hematologie, Masarykova nemocnice v Ústí nad Labem, Krajská zdravotní, a.s.

Úvod: Společným znakem pro lupus antikoagulans (LA), specifický inhibitor u získané hemofilie a deficit koagulačního faktoru obvykle bývá prodloužený čas APTT. Zatímco u pozitivní LA se jedná většinou o trombofilní stav, získaná hemofilie a deficit koagulačního faktoru (kromě deficitu FXII) patří mezi krvácivé stavy, mnohdy i ohrožující život pacienta. Je tedy nutné rychle rozlišit příčinu prodlouženého APTT, aby mohla být zahájena případná léčba.

Cíle: Retrospektivní studie vyšetření směsného testu u skupiny 64 pacientů s pozitivním LA (40), deficitem koagulačního faktoru (18) a získaným specifickým inhibitorem (6) za účelem ověření cut-off Indexu cirkulujícího antikoagulans (ICA) pro odlišení LA od získané hemofilie.

Metody: V období 1. 1. 2017 až 31. 12. 2017 byl vyšetřen směsný test koagulační metodou u 64 pacientů s prodlouženým časem APTT bez známé příčiny. Ze studie byli vyřazeni pacienti užívající antikoagulační léčbu. Čas APTT ve směsi pacienta s normální plazmou v poměru 1 + 1 byl změřen v čase 0 a po 2 h inkubaci při

37 °C. Pro výpočet míry korekce byl použit Index cirkulujícího antikoagulans před inkubací (ICA), po inkubaci (ICAd), poměr ICAd/ICA a rozdíl ICAd-ICA. Všechny tyto výpočty automaticky provádí námi v současnosti používaný koagulační analyzátor Sysmex CS 5100 v rámci každého vyšetření směsného testu.

Výsledky: Udávané Cut-off > 12,4 pro ICA a ICAd pro odlišení LA od deficitu faktoru vykazují senzitivitu 87,5%; 95,0%, specificitu 88,9%; 83,3%. Cut-off > 132 pro ICA/ICAd a > 6,4 pro ICAd-ICA pro odlišení získané hemofilie od LA vykazují senzitivitu 90%; 90%, specificitu 100%; 100%.

Závěr: Použití algoritmu ICA může napomoci k rychlému odlišení LA od získané hemofilie a tím urychlit zahájení léčby pacienta.

LITERATURA

1. Osamu Kumano, et al. New formulas for mixing test to discriminate between lupus anticoagulant and acquired hemophilia A, Department of Internal Medicine, Health Sciences University of Hokkaido, Ishikari-Tobetsu, Hokkaido, Japan. *Thrombosis Research* 2016; 143: 53-57.

P80

HEMOFILIE A MUŽSKÁ OSTEOPORÓZA

Hajšmanová Z.¹, Lavičková A.¹, Havlová E.¹, Vyskočil V.²

¹Hematologický úsek ÚKBH FN, Plzeň

²Osteocentrum II. IK FN, Plzeň

Úvod: Osteoporóza je nazývána „tichou chorobou“, protože progreduje až do vzniku fraktur bezbolestně a asymptomaticky. Třicet procent všech zlomenin krčku stehenní kosti se vyskytuje u mužů, na rozdíl od menopausálních žen o 10 let později, ale 50 % mužů následně vyžaduje institucionální péči. Významné rozdíly v kostní struktuře závislé na pohlaví začínají již v pubertě a muži díky svému vzrůstu mají více kostní hmoty a vyšší kostní zralost, a tak mají vyšší hodnoty vrcholu kostní hmoty. Kostní minerální denzita zodpovídající za mechanickou pevnost kosti je u každého jedince určena geneticky, ale i řadou dalších faktorů včetně životního stylu. Těžká forma hemofilie je vrozená krvácivá choroba, která svými komplikacemi na pohybovém aparátu přináší řadu rizikových faktorů pro rozvoj osteoporózy. Riziko fraktury lze predikovat výsledkem měření kostní denzity v páteři a proximálním femuru stejně dobře u mužů jako u žen.

Metoda: V roce 2016 jsme vyšetřili všechny dospělé pacienty s těžkou formou hemofilie ve věku 25–65 let v Osteocentru II. IK FN Plzeň. Z počtu 22 vyšetřených hemofiliků byla osteoporóza prokázána u tří mužů, osteopenie u jedenácti osob. Po zahájení léčby osteoporózy se při roční kontrole stav změnil na osteopenii s přetrvávajícím nedostatkem vitamínu D, další dva pacienti na kontrolní výsledky teprve čekají. Podrobný rozbor souboru našich pacientů a jejich rizikových faktorů, diagnostika osteoporózy a efekt léčby po roce sledování je obsahem posterového sdělení.

Závěr: Komplexní léčba hemofilie zahrnuje terciární profylaxi s vymizením nebo alespoň s významnou redukcí spontánních krvácení do kloubů (ABR se u většiny u většiny pacientů rovná 1). Život bez akutní kloubní bolesti z krvácení umožňuje fyzickou aktivitu a pohyb, expozici slunci a brání rozvoji depresivních stavů. Socioekonomická soběstačnost je základem dobré kvality života, pohyb je život.

P81

PROTEIN S A JEHO VZTAH K TFPI

Fenclová T.¹, Češpivová D.¹, Zemanová M.¹, Matýšková M.², Obernauerová J.³, Hrachovinová I.¹

¹Národní referenční laboratoř pro poruchy hemostázy ÚHKKT, Praha

²Oddělení klinické hematologie FN, Brno

³Hematologicko-transfuzní oddělení, ON Mladá Boleslav

Úvod: Protein S je jedním z přirozených inhibitorů koagulace, kde působí jednak jako kofaktor aktivovaného proteinu C, ale také inhibitoru cesty tkáňového faktoru (TFPI), přispívá tedy k regulaci tvorby trombinu vnitřní i vnější cestou. Má však i další funkce mimo hemostázu, například se nepřímo podílí na regulaci komplementu, dále působí v signálních dráhách protizánětlivé odpovědi a apoptózy. Tyto další funkce jsou klinicky málo prozkoumané a laboratorní vyšetření proteinu S se týkají pouze jeho funkce v dráze proteinu C. Je to především proto, že jeho antikoagulační funkce mají největší klinický dopad – vrozený či získaný nedostatek proteinu S je významným rizikovým faktorem žilní trombózy.

Cíle: Cílem práce bylo nalézt kauzální mutace u pacientů s vrozeným a klinicky vyjádřeným nedostatkem proteinu S z celé ČR (45 pacientů z 20 rodin), na základě literárních dat popsat vliv mutací na další funkce proteinu S, zejména vazbu TFPI, a predikovat jejich klinický význam.

Metody: Pro nalezení bodových mutací jsme použili přímé sekvenování všech exonů a přilehlých intronových oblastí genu *PROS1*. Dále jsme u všech indexových pacientů použili metodu MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) pro odhalení rozsáhlých delecí a duplikací. Nalezené mutace jsme vyhodnotili predikčním softwarem PolyPhen2 (polymorphism phenotyping) jako kauzální či benigní.

Výsledky: Kauzální mutace byla nalezena u 42 ze 45 pacientů (93 %). Rozsáhlou delecí v genu *PROS1* jsme identifikovali u dvou nezávislých rodin, dále jsme našli 17 různých bodových mutací, z nichž sedm nebylo dosud v literatuře popsáno. Výskyt mutací nevykazuje soustředění v žádné oblasti genu.

Závěr: Ze 17 jednotlivých nalezených mutací se jich sedm nachází v oblasti domén interagujících s TFPI. Vliv mutací na vazbu TFPI a další funkce proteinu S bude diskutován v posteru.

P82

HEMOFAGOCYTÁRNÍ LYMFHISTIOCYTÓZA U DOSPĚLÝCH – PŘEHLED KAZUISTIK Z NAŠEHO PRACOVIŠTĚ

Šrámek J.¹, Lysák D.¹, Karas M.¹, Svatoň M.², Karvunidis T.³, Jindra P.¹

¹Hematologicko-onkologické oddělení FN, Plzeň

²CLIP, Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol, Praha

³Jednotka intenzivní péče I. interní kliniky LF UK a FN, Plzeň

Cíle: Hemofagocytární lymfohistiocytóza (HLH) je vzácný, život ohrožující syndrom charakterizovaný excesivní aktivací imunitního systému s následným proinflamatorním stavem a multiorgánovým postižením. Nejčastěji je HLH popisována u pediatrických pacientů jako primární onemocnění způsobené mutací genů podílejících se na regulaci imunitní odpovědi. Během posledních let stoupá počet diagnostikovaných případů sekundární HLH u dospělých pacientů, což pravděpodobně svědčí pro časté nerozpoznání tohoto syndromu v minulosti. K tomu přispívá skutečnost, že klinická symptomatologie a laboratorní nálezy jsou nespecifické a mají širokou diferenciální diagnostiku. Sekundární HLH u dospělých pacientů je způsobená aberantní imunitní odpovědí při virových či bakteriálních infekcích, malignitách s převahou lymfoproliferací a dále autoimunitních onemocnění. Včasná diagnostika a zahájení terapie jsou klíčové a výrazně zvyšují šanci na přežití. Diagnostika HLH je definována

POSTEROVÁ SEKCE

kombinací klinických a laboratorních nálezů, případně průkazem specifické mutace. Základní mechanismus terapie spočívá v přerušení aberantní imunitní odpovědi, a to destrukcí a potlačením funkce T-lymfocytů.

Metody: Retrospektivní analýza případů HLH u dospělých pacientů léčených na hematologicko-onkologickém oddělení a jednotce intenzivní péče I. interní kliniky FN Plzeň od roku 2014 do současnosti.

Výsledky: Ve sledovaném období bylo ve FN Plzeň dokumentováno deset případů HLH u dospělých pacientů. V souboru byly zastoupeny případy jak primární formy HLH, tak sekundární HLH s převahou lymfoproliferativních onemocnění jako spouštěče syndromu. Nález hyperferitinemie a elevace laktátdehydrogenázy byly prominentními laboratorními nálezy v našem souboru.

Závěr: Vzhledem k nespecifické symptomatologii a absenci specifických běžně dostupných laboratorních markerů je diagnostika HLH obzvláště náročná. Proto je nutné brát HLH v rámci diferenciální diagnostiky častěji v úvahu a to zejména u nemocných s rychle progredující alterací klinického stavu bez zřejmé příčiny. V těchto případech může být vyšetření feritinemie významným a diskriminujícím pomocníkem. Ve sdělení bude prezentován soubor kazuistik pacientů léčených na našem pracovišti. Dále bude sumarizován aktuální pohled na patofyziologii, diagnostiku a terapii HLH.

P83

SÉROVÁ TRYPTÁZA JAKO JEDNO Z DIAGNOSTICKÝCH KRITÉRIÍ MASTOCYTÓZY

Lavičková A., Havlová E., Hajšmanová Z., Šigutová P., Šlechtová J., Bultasová L., Vachová M., Kuntscherová J.

Ústav klinické biochemie a hematologie, Ústav imunologie a alergie a Šiklův ústav patologie FN, Plzeň

Úvod: Mastocytóza je vzácné onemocnění charakterizované abnormálním růstem a hromaděním mastocytů (žírných buněk) v kůži, kostní dřeni a vnitřních orgánech. Aktualizovaná WHO klasifikace myeloidních neoplazmat z roku 2016 vyčlenila mastocytózu jako samostatnou jednotku. Je definováno pět subtypů systémové mastocytózy (SM): indolentní systémová mastocytóza (ISM), doutnající systémová mastocytóza (SSM), agresivní systémová mastocytóza (ASM), systémová mastocytóza asociovaná s jiným hematologickým neoplazmatem (SM-AHN) a mastocelulární

leukemie (MCL). Pro diagnostiku je rozhodující histologické vyšetření kostní dřene nebo postižené tkáně. Specifické klinické projevy mastocytózy jsou způsobeny uvolňováním řady mediátorů z granulí žírných buněk. Jedním z nich je tryptáza, jejíž trvalé zvýšení nad 20 µg/l je „malým“ diagnostickým kritériem SM. Právě toto vyšetření vedlo k diagnóze mastocytózy u několika našich pacientů.

Metoda: Vyšetření sérové tryptázy indikují zejména alergologové – imunologové u nemocných po prodělané anafylaktické reakci na včelí a vosí jed nebo na neznámou noxu. Jediné pracoviště v Plzeňském kraji, které toto stanovení provádí, je laboratoř ÚIA FN Plzeň. Nemocní se zvýšenou hladinou bazální tryptázy jsou doporučováni k hematologickému vyšetření k vyloučení systémové mastocytózy.

Soubor: V období od ledna 2010 do dubna 2018 jsme na naší ambulanci vyšetřili 40 nemocných se zvýšenou hladinou sérové tryptázy (22 žen a 18 mužů ve věku od 20 do 76 let). Sedmi nemocným byla histologickým vyšetřením kostní dřene prokázána ISM, z toho u pěti případů s postižením kůže typu urticaria pigmentosa (UP). U jednoho nemocného byla prokázána kožní UP spolu s monoklonální B-lymfocytózou.

Závěr: Na základě prodělané anafylaktické reakce, stanovení sérové tryptázy a následného vyšetření kostní dřene se podařilo diagnostikovat několik pacientů s indolentní formou SM. Dlouhodobá léčba H1 a H2 blokátory u těchto nemocných účinně snižuje riziko anafylaktických reakcí a většina nemocných je při léčbě asymptomatická. U žádného ze sledovaných nemocných dosud nedošlo k progresi do agresivnějších forem SM. Dle literárních zdrojů je riziko progresu až tříprocentní.

P84

GAUCHEROVA CHOROBA, MORFOLOGICKÝ NÁLEZ V BIOPSII KOSTNÍ DŘENĚ – KAZUISTIKA

Židlík V.^{1,2}, Kuhn T.³, Žiak D.^{1,2}, Uvírová M.¹, Hurník P.^{1,2}, Ondruššek R.^{1,2}, Šnajdrová B.¹, Rulíšek P.¹, Dvořáčková J.¹

¹CGB laboratoř a.s., Oddělení patologie, Ostrava

²Ústav patologie FN, Ostrava

³Klinika dětského lékařství FN, Ostrava

Gaucherova choroba je autozomálně recesivní onemocnění ze skupiny tzv. střídavých nemocí. Je známo více než 350 mutací postihujících gen *GBA1*, který kó-

duje enzym β -glukocerebrosidázu důležitý pro rozklad složitých tuků a cukrů, při jehož chybění dojde k hromadění glukocerebrosidu v lysozomech makrofágů. Rozlišují se tři typy této choroby. Typ I je nejběžnější. Postihuje slezinu, játra, kosterní svaly a kostní dřeň bez postižení mozku a míchy. Typy 2 a 3 jsou spojeny s neuropatickými symptomy s postižením centrálního nervového systému. Incidence výskytu v ČR je 1 : 80 000. V naší kazuistice prezentujeme případ 16leté pacientky se značnou splenomegalií, trombocytopenií a anemií. Během tří měsíců u ní došlo ke ztrátě hmotnosti o 6–7 kg. Klinicky s podezřením na myelodysplastický syndrom. Morfologicky je kostní dřeň z větší části vyplněná nahromaděnými pěnovitými histiocyty (Gaucherovy buňky) s intraplazmatickým fibrilárním materiálem excentricky odtlačujícím jejich jádro, které mají vzhled „zmačkaného papíru“. Histiocyty jsou pozitivní v imunohistochemickém barvení CD68. Intraplazmatický obsah se pozitivně barví histochemickým barvením PAS na průkaz polysacharidů a železo (Fe). V aspirátu kostní dřene byly taktéž zastiženy Gaucherovy buňky. Nahromaděním histiocyty v kostní dřeni dochází k útlaku hemopoézy s obrazem anémie a trombocytopenie, zvýšenou únavou, krvácivých komplikací a dále s prořídnutím kostí se snazší tvorbou zlomenin. Typickým znakem je zvětšení sleziny a jater. Gaucherova choroba je spíše vzácným onemocněním, při kterém dochází k postižení více orgánů a tkání s trvalou progresí, které bez léčby výrazně snižuje kvalitu života a dobu dožití. V současné době je v ČR sledováno 35 pacientů s prokázanou Gaucherovou chorobou.

LITERATURA

1. Jaffe ES, et al. Hematopathology, second edition 965–967.
2. Bain BJ, et al. Bone Marrow Pathology, fourth edition 530–531.
3. <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/gaucher-disease>
4. <http://www.rarediseases.cz/vzacna-onemocneni/gaucherova-nemoc>

P85

SRDCE A ŽELEZO

Nosál M.^{1,2}

¹Hematologická ambulancia, Nemocnica Staré Mesto

²Klinika hematológie a transfuziológie LF UK, UNB, SZU, Bratislava

1. Srdce a nedostatok železa. Nedostatok železa je dôležitou komorbiditou u chorých so srdcovým zlyhaním a hlavným faktorom v patogenéze anémie so závažnými klinickými následkami (napr. znížená záťažová kapacita). Experimentálne štúdie predpokladajú, že liečba železom pri jeho nedostatku môže aktivovať molekulárne pochody s následnou ochranou myokardu. Klinické štúdie demonštrujú priaznivý vplyv vnútrožilovo podávaného železa na funkčný stav, kvalitu života a záťažovú kapacitu u chorých s chronickým srdcovým zlyhaním (CHSZ). Pri chronickom srdcovom zlyhaní sa anémia vyskytuje podľa rôznych zdrojov u 4–61 % chorých. Anémia pri srdcovom zlyhaní je zodpovedná za zlú kvalitu života a môže byť ukazovateľom nepriaznivej prognózy. Anémia vedie k chronickému objemovému preťaženiu ľavej srdcovej komory, ktoré spôsobuje zvýšenú spotrebu kyslíka v myokarde, dilatáciu a hypertrofiu ľavej komory. To všetko pri CHSZ negatívne ovplyvňuje srdcovú funkciu a spôsobuje progresiu srdcového zlyhania. Mnohé analýzy ukázali, že anémia pri CHSZ je silným a nezávislým prediktorom horšej prognózy. Retrospektívnou analýzou údajov v štúdiu COMET sa ukázalo, že novo vzniknutá anémia v priebehu päťročného sledovania bola nezávisle združená s vyššou morbiditou a mortalitou. Všetky tieto údaje ukazujú, že anémia pri CHSZ je známkou zlej prognózy. Hlavnými faktormi, ktoré sa podieľajú na vzniku anémie sú: neadekvátna produkcia erytropoetinu, útlm funkcie kostnej drene, retencia tekutín a hlavne nedostatok železa.

2. Srdce a nadbytok železa. Vysoký výskyt kardiomyopatie u pacientov s hemosiderózou, najmä po transfúznom preťažení železom naznačuje, že akumulácia železa v srdci hrá hlavnú úlohu zlyhania srdca. Predpokladá sa, že železom sprostredkovaná tvorba škodlivých reaktívnych radikálov kyslíka je najdôležitejším patogénnym mechanizmom, ktorý spôsobuje poškodenie kardiomyocytov, zahŕňa apoptózu, fibrózu a nakoniec srdcovú dysfunkciu. Ďalšími mechanizmami je postihnutie subcelulárnych organel a zápalové mediátory, ktoré sú dôležitými faktormi rozvoja tejto choroby. Navyše prebytok železa môže zosilniť kardiotoxický účinok iných látok alebo procesov. Nakoniec subcelulárna nesprávna distribúcia

POSTEROVÁ SEKCE

železa v kardiomyocytoch môže predstavovať ďalšiu cestu poškodenia srdca. Nedávne pokroky v zobrazovacích technikách a vývoj chelátorov pozoruhodne zlepšili srdcovú detekciu preťaženia železom a liečbu. Priame meranie srdcového železa T2* zobrazovania magnetickou rezonanciou, namiesto nepriamych metód, ako sú meranie hladín sérového feritínu alebo koncentrácie železa v pečeni, prispelo ku skoršiemu rozpoznaníu preťaženia myokardu železom a prevencii srdcovej toxicity. Kardiálna sideróza sa vyskytuje pri všetkých transfúzných anémiách, ale relatívne riziko závisí od základného chorobného stavu, transfúzneho preťaženia a anamnézy chelatácie. Kardiomyopatia z preťaženia železom sa môže rozvinúť po podaní 50 transfúzných jednotiek erytrocytov. Všetky tri dostupné chelátory železa (deferioxamine-DFO, deferiprone, deferasirox) sa môžu použiť na odstránenie srdcového železa, ale každý má jedinečné fyzikálne vlastnosti, ktoré ovplyvňujú jeho účinnosť v srdci.

Záver: Anémia z nedostatku železa môže u predisponovaných pacientov viesť k ťažkému chronickému srdcovému zlyhaniu (CHSZ), dobre odpovedá na parenterálnu liečbu prípravkom železa. Naopak, nadbytok železa vedie k ťažkému poškodeniu srdcového svalu, vyžaduje dlhodobú liečbu novými chelátormi železa.

P86

ANALÝZA MUTÁCIÍ GÉNU F8 U PACIENTOV S ŤAŽKÝM STUPŇOM HEMOFÍLIE A V SLOVENSKEJ REPUBLIKE

Prigancová T.¹, Bátorová A.¹, Jankovičová D.¹, Kyselová A.¹, Chandoga J.², Petrovič R.², Jungová P.², Juhosová M.², Fischerová M.², Mistrík M.¹

¹Národné hemofilické centrum, Klinika hematológie a transfuziológie LF UK Bratislava, SZU, Univerzitná nemocnica Bratislava

²Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK, Univerzitná nemocnica Bratislava

Úvod: Pokrok molekulovej diagnostiky hemofílie zlepšil možnosti genetického poradenstva, ale aj výskumu genotypových a fenotypových súvislostí a vzťahu génových mutácií k výskytu inhibítorov FVIII.

Ciel': Vyhodnotenie výsledkov génovej analýzy v slovenskej populácii pacientov s ťažkým stupňom hemofílie A a vzťahu mutácií k výskytu inhibítorov FVIII.

Metódy: V roku 2014 sme založili Národný hemofilický genetický program, ktorého základom je Národný register hemofílie. V prvej fáze sa zameriavame na

pacientov s ťažkým stupňom hemofílie. Genetické vyšetrenie zahŕňa LD-PCR na detekciu inverzií intrónu 22 (Inv22) a intrónu 1 (Inv1), metódu MLPA na detekciu veľkých delécií/duplikácií a nakoniec priamu sekvenčnú analýzu génu F8 (exónov a príslušných intrónových oblastí).

Výsledky: Súbor 141 pacientov z 82 rodín predstavuje 60 % populácie ťažkých hemofilikov A v SR. S detekčnou spoľahlivosťou genetického vyšetrenia 100 % sme identifikovali 39 jedinečných mutácií, z nich 20 nových, doteraz neopísaných. Okrem Inv22 a Inv1 sme odhalili mutácie dvoch intrónov (Int13 a Int23) a ďalších 35 mutácií na 15 exónoch v celom priebehu génu F8. Najviac, 10 rôznych mutácií, sa nachádza na exóne 14. V celom súbore malo Inv22 52/37% pacientov, Inv1 7/5%, veľké delécie/duplikácie 4/3%, frame shift/stop kodón 38/27%, splice site 5/4%, bodové nonsense mutácie 16/11% a missense mutácie 19/13% pacientov. Analýza génových mutácií u 34 pacientov s inhibítormi potvrdila porovnateľnú frekvenciu inhibítorov pri inverziách (27 %), nonsense mutáciách (25 %) aj pri frame shift/stop kodón mutáciách (29 %), ale inhibítor nevyvinul žiaden pacient s veľkou deléciou/duplikáciou. Frekvencia inhibítorov bola vyššia pri mutáciách ľahkého reťazca ako ťažkého reťazca molekuly FVIII [Odds ratio 2,57 (0,85–7,77)]. Hodnotenie efektu imunitolerančnej indukcie (ITI) u 22 pacientov (26 ITI kúr) ukázalo kompletnú a parciálnu remisiu v 75,5 % pri inverziách a až v 88–100 % pri ostatných génových mutáciách.

Záver: Veľká heterogenita zistených mutácií, ich častý sporadický výskyt a naznačená súvislosť typu mutácií s výskytom inhibítora podčiarkuje význam genetického vyšetrenia u každého pacienta s hemofíliou.

TRANSFUZIOLOGIE

P87

SKLADOVÁNÍ ERYTHROCYTŮ PŘI NESTANDARDNÍ TEPLOTĚ

Turek P.¹, Lerlová A.¹, Bělochová J.², Pintová E.², Dušková D.³, Ucháč T.³, Lejdarová H.⁴, Biedermann P.⁵, Procházková R.⁶, Papoušek P.⁶, Geierová H.⁷, Fišerová H.⁷, Janek D.⁸, Zembová V.⁸, Řezníček J.⁹, Petržílková M.⁹

¹TO Thomayerovy nemocnice, Praha

²TO FNKV, Praha

³FTO VFN, Praha

⁴TO FN, Brno

⁵TO Nemocnice České Budějovice

⁶TO, Krajská nemocnice Liberec

⁷TO Pardubické nemocnice

⁸HTO, Nemocnice s poliklinikou Karviná – Ráj

⁹HTO Orlicko-ústecké nemocnice, Ústí nad Orlicí

Cíl: podmínky skladování erythrocytových transfuzních přípravků jsou stanoveny obecně závaznými předpisy. V případě jejich nedodržení má o případném použití přípravků rozhodnout kvalifikovaná osoba výrobce. Žádný ze závazných předpisů však neuvádí kritéria nebo teplotní a časové limity, které by při rozhodování mohla kvalifikovaná osoba využít. STL proto vypracovala „doporučení“ (2015/11) s tím, že podle závažnosti nedodržení skladovacích podmínek doporučila v různé míře zkrácení doby použitelnosti přípravků. Cílem práce bylo ověřit dopad nestandardního skladování na erythrocytové transfuzní přípravky a prověřit, zda jsou mezní hodnoty stanovené v Doporučení STL zvoleny vhodně.

Metody: dopad nestandardního skladování na kvalitu erythrocytových transfuzních přípravků (EBR i ERD, alespoň 20 přípravků ve skupině) byl ověřován teplotním zátěžovým testem, míra zátěže odpovídala mezím stanoveným v Doporučení STL. Sledována byla míra hemolýzy erythrocytové masy vypočtená z koncentrace volného hemoglobinu v přípravku podle postupů předepsaných pro jejich kontrolu. Přípravky byly vyšetřeny před zátěží, v okamžiku zkrácené expirace dle Doporučení STL a v okamžiku původně stanovené, nezkrácené expirace. Procento přípravků splňujících požadavky kvality po zátěži při zkrácené i původní době použitelnosti bylo porovnáno s výsledky kontroly kvality standardně skladovaných transfuzních přípravků. Studie byla provedena na 9 ZTS, každé sledovalo dopad skladování při 1-2 stupních zátěže.

Výsledky: skladování erythrocytů při teplotě do +10 °C má na jejich kvalitu jen minimální vliv. Vzestup teploty k 15 °C vede k mírnému vzestupu hemolýzy, ale i při trvání zátěže 48 hod. není vzestup hemolýzy významný a přípravky splňují požadované parametry kvality i na konci standardní doby skladování. Při vzestupu teploty na +25 °C na 6 hod. již dochází k výraznějšímu vzestupu hemolýzy (více u EBR než u ERD), při zkrácení doby použitelnosti na 2 dny po zátěži však přípravky splňují požadované parametry kvality.

Závěr: Studie prokázala, že transfuzní přípravky vystavené nestandardní teplotní zátěži je možné použít, pokud jsou respektována omezení stanovená v Doporučení STL.

P88

HEMATOLOGICKO-ANTROPOMETRICKÁ STUDIE DÁRCŮ PLNÉ KRVE A PLAZMY

Papoušek P.¹, Procházková R.^{1,2}

¹Transfuzní oddělení, Krajská nemocnice Liberec, a.s.

²Fakulta zdravotnických studií, Technická univerzita v Liberci

Cíle: Hodnoty krevního obrazu, tělesné parametry a frekvence darování ovlivňují způsobilost dárce k odběru, proto byla v této studii provedena jejich detailní analýza.

Metody: Studovaný soubor tvořili všichni dobrovolní bezpříspěvkoví dárce krve a krevních složek, kteří podstoupili odběry v Krajské nemocnici Liberec, a.s. v průběhu roku 2017. Zařazení byli pouze dárce propuštění k odběru. Byla zpracována data z informačního systému transfuzního oddělení.

Výsledky: Celkem bylo analyzováno 14 205 odběrů (krevní skupina 0 39 %, A 39 %, B 15 %, AB 6 %) od 5292 dárců (krevní skupiny 0 38 %, A 40 %, B 16 %, AB 6 %) – 3239 mužů a 2053 žen; typy odběrů: plná krev (PK) 9562, erythrocytaferéza 18, plazmaferéza (PF) 4598 a trombocytaferéza 57. Průměrný věk dárce PK byl 40,3 let a PF 41,7 let. Dárce darovali průměrně PK 2krát ročně, PF 7,1krát ročně. U dárců PK byl hemoglobin: muži 152,5 g/l a ženy 136 g/l. Během 1 roku darovali PK dárce krevní skupiny 0 průměrně 2,12krát (0–2,29krát), A 1,92krát, B 1,86krát, AB 1,78krát. BMI koreloval pozitivně s hemoglobinem u dárců PK i PF (R2 0,0646, p < 0,001). U mužů dárců PK i PF minimálně klesal hemoglobin s věkem (R2 0,0186, p < 0,001), naopak u žen dárců PK i PF minimálně

POSTEROVÁ SEKCE

s věkem stoupal (R^2 0,0137, $p < 0,001$). Počet trombocytů minimálně stoupal s leukocyty (R^2 0,0875, $p < 0,001$) u dárců PK i PF. Ženy darující PK měly průměrně minimálně více trombocytů ($p < 0,001$), více leukocytů ($p < 0,001$) a vyšší MCV ($p < 0,001$) než muži darující PK.

Závěr: Dárci krevní skupiny 0, z nich zejména RhD negativní, častěji podstoupí odběry než dárci ostatních krevních skupin. Hemoglobin má stoupající tendenci s věkem u žen, proto je nutné dbát o dostatečné zásoby železa žen v produktivním věku. Zatím máme dostatek dárců PK i rezervy u aferetických dárců, i když nábor nových dárců je aktuální.

P89

JAK? EFEKTIVNĚ!

Pacasová R., Adamcová M., Lejdarová H.

Transfuzní a tkáňové oddělení FN, Brno

Cíl: Vyhodnocení efektivity využití zdrojů u zvolených parametrů za definované období s ohledem na přijatá opatření ke zlepšení v organizaci procesu výroby transfuzních přípravků.

Zvolené parametry: 1. vstupní materiál (počet odebraných dárců a návratnost prvodárců), 2. proces zpracování (využití „zbytkového“ materiálu – buffy coatů), 3. využití vyrobených transfuzních přípravků pro hemoterapii (% likvidací).

Metoda: Ve všech zvolených parametřích statistické vyhodnocení sesbíraných dat z období před přijatými opatřeními a po nich.

Výsledky: 1. Celkový počet prvodárců zaznamenal mezi roky 2010–2017 nárůst (2139 v roce 2010 vs. 3459 v roce 2017). Jejich návratnost ve dvouletém sledování po prvním darování je větší než 60% (2015). 2. Po rozšíření výroby na dny pracovního volna došlo k celkovému zvýšení využití buffy coatů z původních 41 % (2011) na 51,5 % (2018). 3. Celkový počet likvidovaných transfuzních přípravků ve vztahu k celkové produkci daného roku průběžně klesal od 2,8 % (2010) k 1,48 % (2017).

Závěr: Naše zkušenosti ukazují, že v ZTS lze uplatnit velmi efektivní zlepšování využívání zdrojů. Dlouhodobě sledovaná a vyhodnocovaná data z procesu výroby transfuzních přípravků ukazují posun činností směrem k jejich vyšší efektivitě. Vynaložená energie, čas, náklady i investice mohou přinášet žádoucí efekt, vyjádřitelný čísly. Data však musí být správně sbírána a interpretována. Efektivita využívání omezených zdrojů a její zvyšování je nikdy nekončící cyklický proces

zahrnující přezkoumávání, vyhodnocování, uplatňování nových poznatků do praxe a kontrolu.

P90

S TRANSPLANTACÍ ASOCIOVANÁ ALOIMUNNÍ TROMBOCYTOPENIE ZPŮSOBENÁ PROTILÁTKOU ANTI-HPA-1a – KAZUISTIKA

Bolcková H. T.¹, Gašová Z.², Šťastná Marková M.³, Miarková E.¹

¹Oddělení imunohematologie UHKT, Praha

²Aferetické oddělení UHKT, Praha

³Transplantační jednotka a JIHeP UHKT, Praha

Úvod: Aloimunní trombocytopenie může vzácně komplikovat alogenní transplantaci krvetvorných buněk, pokud zbylé lymfocyty pacienta tvoří protilátky proti dárcovským trombocytovým antigenům.

Metoda: Protilátky proti trombocytům byly vyšetřeny testy DIFT, ELISA (LIFECODES Pak12) a Luminex bead (LIFECODES PakLx). HPA genotyp byl vyšetřen testy HPA BLOODchip ID (Grifols) a HPA FluoGene (InnoTrain). Protilátky anti-HLA I. třídy byly vyšetřeny testy LCT a ELISA (LIFECODES QuikScreen).

Kazuistika: V květnu 2015 byla v ÚHKT hospitalizována 51letá pacientka k léčbě akutní myeloidní leukemie. Během transfuzní terapie se u pacientky rozvinula refrakternost na trombocyty. Ve vstupním vzorku byly identifikovány protilátky proti trombocytovým antigenům **HPA-1a**, **HPA-5b**. Tomuto nálezu odpovídal HPA genotyp pacientky 1bb-2aa-3aa-4aa-5aa-15bb. Protilátky anti-HLA I. třídy nebyly detekovány. Pro další substituční terapii byly vybírány trombocyty bez HPA antigenů 1a; 5b. Pacientka byla indikována k HSCT. HPA genotyp vybraného nepříbuzného dárce byl **1ab-2aa-3ab-4aa-5aa-15ab**. K přihojení neutrofilů ($ANC > 0,5 \times 10^9/l$) došlo 18. den po transplantaci, trombocytopenie ($< 20 \times 10^9/l$), ale přetrvávala a pacientka byla stále závislá na transfuzích HPA kompatibilních trombocytů. U pacientky byly detekovatelné protilátky anti-HPA-5b, protilátky proti antigenu HPA-1a byly (pravděpodobně) vysyceny na HPA-1a pozitivních trombocytech dárce. 18 měsíců po první transplantaci byla pro relaps onemocnění provedena druhá HSCT od haploidentického syna pacientky s HPA genotypem **1ab-2aa-3aa-4aa-5ab-6aa-9aa-15ab**. K přihojení neutrofilů došlo 14. den; k přihojení trombocytů ($> 20 \times 10^9/l$) došlo 18. den a ke kompletnímu přihojení 33. den po transplantaci. Substituce trombocytů nebyla nutná,

přestože dárce měl oba HPA antigeny (HPA-1a; HPA-5b), proti kterým pacientka původně vytvářela aloprotilátky. Tyto protilátky nebyly detekovatelné od 22. dne po transplantaci. V období od 1. HST do přijetí po 2. HST dostala pacientka 103 jednotek trombocytů z aferézy od 15 HPA-1a, -5b negativních dárců.

Závěr: Pro úspěšnou transfuzní terapii pacientů s anti-HPA aloprotilátkami je nutné vytvořit a udržovat dostatečně velký registr HPA otypovaných dárců.

P91

VLIV TRANSFUZÍ NA STANOVENÍ GENOTYPU KREVNÍCH SKUPIN

Králová J.¹, Králová M.¹, Linhartová E.², Písačka M.¹

¹Oddělení imunohematologie ÚHK, Praha

²Oddělení krevní banky FN Motol, Praha

Cíle: Molekulárně biologické techniky jsou v imunohematologických laboratořích využívány v případech, kdy není možné určit přítomnost antigenů sérologickými metodami. Většina laboratoří, která tyto techniky využívá, jimi specifikuje slabé a variantní RhD antigeny. Další možností je použití při vyšetření polytransfundovaných pacientů, u nichž nelze sérologicky určit přítomnost antigenů. V těchto případech nám genotypovací metody pomohou určit specifické polymorfismy pro jednotlivé antigeny, a tím i genotypovou predikci fenotypu. V některých případech se genotyp výrazně liší od sérologického fenotypu. V NRL pro imunohematologii jsme se zabývali otázkou, do jaké míry je DNA izolovaná z periferní krve polytransfundovaných pacientů kontaminována zbytkovými leukocyty z transfuzních přípravků, resp. DNA dárců krve. Hlavním cílem bylo ověřit, zda naše genotypovací techniky detekují pouze polymorfismy v pacientově DNA a výsledky nejsou ovlivněny kontaminací dárcovskou DNA.

Metody: Izolace DNA ze vzorku periferní krve a ze vzorku slin (QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen); PCR-SSP (FluoGene, Inno-train).

Výsledek: Konečný výsledek byl vždy shodný. V DNA z periferní krve byly patrné nespecifické reakce (pod cut-off). Při použití DNA ze slin nespecifické reakce mizí, zůstávají jen jasné pozitivní a negativní reakce.

Závěr: Podané transfuze zřejmě neovlivňují stanovení genotypu metodou (PCR-SSP: FluoGene) při použití DNA izolované z periferní krve. Cut-off hodnoty jsou vhodně nastaveny k odfiltrování nespecifických reakcí.

P92

IMPLEMENTACE IMUNOHEMATOLOGICKÉHO ANALYZÁTORU ERYTRA DO RUTINNÍHO PROVOZU LABORATOŘE

Řehořová L., Novotná A., Veselá I.

Transfuzní oddělení, Krajská nemocnice Liberec, a.s.

Úvod: Na TO Krajské nemocnice Liberec jsme v dubnu 2017 nainstalovali nový imunohematologický analyzátor Erytra. Cílem bylo dosáhnout plné automatizace imunohematologických vyšetření pacientů, racionalizace práce a úspory lidské pracovní síly.

Metoda: Erytra je plně automatický analyzátor na principu gelové aglutinace na kartách DG Gel, vyšetření jsou prováděna z nesrážlivé krve odebrané do zkumavek s EDTA.

Výsledek: Analyzátor byl instalován 18. 4. 2017 a do rutinního použití uveden k 16. 6. 2017 po provedení vstupních verifikací všech metod (celkem 260 vyšetření) a nastavení obousměrného převodu dat mezi analyzátořem a LIS. Na analyzátořu jsou prováděna vyšetření i v rámci ústavní pohotovostní služby. K 30. 4. 2018 jsme na analyzátořu provedli 4921 vyšetření kompletní krevní skupiny (KS), 3921 ověření KS, 126 KS novorozenců, 8152 screeningů protilátek (SCR) NAT, 1426 SCR enzymatickým testem, 9625 zkoušek kompatibility, 792 PAT, 32 rozlišení senzibilizace erytrocytů, 339 vyšetření Rh/Kell fenotypu, 335 identifikací protilátek (NAT: 199/Enzym: 136) a vyšetření dalších erytrocytárních antigenů (Cellano: 61/Fy(a): 95/Fy(b): 88/Jk(a):159+722/Jk(b): 158+772/S: 134/s: 119/M: 132/N: 121). V době implementace analyzátořu do provozu jsme sledovali dobu odezvy prováděných vyšetření. Pro předtransfuzní vyšetření (PV) s i bez zkoušky kompatibility (KS+S) v režimu statim byla nastavena na 1,5 hodiny. V režimu statim nebyla dodržena u 2,9 % vzorků z celkového počtu 2706 statimových vzorků k 31. 12. 2017. Od 1. 1. 2018 dobu odezvy po úpravě splňujeme (pro KS+S 2 hodiny).

Závěr: Automatizace se podařila téměř u 95 % vyšetření, přinesla zvýšenou bezpečnost a úbytek agendy. Snížili jsme administrativu. Efektivní je i úspora lidské pracovní síly, zejména o ústavní pohotovostní službě. Dodržení doby odezvy jsme docílili u rutinních vzorků. Po úpravě doby odezvy u PV bez zkoušky kompatibility v režimu statim byla u těchto vzorků také dodržena.

P93

SBĚR PERIFERNÍCH KRVETVORNÝCH BUNĚK U RODINNÝCH DÁRCŮ PO MOBILIZACI POMOCÍ BIOSIMILÁRNÍHO G-CSF – NAŠE ZKUŠENOSTI

Bhuiyanová Ludvíková Z.¹, Gašová Z.^{1,2}, Böhmová M.¹, Slouková M.¹, Vítek A.^{1,2}

¹Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

²Ústav klinické a experimentální hematologie 1. LF UK, Praha

Cíle: Periferní krvetvorné buňky (PBPC) se získávají od dárců po mobilizaci růstovým faktorem (G-CSF). V minulosti byl používán pouze originální přípravek Neupogen. V současnosti se zavádějí biosimilární přípravky, které jsou ekonomicky výhodnější. Na našem pracovišti jsme začali používat biosimilární G-CSF (Zarzio) v lednu 2017. Zajímalo nás, jestli je mobilizace stejně efektivní a jestli nedochází k rozdílům v mobilizaci v závislosti na věku dárce.

Metody: V našem hodnocení byli příbuzní dárce, kteří podstoupili mobilizaci originálním G-CSF od 1/2015 do 1/2017, a příbuzní dárce, kteří byli mobilizováni biosimilárním G-CSF od 1/2017 do 2/2018. Skupiny dárců jsme označili N (s Neupogenem) a Z (se Zarziem). Byl aplikován G-CSF s.c. v jedné večerní dávce. Separace byly zahájeny po 4. dávce G-CSF. Za selhání mobilizace jsme považovali hodnoty CD34+ v periferní krvi nižší než 20 v μ l. Optimální transplantační dávka byla 4–5krát 106 CD 34+/kg příjemce. Minimální transplantační dávka byla více než 2krát 106 CD 34+/kg příjemce.

Výsledky: V obou skupinách nebyly významné rozdíly v zastoupení dárců dle pohlaví a věku. K selhání mobilizace došlo u dvou dárců ve skupině N, u tří dárců v Z. Medián získaného množství PBPC byl 5,9 CD 34+(106)/kg příjemce u N a 6,4 CD 34+(106)/kg příjemce u Z. Ve všech případech byla nasbírána minimální transplantační dávka. Ve většině případů byla nasbírána optimální transplantační dávka (88 % u N, 80 % u Z). Pokud jsme obě skupiny rozdělili dle věku (do 40 let, nad 40 let), byla patrná lepší mobilizace Neupogenem u dárců do 40 let. Na výsledném sběru se tato skutečnost neprojevila.

Závěr: Nezaznamenali jsme významné rozdíly v mobilizaci rodinných dárců různými typy růstových faktorů. Neprokázali jsme, že by bylo užitečné používat různé typy G-CSF dle věku dárce. Dlouhodobě sledujeme dárce po mobilizaci originálním G-CSF u dárců po mobilizaci biosimilárním G-CSF jsme zatím na začátku vyhodnocování a sledování a doufáme, že výsledky budou stejně úspěšné.

P94

NOVÁ VYŠETŘOVACÍ METODA NA TO FN PLZEŇ

Korandová V., Šlechtová P., Šuhová I.

Transfuzní oddělení FN, Plzeň

Cíl: Zavedením vyšetřování core antigenu viru hepatitidy C (HCV Ag) zkrátit tzv. diagnostické okno při vyšetření HCV u dárců krve a zajistit tím bezpečnější transfuzní přípravky.

Metoda: V roce 2016 proběhlo výběrové řízení na vyšetřovací metodu HCV Ag a od roku 2017 jsme zavedli tuto metodu do rutinní praxe. Metoda ARCHITECT HCV Ag je chemiluminiscenční imunoanalýza na mikročásticích (CMIA – chemiluminescent microparticle immunoassay) ke kvantitativnímu stanovení core antigenu viru hepatitidy C v lidském séru a plazmě. Jedná se o dvoukokovou imunoanalýzu s automatickou předpřípravou, výsledky jsou k dispozici za 36 minut, detekce probíhá patentovanou chemiluminiscenční technologií Chemiflex. Jedná se o plně automatizované kvantitativní stanovení core Ag viru HCV v lidském séru a plazmě na analyzátoch ARCHITECT i2000/i2000SR. Současně s HCV Ag je možné stanovovat i ostatní infekční markery včetně anti-HCV z jednoho vzorku. Metoda detekuje všech šest genotypů HCV. Test je vysoce senzitivní – 3,0 fmol/l (0,06 pg/ml). Významná přednost tohoto testu je, že výrazně zkracuje tzv. diagnostické okno, které se u stanovení protilátek anti-HCV pohybuje cca 45–68 dní.

Výsledky: Novým testem se za rok 2017 vyšetřilo 20367 našich dárců krve, 2808 dárců krve z HTO Rokycanské nemocnice a.s., 1325 dárců trombocytů (trombocytaferéza) z Hematoonkologického oddělení FN Plzeň a 85 autologních dárců. Na vyžádání z různých oddělení FN Plzeň bylo vyšetřeno 126 pacientů v rámci předoperačního vyšetření. Všechna vyšetření byla negativní nebo v tzv. šedé zóně a následně potvrzena s negativním výsledkem v NRL Praha.

Závěr: Nově zavedená metoda zkrácením diagnostického okna u vyšetření HCV výrazně zvyšuje bezpečnost námi vyráběných a distribuovaných transfuzních přípravků směrem k příjemcům transfuze. Současně jsme snížili počty vzorků odesílaných ke confirmaci do NRL, protože odesíláme reaktivní vzorky anti-HCV s hodnotou $\geq 0,90$ S/CO (dle platných doporučení) a před zavedením metody jsme s ohledem na dlouhé diagnostické okno u anti-HCV zasílali reaktivní vzorky s hodnotou $\geq 0,70$ S/CO.

P95

100% DELEUKOTIZACE TRANSFUZNÍCH PŘÍPRAVKŮ NA TRANSFUZNÍ STANICI V CHOMUTOVĚ

Kolářová K.

Hematologicko-transfuzní oddělení, Krajská zdravotní a.s. – Nemocnice Chomutov, o.z.

Od června roku 2017 se na našem pracovišti vyrábí pouze deleukotizované transfuzní přípravky (dále TP). Už v roce 2001 jsme začali s výrobou prvních ERD (erytrocyty resuspendované deleukotizované), která ovšem probíhala až do roku 2017 souběžně s výrobou EBR (erytrocyty bez buffy coatu resuspendované). Po deleukotizovaných erytrocytárních přípravcích jsme postupně přistoupili i na deleukotizaci trombocytárních přípravků. V roce 2013 to byli TBSDR (trombocyty z buffy-coatu směsné deleukotizované v náhradním roztoku) a na podzim roku 2015 TADR (trombocyty z aferézy deleukotizované v náhradním roztoku). Deleukotizace TP představuje zvýšení bezpečnosti hemoterapie o rizika spojená s leukocyty, které jsou příčinou nehemolytických febrilních potransfuzních reakcí a TRALI (transfusionrelated acute lung injury). Dále mohou přenášet intraleukocytární viry (cytomegalovirus, Epstein-Barr virus). Dokážou také ovlivnit imunitu příjemce transfuze imunopresí nebo imunomodulací. Dále deleukotizace TP in-line filtrací (v den odběru) eliminuje filtraci u lůžka (bed-side), která se dnes již považuje za nestandardní díky riziku bradykininové reakce a absenci kontroly kvality takto vyrobeného TP. Také pro transfuzní stanici dochází ke snížení počtu vyráběných typů TP a tím následně počtu vzorků pro kontrolu kvality TP. Jejich nevýhodou stále zůstává cena deleukotizovaných TP a odběrových vaků pro jejich výrobu. Docílení 100% deleukotizace TP na našem oddělení v závěru nebylo až tak náročné. K výrobě jednotlivých typů deleukotizovaných TP jsme přistupovali postupně a jedinou finanční zátěží nakonec bylo zvýšení nákladů díky speciálním odběrovým vakům s leukofiltrem a nákup větších kyvet do velkoobjemových centrifug. Další kroky již proběhli bez finančních prostředků, ať už to byla domluva s vedením nemocnice, zaškolení personálu či úprava řízené dokumentace. 100% deleukotizace TP je povinná v mnoha vyspělých zemích Evropy a světa a podporována odbornými společnostmi České lékařské společnosti J. E. Purkyně. Snížením rizika potransfuzní reakce nejen zvyšuje kvalitu zdravotní péče, ale také snižuje náklady na léčbu a zkracuje dobu hospitalizace v případě jejího vzniku.

P96

INCIDENCE ANTIERYTROCYTÁRNÍCH PROTILÁTEK U TĚHOTNÝCH ŽEN V LETECH 2000–2017

Holusková I.¹, Lubušský M.², Galuszková D.¹¹Transfuzní oddělení FN, Olomouc²Porodnicko-gynekologická klinika FN, Olomouc

Cíl: Cílem studie bylo určení incidence specifických, klinicky významných antierytrocytárních aloprotilátek, které mohou způsobit závažné hemolytické onemocnění plodu a novorozence, u těhotných žen v I. trimestru těhotenství v olomouckém regionu. V souvislosti s tím jsme sledovali i počet provedených intrauterinních transfuzí a výměnných transfuzí u novorozenců.

Metoda: V letech 2000–2017 bylo na našem Transfuzním oddělení vyšetřeno celkem 58 414 těhotných žen. V I. trimestru těhotenství byl u všech žen proveden screening nepravidelných tepelných antierytrocytárních protilátek a dále pak i identifikace protilátkových nálezů.

Výsledky: Klinicky významné antierytrocytární aloprotilátky byly detekovány u 1,8 % těhotných žen (1026/58 414). Nejčastěji byla detekována aloprotilátka anti-E s incidencí 6,8 % (395/58 414), následována aloprotilátkou anti-D s incidencí 4,1 % (237/58 414), dále následovaly aloprotilátky anti-M s incidencí 1,9 % (112/58 414), anti-K s incidencí 1,5 % (90/58 414), anti-C s incidencí 1,3 % (75/58 414), anti-c s incidencí 1,0 % (60/58 414), anti-S s incidencí 0,4 % (25/58 414), anti-Jka s incidencí 0,2 % (11/58 414) a anti-Fya s incidencí 0,1 % (7/58 414). V souvislosti s těmito protilátkami byla v letech 2000–2017 provedena intrauterinní transfuze u 28 těhotných žen a bylo provedeno 49 výměnných transfuzí u novorozenců.

Závěr: Nejčastěji detekovanou aloprotilátkou v našem souboru byla aloprotilátka anti-E, o které ovšem víme, že může vznikat i přirozeně, bez erytrocytárního antigenního podnětu.

Druhou nejčastěji detekovanou, avšak klinicky asi nejvýznamnější aloprotilátkou, která byla příčinou 23 intrauterinních a 37 výměnných transfuzí, byla aloprotilátka anti-D, a to i přes provádění anti-D imunopropylaxe u RhD negativních žen. Klinický problém mohou představovat i jiné aloprotilátky, zejména pak anti-c a anti-K. Aloprotilátka anti-C byla příčinou jedné intrauterinní transfuze a osmi výměnných transfuzí, aloprotilátka anti-K 1 intrauterinní a 1 výměnné transfuze. Počet intrauterinních transfuzí v posledních letech velmi výrazně poklesl a od roku 2011 nebyla ve

POSTEROVÁ SEKCE

Fakultní nemocnici Olomouc provedena ani jedna intrauterinní transfuze.

P97

TWO NOVEL PARTIAL D ANTIGENS, CHARACTERIZED BY SINGLE MISSENSE NONTEMPLATED MUTATIONS CAUSING A SIGNIFICANT IMPACT ON RHD PROTEIN TERTIAL STRUCTURE AND D EPITOPES EXPRESSION

Písačka M.¹, Králová J.¹, Fennell K.², Hoffman R. C.², Schneider S.³, Sovová Ž.⁴

¹Reference Laboratory for ImmunoHaematology, Institute of Haematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic

²Molecular Laboratory, Grifols Immunohematology Center, San Marcos, United States

³Inno-train Diagnostik GmbH, Kronberg, Germany

⁴Biochemistry Dpt., Institute of Haematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic

Background: The clinically important D antigen is encoded by the RHD gene, which is one of most polymorphic blood group genes in humans (to date around 500 variations). Monoclonal anti-D antibodies recognize multiple epitopes on the surface of the D antigen. Individuals with lack of one or more epitopes are referred to partial D antigen and can produce allo-anti-D.

Aims: Investigation was prompted by finding RBCs with suspect partial D antigens in two Czech pregnant women with no explanatory results of conventional genotyping assays. RHD sequences were then determined from genomic DNA and D epitope patterns were studied with commercial and workshop anti-D panels and compared to other mutations in the same region.

Methods: Serology testing was done by column agglutination using monoclonal anti-D antibodies. Routine Partial and Weak D genotyping was performed by PCR-SSP (Inno-train: FluoGene), sequencing in Innotrains and Grifols IH Center. Homology modeling was performed in Modeller using crystal structure 3HD6 (human rhesus glycoprotein RhCG) as a template.

Results: Routine RhD typing showed weakened D expression in conventional ABO RhD gel cards and R1r phenotype in both cases. Partial D kit revealed patterns not fitting for known D variants. PCR-SSP kits provided normal results. Sequencing found so far not reported mutations with predicted amino acid changes 683T>C (Leu228Pro) and 1105G>A (Gly368Lys). Epitope mapping found in D228P lacking 7 D-Eps and

sub-splitting 4 D-Eps; in D368K lacking 10 D-Eps and sub-splitting 5 D-Eps.

Conclusion: Two novel mutations causing partial D phenotype are interesting from the point of view their impact on known D epitopes. The amino acid substitution in RHD(L228P) is located in the D protein vestibular part and allow to compare the effect of neighbouring amino acid substitutions on D epitopes expression. The variant RHD(G368K) is predicted to have substitution in last transmembranous part of the D protein but affect substantially the exofacial epitopes expression.

P98

VYSYCOVÁNÍ AUTOPROTLÁTEK – SROVNÁNÍ DVOU METOD

Böhmová T., Khynychová K., Masopust J., Peyreková L., Váchová K.

Transfuzní oddělení, Krajská zdravotní a.s. – Masarykova nemocnice v Ústí nad Labem, o.z.

Zajištění hemoterapie u pacientů s pozitivním přímým antiglobulinovým testem (PAT) a volnými nespecifickými autoprotilátkami je mnohdy komplikované. Autoprotilátky mohou maskovat přítomnou aloprotilátku, z toho důvodu se využívá jejich adsorpce na vlastní erytrocyty nebo alogenní fenotypově shodné erytrocyty (u pacientů po transfuzi), tzv. vysycování. Vysycené sérum (plazma) se následně používá pro test kompatibility. Do současnosti jsme na našem pracovišti používali vysycování pomocí polyetylen glykolu (PEG). PEG napomáhá vazbě protilátek na antigen, kromě toho ale také působí precipitaci proteinů a omezuje detekci IgM protilátek (po vysycení tedy nemusí být ve vzorku zachyceny protilátky v ABO systému). Proto jsme se rozhodli porovnat dosavadní metodiku s možnou alternativou – vysycováním na enzymaticky ošetřené erytrocyty. Vzhledem k zjištěným výsledkům uvádíme první informace. K vysycování pomocí PEG byly použity fenotypově vhodné erytrocyty dárců krve, ošetřené bromelinem a vysycování se provádělo v poměru sérum : PEG : erytrocyty (1 : 1 : 0,5). Pro vysycování tzv. papainovou metodou byly dárcovské erytrocyty ošetřeny papainem a následně inkubovány s plazmou v poměru 2 : 1 (plazma : erytrocyty). Následný screening či identifikace protilátek byly prováděny sloupcovou aglutinací (Bio-Rad). Dále byla kontrolována koncentrace celkové bílkoviny (CB; turbidimetrie, Oddělení klinické biochemie). Inkubace plazmy s PEG vede k výrazné precipitaci bílkovin, včetně IgG (pokles CB o min. 60 % původní

hodnoty po prvním vysycení, IgG neměřitelné, další vysycování bez výrazného vlivu). Oproti tomu inkubace s papainem ošetřenými erytrocyty výrazně ovlivňuje koncentraci celkové bílkoviny teprve při opakovaných cyklech. V prostředí s PEG dochází k poklesu titru aloproutilátek (např. anti-D z titru 32 na 2 po 3 kolech vysycení). Ve dvou případech, kdy byly oba způsoby vysycování porovnávané, byla v papainové metodě detekována potenciálně klinicky významná aloproutilátka (anti-Jka a anti-K), zatímco plazma vysycená PEG byla ve screeningu negativní.

Tato první data přináší podstatné informace k metodě používané také na dalších pracovištích a potvrzují informace v literatuře. PEG sice zkracuje potřebný počet opakování k vysycení autoproutilátky, rizikem je ale současná ztráta detekce klinicky významných proutilátek.

P99

TITROVÁNÍ PROUILÁTEK NA ANALYZÁTORU IH-500

Böhmová T., Khynychová K., Masopust J., Peyreková L., Řízková M.

Transfuzní oddělení, Krajská zdravotní a.s. – Masarykova nemocnice v Ústí nad Labem, o.z.

Úvod: S rozvojem přístrojové techniky v imunohematologii je stále více metod možné provádět automatizovaně. Příkladem je i titrování proutilátek, nově nabízené také firmou Bio-Rad na analyzátoru IH-500.

Metody: V rámci testování bylo provedení na analyzátoru porovnávané se zkumavkovou metodou a manuální sloupcovou aglutinací. U všech provedení se k titraci použily fenotypově vhodné heterozygotní diagnostické erytrocyty. Vyšetřovaná plazma byla řaděna geometrickou řadou ve fyziologickém roztoku (zkumavková metoda), LISS roztoku (manuální sloupcová aglutinace) a firemním roztoku určeném pro titrování (analyzátor IH-500, obsahuje BSA). Hodnota titru byla stanovena jako převrácená hodnota posledního ředění s reakcí o síle 1+. Rozdíly ve výsledných titračních stupních mezi jednotlivými provedeními byly porovnány ve skupinách podle specifity proutilátky.

Výsledky: Celkem bylo vyšetřeno 42 vzorků obsahujících specifickou proutilátku (17krát anti-D, 11krát anti-K, 8krát anti-E a dále šest vzorků s různými specifitami, které byly zastoupeny pouze jednou). U provedení na gelových kartách, ať už manuálně nebo na analyzátoru, se podle očekávání prokazovaly vyšší hodnoty titrů, ale v případě IH-500 nebyl rozdíl tak

výrazný (pravděpodobně z důvodu odlišného roztoku použitého k ředění, kdy LISS více zesiluje vazbu proutilátek k antigenu). Konkrétně u anti-D byla výše titru pro sloupcovou aglutinaci i IH-500 o dva titrační stupně vyšší, u anti-K o 1 až 2 stupně. Z tohoto vzorce vybočovala anti-E, kde byly výsledky pro IH-500 podobně o 2 stupně vyšší, ale ve sloupcové aglutinaci dokonce o 3 stupně. Těmto výsledkům odpovídá i porovnání sloupcové aglutinace a provedení na IH-500, výsledky byly shodné, případně se lišily o ±1 titrační stupeň (vzhledem k možné variabilitě výsledků titrování je tento rozdíl zanedbatelný).

Závěr: Z porovnání vyplývá, že titrování na analyzátoru je možné použít bez rizika výrazně odlišných výsledků. U přístrojového provedení je nutné dostatečné množství vzorku vzhledem k daným pipetovacím objemům, nevýhodou je nemožnost použití jiných než firemních erytrocytů (prozatím). Oproti manuálnímu provedení ale přináší vyšší standardizaci a omezení provozní zátěže laboratorních pracovníků.

P100

DETECTION OF ABO CHIMERISM IN A LONG-TERM BLOOD DONOR FOLLOWING A CHANGE IN BLOOD GROUPING TECHNIQUE

Králová J.¹, Písačka M.¹, Čechová H.², Leinertová M.³, Dobrá E.⁴, Storry J. R.⁵, Olsson M. L.⁵, Hult A.⁵

¹Oddělení imunohematologie ÚHKT, Praha

²Oddělení HLA ÚHKT, Praha

³Oddělení hematologie, Nemocnice Jihlava

⁴Transfuzní oddělení VFN, Praha

⁵Clinical Immunology and Transfusion Medicine, Office of Medical Services, Lund & Division of Hematology and Transfusion Medicine, Lund University, Lund, Sweden

Aims: This investigation was prompted by finding a double population of erythrocytes in a healthy blood donor with no transfusion history. The blood donor had donated 38 times, and had typed previously as group A RhD positive without discrepancies until the method for blood grouping changed from tube agglutination to column agglutination in gel cards. The double population was found in column agglutination in tests with anti-A, and subsequently when typing for c antigen. Our aim was to investigate the chimera and determine the underlying ABO genotype of this blood donor.

Methods: Routine blood grouping was performed by column agglutination. Separation of the double

POSTEROVÁ SEKCE

cell populations was performed by differential agglutination with IgM anti-A and anti-c. Flow cytometry with monoclonal anti-A and anti-H was performed to characterise the two populations. ABO genotyping was performed by PCR-SSP and gel-electrophoresis, in-house PCR-ASP and PCR-RFLP methods. Karyotyping was performed by standard methods. Identification of reference alleles was performed by fragment analysis of Short Tandem Repeats (STR) polymorphisms.

Results: The donor's genotype was identified as ABO*O.01/O.02 by CE-certified PCR-SSP kits however these systems detect the ABO*A genotype by exclusion only. Subsequent in-depth resolution detected 3 alleles: ABO*A1.01/O.01.02/O.02.01. The genotype of the donor's father was ABO*O.01/O.02 and that of his mother was ABO*A1.01/O.01. Flow cytometry with using anti-A and anti-H shown a double population of erythrocytes; 38% group A, 62% group O.

Conclusion: A rare case of a high-grade chimera was observed in a healthy blood donor with two healthy children. Such situations can cause troubles in blood grouping and discrepancies in blood group genotyping.

P101

QWALYS® 3 – AUTOMATIZÁCIA IMUNOHEMATOLOGICKÝCH VYŠETRENÍ DARCOV KRVI

Sokolová N., Lazárová K.

Národná transfúzna služba SR, Bratislava, pracovisko Košice

Cieľ: Prezentácia našich skúseností s automatizáciou vyšetrení darcov krvi s použitím Analyzátoru qwalys® 3.

Metódy: Automatický analyzátor qwalys® 3 umožňuje presne a za krátku dobu stanoviť kompletné vyšetrenia krvných skupín, fenotypov a taktiež skrining protilátok. Princípom fungovania je magnetizácia červených krviniek, ktorá nahrádza etapu odstredovania, ktorá sa bežne používa v imunohematológii.

Výsledky: Výhodou analyzátoru qwalys® 3 je najmä možnosť priebežného nakladania vzoriek, správna interpretácia výsledkov, kratší časový interval vyšetrenia, detekcia zrazenín, vysoký výkon a možnosť internej kontroly kvality. Automatický analyzátor qwalys® 3 automaticky prenáša výsledky do informačného systému na našom pracovisku.

Nešpecifické výsledky: Hemolýza, kontaminácia vzoriek, malý objem krvi v skúmavke.

Záver: Qwalys® 3 automatizuje proces distribúcie vzoriek a materiálov, inkubáciu a magnetizáciu a taktiež správne odčítanie a interpretáciu výsledkov.

P102

ANALÝZA ANTIGÉNOV S POUŽITÍM MDMULTICARD® BASIC EXTENDED

Šipošová B., Vašenková B.

Národná transfúzna služba SR, Bratislava, pracovisko Košice

Cieľ: Pri pozitívite priameho antiglobulínového testu, ktorá sa najčastejšie vyskytuje pri AIHA vyšetrujeme klinicky významné antigény metódou MDmulticard® Basic Extended Phenotype. Reagencie použité v karte boli pripravené s použitím monoklonálnych protilátok určených na detekciu nasledujúcich antigénov: Fy/a/ (FY1), Fy/b/(FY2), Jk/a/(JK1), Jk/b/(JK2), S (MNS3), s (MNS4).

Metódy: MDmulticard umožňuje súbežnú serologickú typizáciu klinicky významných antigénov na princípe laterálnej difúzie. Protilátky proti týmto antigénom sú zodpovedné za hemolytickú chorobu novorodencov a transfúzne reakcie. Reagencie a testované vzorky musia dosiahnuť izbovú teplotu. Pri testovaní sa používajú vzorky z celej krvi, sedimentu erytrocytov alebo natívnej krvi.

Výsledky: *Positívna reakcia* – červený prúžok vytvorený naakumulovanými erytrocytmi v príslušnej zóne napustenej antisérami indikuje prítomnosť príslušného antigénu.

Negatívna reakcia – neprítomnosť prúžku indikuje absenciu príslušného antigénu.

Nešpecifické výsledky – silno lipemické vzorky, vysoký titer autoprotilátok.

Nesprávne výsledky – príliš vysoká alebo nízka koncentrácia suspenzie erytrocytov.

Falošné výsledky – vysoký titer aloprotilátok, kontaminácia vzorky.

Záver: MDmulticard je rýchla a jednoduchá metóda, ktorá v priebehu 10 minút špecifikuje klinicky významné antigény. Uplatňuje sa pri substitúcii z vitálnej indikácie, kedy sa podávajú erytrocyty zhodné v krvnej skupine ABO a fenotypicky zhodné v systéme Rh, Kell, Duffy, Kidd, MNS, napriek pozitívnym skúškam kompatibility.

P103

VÝZNAM POKLESU HLADINY PCSK9 (PROPROTEIN KONVERTÁZY SUBTILISIN KEXIN 9) PO REOFERÉZE U VĚKEM PODMÍNĚNÉ MAKULÁRNÍ DEGENERACE

Bláha M.¹, Langrová H.², Bláha V.³, Lánská M.¹, Studnička J.², Stepanov A.², Breznayova J.², Burová M.², Dvořáková H.²

¹IV. interní klinika LF UK a FN, Hradec Králové

²Oční klinika LF UK a FN, Hradec Králové

³III. Interní klinika LF UK a FN, Hradec Králové

Úvod: Proprotein convertáza subtilisin/kexin 9 (PCSK9) zvyšuje hladinu LDL cholesterolu. Více než 30 % plazmatického PCSK9 je vázáno na LDL-cholesterol, proto jsme předpokládali, že při reoferéze u věkem podmíněné makulární degenerace (VPMD) dojde ke snížení hladiny PCSK9.

Cíl práce: Vyšetřit hladinu PCSK9, její dynamiku při léčbě a možnou korelaci s dalšími faktory.

Metoda: K léčbě suché formy VPMD byla použita vlastní modifikace klasické reoferézy. Jde o extrakorporální filtraci plazmy: Z krve je odcentrifugována plazma a kontinuálně protéká speciálním filtrem, kdy se odstraní přesně definované spektrum vysokomolekulárních bílkovin. Tím se sníží viskozita krve i plazmy a předpokládá se zvýšený průtok v mikrocirkulaci, což umožňuje hojivé procesy v retině. Nemocní byli léčeni sledem osmi reoferéz během 10 týdnů. Byla vyšetřena hladina PCSK9 (kit Quantikine ELISA PCSK9) u 19 pacientů (devět žen a deset mužů, ve věku 77,8 ± 4,3, medián 69), a to na začátku, uprostřed i na konci léčebné série osmi procedur, vždy před a po výkonu. Kontrolním souborem byli dárči krve (54 zdravých jedinců, 28 mužů, 26 žen, ve věku 54,9 ± 6,7 let, medián věku 56 let).

Výsledky: Výchozí hladina PCSK9 byla u pacientů zvýšena – medián 192 ng/l, u kontrolního souboru 136 ng/l (p = 0,02). Hodnoty se po procedurách významně snižují (p < 0,0001). Hladina PCSK9 koreluje s hladinou celkového cholesterolu, nekoreluje s LDL, HDL cholesterolem, fibrinogenem, viskozitou plazmy a krve, apolipoproteinem B, IgM a alfa₂-makroglobulinem. Hladina PCSK9 není významně odlišná u pacientů s úspěchem a neúspěchem v terapii (léčebný úspěch byl hodnocen dle zrakové ostrosti, morfologických a funkčních změn na sítnici).

Závěr: Uvedené poznatky (pravděpodobně unikátní) ověřují teorii o možné spoluúčasti poruch lipoproteinového metabolismu při vývoji VPMD, a protože je dostupná léčba, mají i praktický klinický význam.

Práce byla podpořena výzkumnými úkoly Progres-Q40/08, Q40/12, AZV 17-29241A, 17-28882A a 17-31754A.

P104

POTRANSFUZNÍ REAKCE V ČESKÉ REPUBLICE ZA ROK 2017

Galuszková D.

Transfuzní oddělení FN, Olomouc

Úvod: Cílem sdělení je analyzovat posttransfuzní reakce (PR) nahlášené v České republice za rok 2017. PR se rozumí nezamýšlená zdravotní odezva organismu pacienta, související s aplikací transfuzního přípravku (TP).

Metoda: Analýza registru hlášení PR v České republice za rok 2017.

Výsledky: Z hodnocených 509 362 aplikací TP bylo nahlášeno 520 PR (0,10 %). Ve 23 případech byly tyto reakce klinicky vyhodnoceny jako těžké PR (anafylaxe, TRALI, oběhové přetížení, HBV, BCV). Nahlášené PR zahrnovaly pestré spektrum rozdílných reakcí s odlišnou četností: alergických 248, dále FNHTR 195, anafylaktických 8, pozdních hemolytických 7, přenos HBV4, přenos HCV1, oběhové selhání 2, oběhové přetížení 43 a jiné 13. Byla provedena analýza PR podle typů aplikovaných TP: PR po erytrocytárních TP bylo nahlášeno 292, což představuje 0,08 % z celkem 354 836 aplikací, z toho 150 417 (42 %) bylo deleukotizovaných TP. Nejčastější PR byla FNHTR, u EBR 109krát (0,05%) a u ERD 56krát (0,04 %), dále reakce alergická 80krát a oběhová 31krát anafylaktická 2krát, TRALI 1krát, HBV 1krát, HCV 1krát. PR po trombocytárních TP bylo hlášeno 82, což představuje 0,22 % z 37 713 aplikací, nejčastější PR byla alergie 52krát, FNHTR 18krát a akutní oběhové selhání 4krát, pozdní imunní hemolýza 3krát, akutní oběhové selhání 3krát. U plazmy bylo zhodnoceno 108 888 aplikací, nahlášeno bylo 115 PR (0,11 %): 90krát alergická, 8krát FNHTR, 5krát anafylaxe a 5krát oběhové selhání, HBV 2krát.

Závěr: Hlášení posttransfuzních reakcí je důležitou součástí hemovigilance. Jde o retrospektivní data nezbytná k nastavení správných procesů pro zvýšení bezpečnosti hemoterapie, např. deleukotizace TP, kvalitnější vyšetřování dárců krve.

POSTEROVÁ SEKCE

P105

ROZBOR KOMPLIKACÍ PŘI ODBĚRECH DÁRCŮ KRVY V ČESKÉ REPUBLICE ZA ROK 2017**Galuszková D.**

FN, Olomouc

Úvod: Přestože odběry krve patří mezi velmi bezpečné invazivní výkony, nelze zcela vyloučit potenciální výskyt neočekávaných komplikací. Rychlé řešení takových situací je předpokladem co nejvyšší bezpečnosti pro dárce krve, jakož i minimalizace možných následků. Příspěvek hodnotí nežádoucí reakce dárců krve během běžných a separátorových odběrů na základě celoročního hlášení transfuzních oddělení v České republice.

Metoda: Analýza registru hlášení komplikací při odběrech dárců krve v České republice za rok 2017.

Výsledky: Vyhodnocením 473 456 odběrů u dárců krve (z toho 320 505 běžných odběrů a 152 952 separátorových odběrů) bylo zjištěno celkem 16 129 (3,4 %) komplikací: u běžných odběrů 14 254 (4,4 %) a u přístrojových odběrů 1875 (1,22 %). V kategorii vážných reakcí hlášených na SÚKL bylo 12 událostí: časná vazovagální reakce 6krát, pozdní vazovagální reakce 5krát (1krát se zraněním), hematom 1krát. Nejčastější nežádoucí reakcí při běžném odběru byla nevolnost (2658) a nezávažná časná vazovagální reakce (1485), poměrně často byl popisován přepich (1042), prasklá žíla (862), nízký průtok (1676), dále hematom v místě vpichu (304), bolest paže (54), pozdní nezávažná vazovagální reakce (317), brnění rtů (118), křeče (28), vomitus (53), anxiózní stav dárce při odběru (840), technická závada při odběru (213). K nejčastějším reakcím při přístrojových odběrech patřil přepich (508), nevolnost (216), hematom v místě vpichu (249), brnění rtů (80). Komplikace popisované při separaci zahrnovaly nedokončený odběr (135), nízký průtok (159), technickou závadu přístroje (59).

Závěr: Sledování komplikací při odběru dárců krve je součástí hemovigilančního systému. Zpětná vazba a rozbor událostí s proškolením personálu jsou předpokladem zvyšování jejich erudice, umožňující do budoucna řadě komplikací předcházet.

P106

PŘENOS HCV ERYTROCYTÁRNÍM PŘÍPRAVKEM – KAZUISTIKA**Kunčar J.**

Transfuzní a hematologické oddělení, Oblastní nemocnice Trutnov a.s.

Úvod: Přenos viru hepatitidy C transfuzí je závažnou posttransfuzní reakcí. Pravděpodobnost přenosu HCV během diagnostického okna je při používání sérologických metod udávána jeden případ na 300 000 transfuzí. Náš případ z května 2017 je specifický selháním systému spolupráce s Krajskou hygienickou službou.

Dárce: Prvodárce PŽ se dostavil k odběru dne 25. 5. 2017, v anamnéze uvedl, že je dárce krevní plazmy v Plazmacentru v Pardubicích. Byl proveden odběr. Přípravky dárce byly propuštěny v souladu se zákonem 143/2008 Sb. FFP odeslána do zpracovatelského závodu Baxalta Wien, ERD uvolněn do krevního skladu. Dne 10. 7. jsme obdrželi e-mailovou informaci od zpracovatele plazmy, že FFP dárce byla pozitivně NAT testována na HCV. Okamžitě byla provedena kontrola krevní banky, ale přípravek ERD byl 4. 7. vydán na onkologické oddělení Oblastní nemocnice Trutnov.

Opatření: Informovali jsme KHS, SÚKL a Plazmacentrum Pardubice. Tam nám bylo sděleno, že dárce se sice zajímal o odběry plazmy, ale byl z dárceství vyřazen, neboť v dotazníku uvedl požití marihuany. Při kontrole údajů o odběru systém Hemo upozornil, že dárce je od 8. 6. 2017 veden v Transregu, zařazení provedlo jiné plazmacentrum z Prahy. Dotazem jsme ověřili, že dárce v pražském plazmacentru daroval 2krát – poprvé 18. 5., a poté opět 5. 6. Sérologie z 1. odběru negativní, z druhého slabě pozitivní. Plazmaferetické centrum Praha informovalo dárce, KHS v místě bydliště (Trutnov) a zajistilo přešetření vzorku v NRL pro VH, kde byla pozitivita vzorku potvrzena; poté byl dárce vyřazen v Transregu. Hygienická služba kontaktovala dárce na adrese, ale rodina o něm neměla zprávy. Důležitý údaj, že je PŽ současně i dárce v místě bydliště v Trutnově, bohužel šetřením v červnu 2017 nebyl zjištěn.

Závěr: Přenos HCV transfuzí byl potvrzen PCR vyšetřením u pacientky ze dne 21. 7. Léčba akutní hepatitidy C nebyla zahájena pro pokročilou onkologickou onemocnění. Pacientka zemřela na nádorovou duplicitu v srpnu 2017. Spolupráce s protiepidemickým odborem KHS HK se po analýze případu zlepšila.

P107**PREHLAD EXPEDOVANÝCH
TRANSFÚZNYCH LIEKOV NA SC A OC NTS
SR V KOŠICIACH V ROKOCH 2013–2017****Jureková Z., Jablonská P., Demeterová L.***Národná transfúzna služba SR, Bratislava, pracovisko Košice*

Úvod: Neustále sa rozvíjajúce špecializované odbory kladú v liečebnom procese vysoké požiadavky na hemoterapiu. Spracovateľské centrá NTS SR zabezpečujú dostupnosť hemoterapie v požadovanom množstve a kvalite.

Ciel: Prehľad o expedovaných transfúzných liekoch (TL) zameraných na plazmu čerstvo zmrazenú určenú na hemoterapiu (PČZ) a trombocytové koncentráty (TK) na NTS SR v Košiciach.

Metódy: Štatistické údaje expedovaných transfúzných liekov z informačného systému Rubín V2 v rokoch 2013–2017.

Výsledky: Zisťujeme pokles výdaja PČZ a stúpajúci trend výdaja TK za posledných 5 rokov. Podávame prehľad o expedovaných transfúzných liekoch na našom pracovisku s dôrazom na klesajúci počet expedovanej PČZ a rastúci počet TK pre odberateľov Košického kraja.

Záver: V rokoch 2013–2017 sme zaznamenali zvýšený nárast výdaja TK a pokles výdaja PČZ pre Košický kraj. Z doterajšieho sledovania zisťujeme, že výdaj TK oproti PČZ môže mať v budúcnosti narastajúci charakter, prípadne sa ich výdaj oproti PČZ nezníži. Štatistické vyhodnocovanie je dôležitou súčasťou pri príprave TK a PČZ.

OŠETŘOVATELSTVÍ

P108

APLIKACE RŮSTOVÝCH FAKTORŮ

Majdyšová H., Wolfová M.

Klinika hematooknologie FN, Ostrava

Růstový faktor je látka, která stimuluje růst granulocytů (typ leukocytů), a tím zvyšuje jejich počet. Leukocyty, jinak také bílé krvinky, jsou zodpovědné za fungování složky imunitního systému. Růstový faktor se využívá zejména v onkologii a hematooknologii. Chemoterapie zabíjí nejen nádorové buňky, ale právě taky leukocyty. Důsledkem nízkého počtu leukocytů pacienti ztrácí imunitu, dostávají se do neutropenie, tzn. nedostatek určité skupiny bílých krvinek (neutrofilů), což je život ohrožující stav. Růstový faktor je určen také pro pacienty indikované k autologní transplantaci kmenových buněk. U různých typů chemoterapie lékaři přesně vědí, kdy pacientovi budou leukocyty klesat, a proto ordinují pacientům aplikaci růstového faktoru na přesný den po podání chemoterapie. Nebo přesné dny před sběrem kmenových buněk. Proto si pacient musí umět aplikovat injekci růstového faktoru sám doma, nebo mu ho musí aplikovat rodina. Naším cílem je shrnout všechny základní informace o růstovém faktoru jako takovém a o samotné aplikaci injekce včetně fotografického návodu. Věříme, že to ulehčí edukaci a pacienti si budou moci informace podané sestrou osvěžit přečtením a na fotografiích názorně uvidí správnou aplikaci injekce.

P109

VZDÁLENÉ MONITOROVÁNÍ HEMATOONKOLOGICKY NEMOCNÝCH

Skořupová M.¹, Mihalyová Fečková J.^{1,2}, Hájek R.^{1,2}

¹Klinika hematooknologie FN, Ostrava

²Lékařská fakulta OU, Ostrava

Úvod: Pacienti s hematookologickým onemocněním podstupují intenzivní léčbu chemoimunoterapií, která je spojená s rozvojem febrilní neutropenie a infekčních komplikací. Tyto komplikace někdy končí

závažným septickým stavem vyžadujícím hospitalizaci. Telemedicína je jednou z možností, jak sledovat aktuální zdravotní stav pacientů v domácím prostředí.

Cíle: Zjistit, zda telemedicinský monitoring umožní včasné zachytit rozvíjející se septický stav a zda včasná hospitalizace sníží náklady na léčbu.

Metody: Do pilotního projektu je zapojeno celkem deset pacientů s chronickou lymfocytární leukémií a mnohočetným myelomem. Každý pacient je vybaven tlakoměrem MD2020 a bezkontaktním teploměrem Rycom se zabudovaným bluetooth zařízením. Pacienti si měří krevní tlak – TK, tepovou frekvenci – TF a tělesnou teplotu – TT každých 8 hodin. Prostřednictvím bluetooth zařízení, mobilního i stacionárního HUBu se naměřené hodnoty přenášejí do zabezpečeného portálu Národního dohledového centra (NDC). O překročení nastavených limitů (TK > 180/90 nebo TK < 90/50 mm Hg, TT > 38 °C, TF > 130 nebo TF < 40/min) je lékař informovaný prostřednictvím SMS nebo e-mailem. Lékař následně vyhodnotí zaznamenané hodnoty a v případě potřeby kontaktuje pacienta.

Výsledky: Během tříměsíčního sledování bylo u tří pacientů naměřených 26 kritických hodnot TK. Ve většině případu se jednalo o hypertenzi (TK > 180/90), menší část alarmů signalizovala naměřený TK < 90/50. Kritická hodnota tělesné teploty (TT > 38 °C) byla zaznamenaná v devíti případech u tří pacientů. Ani u jednoho pacienta s TK > 180/90 nebyla při opakovaném měření s hodinovým odstupem zaznamenaná kritická hodnota TK. Pacienti s TT > 38 °C byli hemodynamicky stabilní (ani u jednoho pacienta jsme souběžně nezachytili TT > 38 °C a TF > 90 a/nebo TK < 90/50). Ve třech případech byli pacienti informováni o užití antipyretické medikace, jeden pacient byl indikovaný k léčbě antivirotiky pro nový výsev herpes genitalis. Ve dvou případech byly febrilie doprovodným příznakem infekce horních cest dýchacích. Hospitalizace nebyla indikovaná ani u jednoho pacienta.

Závěr: Telemedicína a telemonitoring nabízejí lékařům možnost kontinuálního sledování TK, TT, TF v domácí péči. Pacient v ambulantním režimu léčby je v nižším riziku nákazy multirezistentními nozokomiálními kmeny a má lepší kvalitu života. V případě časně zachycených infekčních komplikací může telemedicína přispět ke snížení léčebných nákladů.

Pilotní projekt je podpořen Nadačním fondem Domácí anděl.

P110

VLIV TECHNIKY OŠETŘOVÁNÍ MÍSTA ZAVEDENÍ CENTRÁLNÍHO ŽILNÍHO KATÉTRU NA VÝSKYT INFEKCE

Hašová K.¹, Horáková K.¹, Vilímková A.¹, Zoubková R.²

¹Klinika hematologie FN, Ostrava

²KARIM FN, Ostrava

Úvod: Cílem projektu je hodnocení techniky ošetřování místa zavedení CŽK s využitím hydrofilního metakrylátového gelu a 2% chlorhexidinu na frekvenci vzniku zánětlivých komplikací při ošetřování okolí centrálního žilního katétru. V dubnu 2016 tým získal institucionální podporu MZ ČR – RVO-FNOs/2016.

Metody: Prospektivní randomizovaná studie byla prováděna na lůžkovém oddělení KARIM FN Ostrava a na JIP Kliniky hematologie (KHO) FN Ostrava.

Výsledky: Celkový soubor představovalo 221 respondentů, z toho z JIP KHO 113 a z KARIM 108. Ve sledované skupině s hydrofilním metakrylátovým gelem (KHO a KARIM) bylo 124 pacientů (100 %), 28 pacientů mělo během sledování skóre 1 a vyšší (23 %). V kontrolní skupině s transparentní fólií s chlorhexidin glukonátem (KHO a KARIM) bylo 97 pacientů (100 %), 13 pacientů (13 %) mělo skóre 1 a vyšší během sledování. Nejednalo se o statisticky významný rozdíl ($p = 0,084$). Na KHO ve sledované skupině s hydrofilním metakrylátovým gelem bylo 60 pacientů (100 %), ke změně skóre na 1 a vyšší došlo u 25 pacientů (42 %). V kontrolní skupině s CHG bylo 53 pacientů (100 %). Ke změně skóre na 1 a vyšší došlo u deseti pacientů (19 %). Na KHO byl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi sledovanou se skupinou hydrofilním metakrylátovým gelem a kontrolní skupinou s CHG ($p = 0,009$). Na KARIM ve sledované skupině s hydrofilním metakrylátovým gelem bylo 64 pacientů (100 %), ke změně skóre na 1 a vyšší došlo u tří pacientů (5 %). V kontrolní skupině s CHG bylo 44 pacientů (100 %), ke změně skóre na 1 a vyšší došlo u tří pacientů (7 %). Na KARIM nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi sledovanou skupinou s hydrofilním metakrylátovým gelem a kontrolní skupinou s CHG ($p = 0,686$). U transparentní fólie s CHG se míra incidence pohyboval na 13,0 příznaků zánětu na 1000 paciento-dnů, u hydrofilního metakrylátového gelu to bylo 26,8 příznaků zánětu na 1000 paciento-dnů. IRR = 0,486 (95% CI 0,231–0,969) vyjadřuje, že výskyt příznaků zá-

nětu je přibližně u transparentní fólie s CHG poloviční proti hydrofilnímu metakrylátovému gelu a jedná se o statisticky významný vztah ($p = 0,0282$).

Závěr: Technika ošetřování místa zavedení centrálního žilního katétru pomocí hydrofilního metakrylátového gelu se neosvědčila. U pacientů z KHO docházelo k významnému nárůstu lokálních známek zánětu v okolí místa zavedení centrálního žilního katétru. Byl prokázán projektivní charakter transparentní fólie s chlorhexidin glukonátem.

P111

OŠETŘOVATELSKÁ PÉČE O PACIENTA PO AUTOLOGNÍ TRANSPLANTACI

Křáková L., Miková V.

Hematoonkologická klinika FN, Ostrava

Autologní transplantace je převod vlastní krevtvořné tkáně pacienta. Liší se od transplantací solidních orgánů tím, že se nejedná o chirurgickou operaci. Transplantace je složena z několika fází: aplikací chemoterapie, mobilizací, sběru krevtvořných buněk, vysokodávkové chemoterapie, převodu krevtvořných buněk a posttransplantační péče. Jedna z prvních fází obnáší podání chemoterapie, která má nejen účinek protinádorový, ale i tzv. stimulační. Poté jsou aplikovány G-CSF, tzv. růstové faktory ve formě s.c. injekcí, které jsou nezbytné pro vyplavení krevtvořných buněk. Mnohdy je potřeba, aby si pacient aplikoval růstové faktory v domácím prostředí a je potřeba edukace ze strany ošetřující sestry. Vlastní sběr krevtvořných buněk je prováděn tzv. separátorem. Dle množství odebraných kmenových buněk může separace trvat 4 hodiny po dobu několika dnů. Po úspěšném sběru následuje do několika týdnů aplikace vysokodávkové chemoterapie. Do 24 hodin probíhá autologní transplantace nasbíraných krevtvořných buněk. Aplikace krevtvořných buněk je z celého procesu samotné transplantace nejméně náročná. Pacientovi se připravené buňky aplikují do centrálního nebo periferního žilního vstupu. Posttransplantační období může být doprovázeno různými komplikacemi. Mezi časté komplikace můžeme zařadit např. nevolnosti, zvracení, mukozitidu, febrilní neutropenie a sepse. Posttransplantační období je nejkritičtější obdobím z hlediska důsledného dodržování hygienických režimů ze strany personálu, ale i pacienta.

POSTEROVÁ SEKCE

P112**SPOLEK HAIMA CZ POMÁHÁ JIŽ 27 LET****Blodek J.¹, Reichlová V.^{1,2}, Ipserová D.¹, Lukš A.^{1,2}**¹Haima CZ, z.s.²Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol, Praha

HAIMA CZ vznikla v roce 1991 na tehdejší II. dětské klinice FN Motol v Praze jako sdružení rodičů léčených pacientů s cílem zlepšit podmínky léčených dětí, podpořit jejich rodiče, zajistit pomoc psychologa a usnadnit vyléčeným pacientům návrat do běžného života. Sdružení se pak rozšířilo i do dalších léčebných center v ČR, kde dnes působí samostatné organizace. Aktuálně HAIMA CZ pořádá pro děti pravidelné zimní a letní

rekondiční pobyty, které přispívají nejen ke zlepšení fyzické kondice, ale podporují i znovuzачlenění dětí do kolektivu po dlouhé a náročné léčbě. Již pravidelně každý rok organizuje Den dětské onkologie (www.dendetskeonkologie.cz), kterého se účastní vyléčení pacienti ze všech léčebných center v ČR, a připojuje se tak k celosvětovému projektu šíření povědomí o dětské onkologii, podpoře, solidaritě a úctě k vyléčeným a jejich rodinám. Uskutečňuje také další krátkodobé akce pro děti a jejich rodiče, kde se navíc mohou setkat vyléčení pacienti. Vydává a aktualizuje několik edukačních brožur s informacemi pro pacienty i rodiče, např. „Knižka pro rodiče“, nebo „Jak bylo Já a Hele nemocné“. Tyto materiály dodává i do dalších léčebných center dětské hematologie v ČR.

PODPŮRNÁ A PALIATIVNÍ LÉČBA

P113

VYUŽITÍ DETEKCE 1,3-BETA-D-GLUKANU ZE SÉRA A BAL PRO DIAGNOSTIKU INVAZIVNÍCH PLICNÍCH INFEKČÍ U HEMATOLOGICKÝCH PACIENTŮ

Weinbergerová B.¹, Palacková M.¹, Kocmanová I.^{1,2}, Lengerová M.^{1,3}, Mayer J.^{1,3}, Ráčil Z.^{1,3}

¹Interní hematologická a onkologická klinika LF MU a FN, Brno

²Oddělení klinické mikrobiologie FN, Brno

³CEITEC – Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno

Cíle: Invazivní mykotické infekce (IMI) představují život ohrožující infekční komplikace u hematologických pacientů a jejich časná diagnostika může přispět ke zlepšení celkového přežívání těchto nemocných. Cílem práce bylo zhodnocení významu detekce 1,3-beta-Dglukanu (BDG) v séru a BAL pro diagnostiku plicních IMI (PIMI) u hematologických pacientů.

Metody: Provedli jsme retrospektivní analýzu vyšetření BDG-294 BAL a 286 sér – u hematologických pacientů s patologickým nálezem na HRCT plic a provedeným BAL na našem pracovišti v letech 2006–2015. Navíc jsme hodnotili faktory s možným vlivem na

senzitivitu metody (neutropenie, antimykotická léčba a jiné). Případy invazivní zygomykózy a pneumocystové pneumonie byly z analýzy vyloučeny.

Výsledky: Celkem bylo dokumentováno 26 (8,8 %) případů prokázaných a pravděpodobných IMI podle kritérií EORTC/MSG z roku 2008 (96,2 % invazivních aspergilóz). Senzitivita (SEN), specifita (SPE), pozitivní a negativní prediktivní hodnota (PPV a NPV) metody stanovení BDG z BAL a séra při použití cut-off 80 pg/ml byly srovnatelné (BAL: 57,7 %, 82,3 %, 34,9 % a 92,2 %; sérum: 50,0 %, 82,1 %, 32,5 % a 90,5 %). Případy s antimykotickou léčbou s efektem na vláknité plísňe podávanou ≥ 1 den před BAL prokázaly nižší SEN vyšetření BDG v BAL i séru oproti případům bez antimykotické léčby (BAL: 52,4 % léčení vs. 66,7 % neléčení; sérum: 42,9 % léčení vs. 80,0 % neléčení).

Závěr: Zjistili jsme akceptovatelnou SEN, avšak nízkou PPV, vyšetření BDG v BAL a séru pro diagnostiku PIMI u hematologických pacientů. Potvrdili jsme využitelnost stanovení sérového BDG jako screeningové metody pro PIMI. Podávání antimykotické léčby s efektem na vláknité plísňe v době BAL snižují SEN metody BDG v séru i BAL.

Práce byla podpořena CELL, grantem MUNI/A/0968/2017 a grantem MZ ČR – RVO (FNBr 65269705).