

ISSN 0042-773X
ISSN pro on-line přístup 1801-7592

Vnitř Lék 2008; 54(5, Příloha)
on-line na www.vnitrnilekarstvi.cz

Vnitřní lékařství

časopis České internistické společnosti
a Slovenskej internistickej spoločnosti

XXII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí

Olomouc, 28.–30. května 2008

Sborník abstrakt

ročník 54 | květen 2008 | číslo 5 (Příloha)

Indexed in EMBASE/Excerpta Medica, SCOPUS,
MEDLINE/Index Medicus, Bibliographia medica čechoslovaca,
Index Copernicus, Chemical Abstracts, INIS Atomindex



Vnitřní lékařství

číslo 5 (Příloha) • květen 2008 • ročník 54

Vedoucí redaktor

prim. MUDr. Petr Svačina, Brno

Zástupce vedoucího redaktora

prof. MUDr. Ján Murín, CSc., Bratislava

Editor emeritus

doc. MUDr. Dušan Mrkos, CSc., Brno

Redakční rada

prof. MUDr. Zdeněk Adam, CSc., Brno
 prof. MUDr. Ivan Balažovjeh, DrSc., Bratislava
 doc. MUDr. Radan Brůha, CSc., Praha
 prof. MUDr. Richard Česka, CSc., Praha
 prof. MUDr. Petr Dítě, DrSc., Brno
 prof. MUDr. Andrej Dukát, CSc., Bratislava
 prof. MUDr. Jiří Ehrmann, CSc., Olomouc
 doc. MUDr. Jozef Gonsorčík, CSc., Košice
 prof. MUDr. Pavel Gregor, DrSc., FESC, Praha
 prof. MUDr. Karel Horký, DrSc., FACP (Hon.), Praha
 prof. MUDr. Petr Husa, CSc., Brno
 doc. MUDr. Soňa Kiňová, CSc., Bratislava
 prof. MUDr. Jaroslav Malý, CSc., Hradec Králové
 prof. MUDr. Josef Marek, DrSc., Praha
 prof. MUDr. Marián Mokáň, DrSc., FRCP Edin, Martin
 prof. MUDr. Karel Pavelka, DrSc., Praha
 prof. MUDr. Milan Pavlovič, CSc., Bratislava

prof. MUDr. Peter Pontůch, CSc., Bratislava
 prof. MUDr. Anna Remková, Ph.D., Bratislava
 prof. MUDr. Hana Rosolová, DrSc., FESC, Plzeň
 prof. MUDr. Jaroslav Rybka, DrSc., Zlín
 doc. MUDr. František Salajka, CSc., Hradec Králové
 prof. MUDr. Otto Schück, DrSc., Praha
 doc. MUDr. Vladimír Soška, CSc., Brno
 doc. MUDr. Miroslav Souček, CSc., Brno
 prof. MUDr. Sylvie Dusilová Sulková, DrSc., MBA, Hr. Králové
 prof. MUDr. Štěpán Svačina, DrSc., MBA, Praha
 prof. MUDr. Vlastimil Ščudla, CSc., Olomouc
 prof. MUDr. Jan Škrha, DrSc., Praha
 prof. MUDr. Jindřich Špinar, CSc., FESC, Brno
 prof. MUDr. Miloš Štefja, DrSc., FESC, Brno
 prof. MUDr. Eva Topinková, CSc., Praha
 prof. MUDr. Jiří Widimský jr, CSc., Praha



MedicaHealthworld
 An Ogilvy Healthworld Affiliate

© Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, Praha 2008

Vnitřní lékařství

on-line verze časopisu přístupná na www.vnitrnilekarstvi.cz

Vydává Česká lékařská společnost J. E. Purkyně ve spolupráci s Medica Healthworld, a.s.

Vedoucí redaktor prim. MUDr. Petr Svačina, zástupce vedoucího redaktora prof. MUDr. Ján Murín, CSc.

Registrační značka MK ČR E 1202. ISSN 0042-773X. ISSN pro on-line přístup 1801-7592.

Nakladatel: Medica Healthworld, a.s., Media Hall, Bidláky 20, 639 00 Brno,

tel./fax: +420 533 337 311, e-mail: medica@mhw.cz. Odpovědná redaktorka: Mgr. Jana Lounová.

Jazykový redaktor: PhDr. Boris Skalka. Grafická úprava: Medica Healthworld, a.s. – Karel Zlevor.

Vychází 12krát ročně. Předplatné na ročník činí 1 308 Kč (1 731 Sk), jednotlivého čísla pak 109 Kč (144 Sk), pro členy ČLS ČLS JEP nad 35 let 1 000 Kč, ve věku do 35 let včetně je zdarma. Informace o předplatném na rok 2008 podává

a objednávky českých a zahraničních předplatitelů přijímá: Medica Healthworld, a.s.,

e-mail: medica@mhw.cz, informace o podmínkách inzerce v roce 2008 poskytuje a objednávky přijímá:

Medica Healthworld, a.s., Ing. Peter Medvec, e-mail: peter.medvec@mhw.cz.

Rukopisy zasílejte na adresu: prim. MUDr. Petr Svačina, II. interní klinika LF MU a FN u sv. Anny, Pekařská 53, 656 91 Brno.

e-mail: petr.svacina@fnusa.cz

**Česká hematologická společnost ČLS JEP,
Společnost pro transfuzní lékařství ČLS JEP,
Česká asociace sester,
Hemato-onkologická klinika LF UP a FN Olomouc,
Moravská vysoká škola Olomouc
a HAIMAOM,
nadace na podporu transplantace kostní dřeně**

pod záštitou:

rektora UP v Olomouci prof. RNDr. L. Dvořáka, CSc.
děkana LF UP v Olomouci prof. MUDr. Z. Koláře, CSc.
rektora MVŠ Olomouc prof. RNDr. M. Hrabovského, DrSc.
ředitele FN Olomouc MUDr. R. Maráčka
primátora města Olomouce M. Novotného
hejtmana Olomouckého kraje RNDr. I. Kosatíka
náměstkyně hejtmana Olomouckého kraje MUDr. J. Chalánkové

pořádají

XXII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí

XII. Konferenci ošetrovatelských profesí v hematologii

XI. Konferenci zdravotních laborantů v hematologii

1st Symposium on Advances in Molecular Hematology

28.–30. 5. 2008

www.olhemdny.cz

Regionální Centrum Olomouc (RCO)
Jeremenkova 40, Olomouc

Generální partneři:



Hlavní partneři:

AOP Orphan Pharmaceuticals AG
Bayer Schering Pharma
Pfizer

Mediální partneři:

BastArt
Redigy internet
Solen

Partneři:

AstraZeneca Czech Republic, s.r.o.
Baxter Czech s.r.o.
BIOHEM spol. s r.o.
Cephalon
Comesa spol. s r.o.
EXBIO Praha a.s.
Fresenius Medical Care ČR s.r.o.
GAMBRO BCT Europe NV/SA
GlaxoSmithKline s.r.o.
GRIFOLS s.r.o.
Grünenthal Czech s.r.o.

IMMUNOTECH a.s.
MEDESA s.r.o.
Medista, spol. s r.o.
Merck Sharp and Dohme IDEA, Inc.
Montrose Pharma s.r.o.
Mundipharma Ges.m.b.H Austria
Schering-Plough CEAG
Siemens Medical Solution Diagnostics, s.r.o.
Sysmex CZ, s.r.o.
TEVA Pharmaceuticals CR, s.r.o.

Vydání programu a sborníku abstrakt podpořily:



Prezident sjezdu: prof. MUDr. Karel Indrák, DrSc.

Předseda vědeckého výboru: doc. MUDr. Edgar Faber, CSc.

Vědecký sekretář pro transfúzní problematiku: prim. MUDr. Dana Galuszková

Vědecký výbor: E. Bystřická, J. Čermák, V. Divoký, E. Faber, D. Galuszková, J. Haber, R. Hájek, A. Hluší, K. Indrák, J. Indráková, M. Jarošová, V. Kajaba, V. Koza, T. Kozák, V. Maisnar, P. Malý, T. Papajík, M. Penka, L. Raida, V. Řeháček, J. Starý, V. Ščudla, J. Ščudlová, J. Trka, J. Vondráková, P. Žák

Předseda organizačního výboru: MUDr. Tomáš Papajík, CSc.

Organizační výbor: V. Divoký, E. Faber, P. Hlídková, A. Hluší, M. Hofmanová, J. Hubáček, K. Indrák, J. Indráková, M. Jarošová, V. Kajaba, T. Papajík, Z. Pikalová, T. Sotkowski, J. Ščudlová, L. Štursová

Čestné předsednictvo:

prof. RNDr. Lubomír Dvořák, CSc., *rektor Univerzity Palackého v Olomouci*

prof. MUDr. Zdeněk Kolář, CSc., *děkan Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci*

MUDr. Radomír Maráček, *ředitel FN Olomouc*

doc. MUDr. Jaroslav Čermák, Ph.D., *předseda České hematologické společnosti ČLS JEP*

doc. MUDr. Tomáš Lipšic, CSc., *předseda Slovenskej hematologickej a transfúziologickej spoločnosti*

MUDr. Vít Řeháček, CSc., *předseda Společnosti pro transfúzní lékařství ČLS JEP*

doc. MUDr. Václav Rýznar, CSc., MBA, *vedoucí odboru zdravotnictví KÚ Olomouckého kraje*

MUDr. Jaroslav Imrych, *předseda OS ČLK v Olomouci*

Erik Aerts, RN, MSc., *President European Group for Blood and Marrow Transplantation – Nurses Group*

Obsah

Symposium on Advances in Molecular Hematology – Myeloid Malignancies	P5
Varia	P7
Mnohočetný myelom 1	P10
Symposium on Advances in Molecular Hematology – Lymphoid Malignancies	P13
Akutní leukemie/MDS	P16
Mnohočetný myelom 2	P20
Symposium on Advances in Molecular Hematology – Stem Cells	P24
Anémie	P26
Transplantace krvetvorných buněk	P29
NHL 1	P33
Konference nelékařských profesí 1	P36
Experimentální hematologie	P38
NHL 2	P41
Konference nelékařských profesí 2	P44
Konference zdravotních laborantů 1	P46
CLL 1	P49
Transfuzní lékařství	P51
Konference zdravotních laborantů 2	P54
CLL 2	P56
CML/MPO	P59
Postery	P62
Sdělení přijatá pouze k publikaci	P91
Rejstřík autorů	P93

XXII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí

XII. Konference ošetrovatelských profesí v hematologii

XI. Konference zdravotnických laborantů v hematologii

1st Symposium on Advances in Molecular Hematology

Olomouc, 28.–30. 5. 2008

Sborník abstrakt

SYMPOSIUM ON ADVANCES IN MOLECULAR HEMATOLOGY – MYELOID MALIGNANCIES

1341

Heterogeneity of myeloproliferative disorders: genetic basis, clonal complexity, and implications for therapy

R. Jäger, D. Olcaydu, T. Berg, H. Gisslinger, R. Kralovics
*Center for Molecular Medicine, Austrian Academy of Science
Vienna, Austria; Department of Internal Medicine I, Medical
University of Vienna, Vienna, Austria*

A number of oncogenic somatic mutations have been identified in myeloproliferative disorders (MPD) in the past few years. Among these JAK2-V617F is the most frequent, followed by mutations of the thrombopoietin receptor (MPL-W515L, MPL-W515K) and JAK2 exon 12 mutations. In addition, deletions on chromosomes 20q (del20q) occur frequently in MPD and other myeloid malignancies. To explore the genetic aberrations present in MPD patients at higher resolution than offered by classic cytogenetics, we performed microarray karyotype analysis in a series of patients with variable presence of JAK2 and MPL mutations. About half of the analyzed patients exhibited loss of heterozygosity (LOH) in at least one chromosomal region. Several patients had complex karyotypes with two and more regions with LOH. Uniparental disomy on chromosomes 9p, 1p, and 14q represented the largest proportion of LOH detected followed by deletions on chromosome 13q, 20q, 12p, and 7q. To validate the presence of these defects, we performed LOH analysis in a cohort of 400 MPD patients and determined the frequency of these aberrations. The presence

of genetic markers (LOH) in individual patients offers an opportunity to decipher the clonal composition of the stem/progenitor and terminally differentiated cell compartments. To determine the clonal composition of progenitor cells, we genotyped individual clones of BFU-Es and CFU-GMs in a series of 20 patients. We observed a remarkable clonal heterogeneity at the progenitor cell level. The presence of clonal heterogeneity in MPD has profound implications for therapeutic strategies since development of therapy resistance may simply be a matter of selection of clones least susceptible for myelosuppressive effects of drugs. In fact, we observed changes in the clonal composition of patients treated with interferon alpha. In one patient a selection of a clone positive for del20q and homozygous for MPL-515L was observed and linked to acquisition of interferon alpha resistance. In summary, our results provide evidence of the genetic heterogeneity of MPD and demonstrate how this heterogeneity affects the outcome of myelosuppressive therapy.

1342

The role of JAK2-V617F oncogenic mutation in thrombosis associated with myeloproliferative disorders

A. Strehl, D. Olcaydu, H. Gisslinger, R. Kralovics
*Center for Molecular Medicine, Austrian Academy of Science
Vienna, Austria; Department of Internal Medicine I, Medical
University of Vienna, Vienna, Austria*

Thrombosis is the most frequent complication in myeloproliferative disorders that impairs quality of life and contributes to mortality and morbidity of patients. The molecular basis of thrombosis in MPD remains unclear.

Polymorphisms in coagulation factors (FII-G20210A, FV-Leiden) and the V617F mutation of JAK2 gene (JAK2-V617F) have previously been shown to associate with thrombosis in MPD. To address the clinical significance of JAK2-V617F in MPD thrombosis we studied patients with the diagnosis of essential thrombocythemia (ET; N = 94) and polycythemia vera (PV; N = 122) retrospectively observed for clinical variables such as venous and arterial thrombosis, stroke, myocardial infarction, deep vein thrombosis (DVT), bleeding, angina pectoris, superficial venous thrombosis (SVT), and pulmonary embolism. In ET, JAK2-V617F showed significant correlation with the presence of DVT (OR 10.08; 95% CI 1.15–88.49; P = 0.01) whereas in PV JAK2-V617F mutational load did not associate with thrombosis. JAK2-V617F can contribute to thrombotic risk (i) indirectly through altering the blood count of patients or (ii) directly through alterations of platelet function or (iii) both. However, we did not observe influence of platelet and leukocyte counts and hematocrit on thrombosis in ET. To explore the second mechanism, we examined the *ex vivo* platelet function in transgenic mice expressing the human JAK2-V617F in platelets. We observed a mild hypersensitivity to ADP and thrombin of platelets expressing JAK2-V617F compared to controls. This effect is due to an intrinsic mechanism since platelet glycoprotein surface expression was not affected by JAK2-V617F. Furthermore we show that a small molecule inhibitor of JAK2 suppresses ADP induced aggregation in normal human platelets in a dose dependent manner suggesting the involvement of JAK2 kinase in an G protein coupled receptor pathway (P2Y1 or P2Y12). Our results indicate that JAK2-V617F is a thrombophilic mutation that significantly contributes to thrombotic risk in ET most likely by interfering with platelet function through an as yet unknown biochemical mechanism.

1334

Aberrant Expression of MicroRNAs in Myeloproliferative Disorders

H. Bruchová, M. Merkerová, J. T. Prchal

Ústav hematologie a krevní transfúze Praha; School of Medicine, University of Utah Salt Lake City, USA; Ústav patologické fyziologie 1. lékařské fakulty UK Praha

Polycythemia vera (PV) is a clonal hematopoietic stem cell disorder in which the JAK2-V617F mutation is observed in > 95 % of patients, but an as yet unidentified process appears to initiate the clonal expansion of hematopoiesis. Because microRNAs (miRNAs) regulate hematopoietic differentiation, we hypothesized that dysregulated expression of miRNAs may contribute to pathophysiology of PV cells. We performed gene expression profil-

ing in 5 PV patients and 5 controls using CombiMatrix MicroRNA CustomArray. ANOVA identified deregulated miRNAs in PV, and their expression was studied in a larger set of samples by qRT-PCR. The expression of these miRNAs was also analyzed in other myeloproliferative disorders (MPDs). We observed down-regulation of let-7a and up-regulation of miR-182 in PV granulocytes, up-regulation of miR-143, miR-145 and miR-223 in PV mononuclear cells, up-regulation of miR-26b in PV platelets, and down-regulation of miR-30b, miR-30c and miR-150 in PV reticulocytes. Correlation of miRNA expression with JAK2-V617F frequency showed positive correlation with miR-143 and negative correlation with let-7a, miR-30c, miR-342 and miR-150. Transcript level of predicted target genes was determined, and over-expression of IRAK2 was detected in all MPD granulocytes and in PV reticulocytes. Abnormally high HMGA2 mRNA was found in myelofibrosis granulocytes. Our study demonstrates differential expression of miRNAs in peripheral blood cells from MPD patients compared to controls. Our findings of aberrant expression support the concept that the dysregulation of miRNAs may contribute to the pathogenesis of MPD.

Supported by 1P01CA108671-O1A2; R01HL50077-11 and NR/9236-3 IGA MZD CR.

1325

Achilles' Heel of Therapy – Resistant Leukemia Cells: from Proteomics to Molecular Targets for Elimination of Receptor-Mediated Apoptosis Resistant Cells

T. Šimonová, O. Toman, P. Halada, M. Hůlová, J. Molinský, P. Klener jr, J. Petrák, J. Živný

Ústav patologické fyziologie 1. lékařské fakulty UK, Praha; Ústav hematologie a krevní transfúze Praha; Ústav mikrobiologie Akademie věd České republiky, Praha

Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) has drawn interest as a new potential anti-tumor drug. TRAIL induces apoptosis in most cancer cells by a receptor-mediated apoptotic pathway. Development of resistance to anti-cancer drugs is the major complication of any chemotherapy. We used proteomic approach to identify „weak spots“ of the TRAIL-resistant cells that could serve as potential molecular targets for their selective elimination. We derived two phenotypically distinct TRAIL-resistant cell subclones, P1 and P2 from a population of TRAIL sensitive HL60 myeloid leukemia cells. The expression profiles of TRAIL-sensitive and TRAIL-resistant HL60 cells were compared using two-dimensional, polyacrylamide gel electrophoresis in combina-

tion with mass spectrometry (2D-PAGE/MS). We identified approximately 50 differentially expressed proteins in P1 and P2 TRAIL-resistant subclones compared to TRAIL-sensitive HL60 leukemia cell line. We focused our attention to two-fold expression decline of two proteins essential for replication and DNA repair in P1 cells and more than six-fold decreased expression of adenosine deaminase in P2 cells. We hypothesized that decline of DNA repair/replication proteins, MCM7 and RPA7, can make the TRAIL-resistant P1 cells vulnerable to etoposide and partial deficiency of adenosine deaminase can make the TRAIL-resistant P2 cells vulnerable to adenosine or vidarabine. We tested these hypotheses in series of *in vitro* experiments, using proliferation and apoptosis assay, with TRAIL-sensitive HL60 cells, P1 and P2 TRAIL-resistant HL60 subclones exposed to increasing doses of adenosine, vidarabine, and etoposide. Both hypotheses were confirmed, P1 cells are highly vulnerable to etoposide, whereas P2 cells are significantly more sensitive to adenosine or vidarabine, compared to TRAIL-sensitive cells and the other TRAIL-resistant subclone. We used conventional proteomic approach to identified molecular targets for elimination of TRAIL-resistant leukemia cells. Proteomics-based hypotheses were successfully tested and confirmed in cell assays.

Supported by MZCR/UHKT 023736, LC06044, MSM 0021621806, and IGA MZ NR8317, NR8930.

1340

Immunomodulatory effects of novel tyrosine kinase inhibitors

S. Mustjoki

Department of Medicine – Div. Hematology, Helsinki University Central Hospital Helsinki, Finland

Tyrosine kinases are a large group of enzymes which have a pivotal regulatory role in the growth and differentiation of all normal cells in the human body. Targeted inhibition of the oncogenic BCR-ABL tyrosine kinase by small-molecule inhibitors (TKI) has profoundly changed therapy of chronic myeloid leukemia (CML). Imatinib is well tolerated and has few significant side-effects, as it predominantly only targets cells with the mutated kinase. However, the inhibition profile of many 2nd generation TKIs is much broader and includes kinases not inhibited by imatinib. This may be therapeutically advantageous, but as long-term effects on normal cells are largely unknown, significant side-effects may emerge. Dasatinib, for example, inhibits Src kinases, which have important function in immunology. We have recently

observed a massive clonal expansion of cytotoxic LGL (large granular lymphocyte) cells in blood of several CML and acute lymphoblastic leukemia patients during dasatinib therapy. A detailed analysis of our patient material showed that LGL lymphocytosis is a massive clonal expansion of cytotoxic T- or NK-cells, which occurs predominantly in patients carrying the HLA A2 allele. In addition, the data indicated that the expansion of immune effector cells was linked to autoimmune reactivity (“LGL-versus-host”), such as colitis or pneumonitis, as accumulation of clonal T/NK-cells was also observed in the respective target organs. Furthermore, several patients with advanced, poor prognosis leukemia achieved long-lasting complete molecular responses to dasatinib, thus strongly suggesting an antitumor effect of the cytotoxic cells (“LGL-versus-leukemia”). By inhibiting non-BCR-ABL kinases in immune effector cells, dasatinib may induce a reversible state of autoimmune reactivity resulting in host organ damage and in enhanced anti-leukemic control, both driven by cytotoxic T/NK LGL cells. Dasatinib-induced lymphocyte expansion has also broader significance in the field of oncology. It shares striking similarities with LGL leukemia, which is a distinct, rare disease entity with close links to autoimmune phenomena and an unknown molecular pathogenesis. We postulate, that dasatinib could be a valuable tool in uncovering the pathogenesis of LGL lymphoproliferation, putatively related to loss of function mutations in kinases targeted by the drug.

VARIA

1326

Doporučené postupy v léčbě invazivních mykóz

J. Haber, Z. Ráčil

I. interní klinika hematologie 1. lékařské fakulty UK a VFN Praha; Interní hematologická klinika Lékařské fakulty MU a FN Brno, pracoviště Bohunice

Na základě klinických studií založených na důkazech došlo k rozšíření možností léčby invazivních mykóz. Antimykotikem 1. volby léčby invazivní aspergilózy zůstává nadále vorikonazol, 2. linie je vedle ABLC a kaspofunginu rozšířena o posakonazol. Volba antimykotika 1. linie léčby invazivní kandidózy a kandidemie záleží na klinickém stavu nemocného; v těžších případech jsou lékem volby echinokandiny (kaspofungin a nově anidulafungin, micafungin), ev. lipidové formy amfotericinu B (ABLC). Flukonazol je vyhrazen pro „stabilizované“ pacienty.

1210

Významná slizniční toxicita v oblasti dutiny ústní v rámci alogenních transplantací krvetvorných buněk po nemyeloablativní přípravě fludarabinem a melfalanem

S. Vokurka, J. Škardová, K. Steinerová

Hematologicko-onkologické oddělení FN Plzeň

Úvod: Alogenní transplantace krvetvorných buněk s redukováným nemyeloablativním přípravným režimem jsou vhodnou alternativou pro starší a předléčené pacienty z důvodu celkově nižší toxické zátěže. Mukozitida dutiny ústní (MDÚ) jako charakteristická komplikace transplantací s klasickou neredukovanou myeloablativní přípravou však bývá pozorována také u pacientů po nemyeloablativní přípravě s fludarabinem a melfalanem (Flu/Mel).

Cíl: Ověřit a porovnat výskyt a charakteristiky MDÚ po alogenní transplantaci krvetvorných buněk s nemyeloablativní přípravou Flu/Mel a po myeloablativní Bu/CY2 (\pm ATG).

Metodika: Prospektivní sledování parametrů MDÚ – výskyt, tíže, nástup a trvání. Hodnocení tíže MDÚ dle WHO kritérií. Porovnání charakteristik souborů s využitím Mannova-Whitneyova, Fisher a t-test (GraphPad InStat, Statistica Software).

Soubor: V době od ledna roku 2005 do prosince roku 2007 bylo zařazeno 71 pacientů alogenně transplantovaných po přípravě Flu/Mel (fludarabin 30 mg/m²/den v den -5 až -2, melfalan 140 mg/m²/den v den -1) a 32 pacientů s přípravou Bu/CY2/ \pm ATG (busulfan 4 mg/kg/den v den -9 až -6, cyklofosfamid 60 mg/kg/den v den -5 až -4).

Výsledky: Flu/Mel vs Bu/CY2/ \pm ATG: věk medián 56 (23–68) vs 37 (20–68; $p = 0,0001$), pohlaví ženy 49 % vs 41 % ($p = 0,5$), dárce HLA identický 79 % vs 71 % ($p = 0,45$), obsah CD34+ buněk ve štěpu 4,9 (1,6–15,2) vs 5,0 (2,2–22,8; $p = 0,97$), rozvoj a přítomnost MDÚ 88 % vs 97 % ($p = 0,01$), MDÚ st. 3–4 dle WHO 43 % vs 41 % ($p = 0,65$), maximální stupeň tíže MDÚ medián 2 (1–4) vs 2 (1–4; $p = 0,51$), výskyt rozvoj MDÚ po transplantaci od dne 6 (2–10) vs 5 (2–13; $p = 0,21$), MDÚ trvání dní 12 (1–34) vs 10 (2–31).

Závěr: MDÚ po nemyeloablativní přípravě Flu/Mel se ve srovnání s klasickou myeloablativní přípravou Bu/CY (\pm ATG) vyskytuje sice signifikantně méně, nicméně klinicky je její četnost velmi významná. Základní charakteristiky MDÚ ve smyslu její tíže a trvání jsou pak prakticky srovnatelné v obou skupinách.

Diskuse: S ohledem na postižení sliznic dutiny ústní nelze alogenní transplantaci s redukovánou nemyeloablativní přípravou Flu/Mel považovat za málo zatěžující.

1178

Použití rituximabu v terapii refrakterní autoimunní trombocytopenie: vlastní zkušenosti

A. Hluší, T. Papajík, T. Szotkowski, J. Vondráková, R. Zbořilová, L. Starostová, V. Krčová

Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc

Úvod: Standardní imunosupresivní postupy nejsou při léčbě pacientů s autoimunitní trombocytopenií u části pacientů efektivní. Terapie těchto refrakterních pacientů pak představuje významný medicínský problém. V posledních letech přibývá pozitivních zkušeností s použitím monoklonální protilátky anti-CD 20 (rituximab) u této skupiny nemocných. Efekt rituximabu je přičítán B-buněčné depleci a eliminaci autoreaktivního klonu. V odborných doporučeních se indikace k podání rituximabu přesouvá mezi standardně užívané léky.

Soubor pacientů: Analyzujeme výsledky terapie rituximabem v souboru 15 pacientů s autoimunitní refrakterní trombocytopenií. U 9 případů se jednalo o idiopatickou trombocytopenickou purpuru (ITP), u zbylých 6 pacientů šlo o sekundární autoimunitní trombocytopenii při B-CLL. Ve všech případech šlo o nemocné dříve léčené několika modalitami imunosupresivní terapie včetně splenektomie. U 2 pacientů byla léčba rituximabem pro recidivu trombocytopenie aplikována 2krát.

Metoda: Nemocní byli léčeni rituximabem (MabThera) v dávce 375 mg/m² intravenózně s plánem podání 4 cyklů v týdenních intervalech. Hodnocena je léčebná odezva, doba do odezvy, délka jejího trvání a tolerance léčby.

Výsledky: U 4 podání rituximabu byla dosažena kompletní remise (CR, Tr > 100 × 10⁹/l) s průměrným trváním 14,5 měsíce, u 4 podání bylo dosaženo parciální remise (PR Tr > 50 × 10⁹/l) s průměrným trváním 2 měsíce, u 4 bylo dosaženo minimální odezvy (MR, vzestup Tr nad výchozí hodnoty, ale Tr < 50 × 10⁹/l), u 5 podání nebyl efekt pozorován. Průměrná doba do dosažení odezvy byla 3,75 týdne. V 1 případě došlo při anamnéze ICHS ke vzniku infarktu myokardu v den aplikace léku a CR bylo dosaženo jednou aplikací, u 1 pacienta došlo při anamnéze silné imunosupresivní předléčenosti ke vzniku mozkového abscesu. U ostatních subjektů byla tolerance léčby velmi dobrá.

Závěr: Naše zkušenosti potvrzují dobrý terapeutický potenciál rituximabu u pacientů s autoimunitní trombopénií rezistentních na předchozí imunosupresivní terapii.

1198

Monitorování terapie antagonisty ADP receptoru (P2Y12) průtokovou cytometrií u pacientů s koronárním syndromem před plánovanou perkutánní koronární intervencí

I. Marinov, Z. Močovská, I. Marešová, P. Paličková, L. Pučeliková, J. Pauerová, A. Luxová

Ústav hematologie a krevní transfuze Praha; III. interní kardiologická klinika 3. lékařské fakulty UK a FN Královské Vinohrady Praha

Úvod: K minimalizaci trombotických komplikací po perkutánní koronární intervenci (PCI) u pacientů s koronárním syndromem (CAD) se používá dvojkombinace klopidogrel (thienopyridin 2. generace) s aspirinem. Efekt klopidogrelu je závislý na dávce a časovém intervalu po aplikaci, navíc vykazuje významnou individuální variabilitu.

Cíl: Stanovit optimální termín podání úvodní dávky klopidogrelu (600 mg) u pacientů s CAD před plánovanou PCI pro maximální inhibici trombocytů, stanovenou průtokovou cytometrií.

Materiál a metody: Monitorování efektu klopidogrelu bylo prováděno flow-cytometrickou analýzou VASP fosforylaci (VASP/P2Y12, Biocytex) stanovením tzv. indexu trombocytární aktivity (platelet reactivity index – PRI). PRI byl stanoven u 25 kontrolních pacientů a 105 pacientů s CAD před a 12, 28, 36, 60, 84 a 108 hod po aplikaci klopidogrelu.

Výsledky: Výchozí (bez aplikace klopidogrelu) PRI je vyšší u pacientů s CAD ve srovnání s kontrolní skupinou ($p = 0,061$). PRI se významně neliší mezi skupinami se stabilní CAD a medikamentózně stabilizovaným NSTEMI akutním koronárním syndromem ($p = 0,74$). Individuální variabilita PRI v kontrolní skupině a skupině pacientů před aplikací léku byla nízká, zatímco významná po aplikaci úvodní dávky klopidogrelu ($p < 0,001$). Klesající trend PRI byl pozorován do 28 hod po aplikaci léku. Významná inhibice trombocytů byla pozorována po 12 hod, kdy 63 % pacientů mělo $PRI < 50\%$ (45,4 %, průměr 44,8 %, 95% CI 40,23–49,41), maximální efekt úvodní dávky byl však pozorován po 28 hod, kdy 2/3 pacientů mělo $PRI < 50\%$ (průměr 36 %, medián 33 %, 95% CI 29–43). Individuální variabilita se časem neměnila (SV 23 %). Inhibice trombocytů po jednotlivé dávce klopidogrelu trvala 4 dny, normalizace PRI ($> 50\%$) byla pozorována 5. den (průměrní PRI po 108 hod – 53,16 %).

Závěr: Stanovení VASP fosforylace průtokovou cytometrií se v současné době jeví metodou volby pro monitorování terapie antagonisty ADP. Efekt jednotlivé, úvodní dávky klopidogrelu (600 mg) se významně projevuje po 12 hod, maximální efekt inhibice trombocytů nastává po 28 hod, aniž by riziko krvácivých projevů přesahovalo riziko vzniku trombotických komplikací.

1226

Vyšetření vybraných funkčních testů primární hemostázy u nemocných s esenciální trombocytémií před zahájením léčby

M. Penka, J. Kissová, A. Buliková, L. Horáková, J. Zavřelová, T. Pavlík, L. Dušek

Oddělení klinické hematologie FN Brno, pracoviště Bohunice; Institut biostatistiky a analýz Lékařské fakulty MU Brno

Úvod: Krvácení a trombóza jsou nejčastějšími symptomy myeloproliferativních chorob, především v případech trombocytémie, ať již esenciální, či provázející další myeloproliferace. Tyto projevy však nejsou závislé jenom na zvýšení počtu krevních destiček, ale na řadě dalších okolností, jako je počet bílých krvinek, vrozená či získaná trombofilní dispozice, nebo naopak sklon ke krvácení z jiných příčin (např. von Willebrandův syndrom). Významný vliv má také souběžná léčba nemocných. Je proto nanejvýše nutné vyšetřit zmíněné nemocné v souvislosti s jejich symptomatologií v širším rozsahu a k němu patří i vyšetření funkčních parametrů destiček.

Metoda: V letech 2004–2007 jsme vyšetřili před zahájením léčby 77 nemocných. Spektrum vyšetření obsahovalo kromě vyšetření počtu krevních destiček i vyšetření agregace dle Borna po indukci ADP, kolagenem, vyšetření PFA-100 (kolagen/epinefrin) a imunocytologické vyšetření destičkových markerů.

Výsledky a interpretace: Průměrná hodnota krevních destiček činila $758,7 \pm 338,7 \times 10^9/l$, průměrná hodnota agregace po ADP $42,53 \pm 27,05\%$ a PFA-100 $338,78 \pm 71,07$ s. U nemocných s počtem destiček přesahujícím $1\,000 \times 10^9/l$ byla zjištěna hodnota agregace $49,42 \pm 24,19\%$ a PFA-100 $170,07 \pm 69,71$ s. Při vyšetření destičkových povrchových znaků nebyly zjištěny patologické hodnoty a nález kolísal v normálních mezích. U nemocných s vyšším počtem destiček jsou funkční defekty vyjádřeny nekonstantně. V každém případě jsou u nemocných s poruchou funkce destiček pozorovány krvácivé projevy častěji (11/20) než u nemocných bez závažnějších změn či celého souboru (20/77)

Závěr: Na základě provedených vyšetření lze konstatovat, že před zahájením léčby jsou zjišťovány funkční změny

destiček, které se mohou podílet na vzniku klinické symptomatologie, především krvácení. K objasnění jejich významu je vhodné jejich další studium.

MNOHOČETNÝ MYELOM 1

1344

Současné postavení zobrazovacích metod v diagnostice a klasifikaci mnohočetného myelomu

V. Ščudla, M. Heřman, M. Mysliveček, J. Hrbek, J. Živná

III. interní klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc; Radiologická klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc; Klinika nukleární medicíny Lékařské fakulty UP a FN Olomouc; Hematologické oddělení nemocnice Hranice

Mezi základní SWOG i IMWG 2003 diagnostická, Durieova-Salmonova stratifikační kritéria i prognostické ukazatele mnohočetného myelomu (MM) patří projevy myelomové kostní nemoci. V současnosti již nelze považovat za „zlatý standard“ pouze klasické vyšetření axiálního skeletu s pomocí konvenční radiografie, i když jde i nadále o screeningové vyšetření u nově diagnostikovaných nemocných. Jeho validita je podstatně vyšší u chronických forem choroby, zejména při detekci osteolytického poškození kalvy a komprese obratlových těl. Výpočetní tomografie (CT) se vyznačuje citlivým zobrazením destruktivních změn v oblasti kompaktní kosti, její slabinou je znázornění kostní dřevě. Doménou vyšetření magnetickou rezonancí (MRI) je časné rozpoznání změn v kostní dřevě, zobrazení struktur páteřního kanálu a průkaz extramedulární, zejména epidurální propagace myelomových mas, k přínosu patří nově i možnost celotělového vyšetření. Výhodou ^{99m}Tc -MIBI scintigrafie je vedle celotělového vyšetření a dobré senzitivity v hodnocení biologické aktivity myelomového procesu i monitorování stupně léčebné odezvy. Význačným pokrokem je FDG-PET/CT vyšetření umožňující celotělovou, a to i extraoseální detekci myelomového procesu, v případě skeletu ještě před rozvojem strukturálních změn, přičemž citlivost a specifitu této hybridní metody zvyšuje současné CT vyšetření. K jejím výhodám patří i možnost monitorování léčebné odezvy včetně progresu či relapsu nemoci. Pro pečlivé vyšetření myelomové kostní nemoci v rámci běžné klinické praxe lze tedy v současnosti doporučit při diagnóze MM kombinaci FDG-PT/CT, RTG vyšetření skeletu a MRI páteře. Podpora IGA NR 9489-3.

1202

Hybridní zobrazování pomocí ^{18}F -FDG PET/CT v diagnostice a sledování nemocných s mnohotným myelomem a monoklonální gamapatií nejistého významu

M. Mysliveček, J. Bačovský, V. Ščudla, E. Buriánková, P. Koranda, J. Minařík

Klinika nukleární medicíny a PET centrum Lékařské fakulty UP a FN Olomouc; III. interní klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc

Cíle: Zhodnotit přínos hybridního zobrazování pomocí ^{18}F -FDG PET/CT v diagnostice a sledování pacientů s mnohotným myelomem (MM) a monoklonální gamapatií nejistého významu (MGNV).

Materiál a metodika: Do studie bylo zařazeno celkem 117 pacientů, 96 s MM a 21 s MGNV. Ze skupiny pacientů s MM bylo 20 nově diagnostikovaných, 66 pacientů bylo vyšetřeno s laboratorním a klinickým podezřením na relaps. Nemocní s MM byli rozděleni do 2 skupin, na asymptomatický myelom (stadium I) a symptomatický myelom (stadium II a III), který vyžadoval chemoterapii. Aktivita onemocnění byla posuzována dle biochemických markerů aktivity, rozsah dle dostupných zobrazovacích metod (konvenční radiografie, ^{99m}Tc -MIBI scintigrafie, MRI). ^{18}F -FDG PET/CT vyšetření bylo prováděno po 6hodinovém lačnění po i.v. aplikaci 400 MBq ^{18}F -FDG/70 kg hmotnosti pacienta. PET/CT nálezy byly hodnoceny jako N (normální), D (difuzní), F-FD (ložiskové nebo ložiskové + difuzní).

Výsledky: Z 20 pacientů s nově diagnostikovaným MM byli 4 ve stadiu I (asymptomatický MM) a 16 ve stadiu II a III (symptomatický MM). Ze 4 pacientů ve stadiu I měli 3 N-typ PET/CT nálezu, 1 F-typ, zatímco z 16 pacientů ve stadiu II a III vykazovalo 14 D a 2 F-FD typ nálezu. PET/CT vyšetření prokázalo o 20 % více lézí ve skeletu než konvenční radiografie. Navíc detekovalo více extramedulárních ložisek (22) než ^{99m}Tc -MIBI (3). U nemocných vyšetřovaných s podezřením na relaps potvrdila PET/CT relaps v 80 %. Výsledky provedeného PET/CT ovlivnily terapeutický postup ve 20 % případů (indikace radioterapie a chemoterapie). Ve skupině pacientů s 21 MGNV zaznamenalo FDG-PET/CT vyšetření přechod do MM u 3 pacientů s typem nálezu F-FD.

Závěr: ^{18}F -FDG PET/CT se jeví jako velmi cenná metoda v detekci medulárních a extramedulárních lézí MM, aktivity onemocnění a v určení jeho rozsahu během jediného vyšetření. Je přesnější v primární stagingu choroby než konvenční radiografie a spolehlivě detekuje relaps choroby. Výsledky vyšetření mohou ovlivnit terapeutický postup.

PET/CT může rovněž přispět k časně detekci transformace asymptomatických forem (MGNV, MM stadium I) ve formy agresivnější s nutností terapie.

Práce podpořena grantem IGA MZ ČR NR/9484-2.

1214

Molekulárně-cytogenetické mapování oblasti 1q u relabujících a progredujících pacientů s mnohočetným myelomem

J. Balcárková, H. Urbánková, V. Ščudla, M. Holzerová, J. Bačovský, J. Hanzlíková, J. Kropáčková, I. Prekopová, K. Indrák, M. Jarošová

Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc; III. interní klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc

Úvod: Mnohočetný myelom (MM) je plazmocelulární maligní onemocnění, kterému může předcházet monoklonální gamapatie (MGUS) nebo doutnající myelom (SMM). Přesný mechanismus vzniku a progresse není známý a předpokládá se, že se jedná o mnohastupňový proces, zahrnující genomickou instabilitu jako možnou příčinu klonálního vývoje. Cytogenetické a molekulárně cytogenetické studie odhalily opakující se chromozomové změny prognostického významu, z nichž delece chromozomu 13q, hypodiploidie a translokace t(4;14) jsou spojeny se špatnou prognózou. Další, často se opakující chromozomovou změnou, je zmožení genetického materiálu na chromozomu 1q, a to ve formě izochromozomu 1q, duplikace, nebalancované nebo jumping translokace vyskytující se až u 45 % nemocných s MM. Bylo pozorováno, že zmožení 1q je časté u pokročilých stadií MM, a proto může být spojeno s progresí choroby. Předpokládá se, že geny lokalizované v nejčastěji zmožené oblasti 1q21, jako CKS1B, PDZK1, BCL6 a další, se mohou na vývoji MM podílet.

Cílem práce bylo určení minimální zmožené oblasti chromozomu 1q pomocí metod molekulární cytogenetiky – FICTION, CGH a arrayCGH u 30 relabujících a progredujících pacientů s MM. Soubor tvořilo 14 mužů a 16 žen (medián věku 63 let).

Metodika: Metoda FICTION s lokus specifickými sondami 1q21/1p36, IgH, RB1, t(4;14), t(11;14) centromerickými sondami pro chromozomy 7, 9, 11, 15 a 17 byla použita k standardnímu vyšetření. Metoda arrayCGH s čipem K3 obsahujícím ~ 3 500 BAC/PAC klonů a metoda CGH byly použity u 5 vybraných pacientů. Metoda FICTION s BAC sondami pro geny SF3B4, BCL9, IRTA1, ASPM a ARF1 byla použita u pacientů s prokázaným zmožením 1q21 pro určení minimální zmožené oblasti 1q.

Výsledky: Metodou FICTION bylo zmožení kopií oblasti 1q21 nalezeno u 14 (47 %) z 30 pacientů. Metodou arrayCGH a CGH u 5 vybraných pacientů bylo zjištěno

zmožení celého dlouhého ramene chromozomu 1. U ostatních pacientů byl rozsah zmožení určen metodou FICTION s BAC sondami pro vybrané geny. Na základě molekulárně cytogenetických výsledků 14 pacientů byla stanovena minimální zmožená oblast. Výsledky byly srovnány s klinickými daty a budou prezentovány.

Práce je podporována grantem MSM 6198959205.

1185

Prognostický význam ^{99m}Tc-MIBI scintigrafie u mnohočetného myelomu

J. Bačovský, T. Pika, V. Ščudla, J. Minařík, M. Mysliveček

III. interní klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc; Klinika nukleární medicíny Lékařské fakulty UP a FN Olomouc

Cíle: Zhodnocení prognostického významu ^{99m}Tc-MIBI scintigrafie u 99 nemocných s MM a 18 nemocných s MGUS. Byl hodnocen prognostický význam rozdílných typů MIBI scintigramů: D – difuzní, F – fokální, N – normální ve vztahu k celkovému přežití nemocných (OS) a prognostickým faktorům.

Metody: Studie zahrnuje 99 nemocných s MM a 18 nemocných s MGUS. ^{99m}Tc-MIBI scintigrafie byla prováděna při stanovení diagnózy nebo v relapsu onemocnění. Posuzovali jsme rozdílné typy MIBI scintigramů N, D, F a markery aktivity MM, tj. sérovou hladinou B2M, sTK, CRP, MIG, LDH, Hb, infiltrace dřeně plazmatickými buňkami a index apoptózy – Apo a labeling indexe – LI. Cílem studie bylo analyzovat retrospektivně výsledky MIBI scintigrafie vyjádřené typem scintigramu ve vztahu k době do relapsu (PFS) a celkovému přežití (OS).

Výsledky: Medián věku u MM byl 60 let (37–79). Medián věku u MGUS byl 55 let (31–80). Ve skupině nemocných s MM byl zjištěn fokální typ scintigramu – F u 21 nemocných, OS byl 8,6 měsíců. Difuzní typ scintigramu – D u 58 nemocných, OS byl 53,1 měsíců. Normální typ scintigramu – N u 20 nemocných, OS byl 73,3 měsíců. Byl zjištěn signifikantní rozdíl v přežití mezi jednotlivými skupinami nemocných F, D a N ($p > 0,001$). Významným prediktivním faktorem byla fokální pozitivita MIBI scintigrafie (F). Scintigram typu F koreloval s klinickým stadiem III dle DS klasifikace i dle IPI. U 18 vyšetřených nemocných s MGUS byl převážně zjištěn normální typ scintigramu – N, jen u 2 nemocných byl zjištěn difuzní typ scintigramu – D. Celkové přežití (OS) této skupiny bylo 78 měsíců.

Závěr: ^{99m}Tc-MIBI scintigrafie je cennou metodou celotělového zobrazení pro nemocné s MM odrážející aktivitu onemocnění, jde o rychlou a levnou techniku zobrazení, zvláště v situacích, kdy PET-CT není pohotově k dispozici. Významným negativním prediktivním ukazatelem OS byl fokální typ (F) MIBI scintigramu.

Podpořeno grantem IGA:NR 9489-3, NR 9225-3.

1347

Stanovení volných lehkých řetězců v séru**M. Tichý, V. Maisnar, J. Vávrová, B. Friedecký, R. Hájek***II. interní klinika Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové;
Česká myelomová skupina Brno*

V posledních 10 letech bylo dosaženo velkého pokroku v diagnostice a terapii monoklonálních gamapatií. Biochemická laboratorní diagnostika využívá stále citlivějších metod, jakými jsou imunofixační elektroforéza, kapilární elektroforéza a stanovení koncentrace volných lehkých řetězců imunoglobulinů. Naše sdělení je věnováno současným laboratorním metodám stanovení volných lehkých řetězců a zkušenostem s jejich klinickým využitím. Náš vztah k této metodě prodělává typické fáze, které většinou provází (a to nejen v klinice) vše nové. Od počátečního až nekritického nadšení přes ústup od této metody až k nynějšímu přijetí určitého systému pro uplatnění stanovení sérových volných lehkých řetězců pro diagnostiku a monitorování vývoje a terapie monoklonálních gamapatií. Stále však zůstává řada nedořešených, a to jak klinických, tak zejména metodických otázek, které by měly být v blízké budoucnosti objasněny, a tím také velmi stoupne klinický význam stanovení volných lehkých řetězců. V našem sdělení se snažíme o vymezení metodických problémů při stanovení volných lehkých řetězců. Domníváme se, že právě metodické problémy jsou hlavní příčinou řady nejasností při interpretaci výsledků. Stanovení volných lehkých řetězců u monoklonálních gamapatií je v některých konkrétních klinických situacích přínosem, ale bude potřeba úprava stávajících či vývoj nových metodik jejich průkazu.

1244

Přínos fenotypizace plazmocytů v diagnostice mnohočetného myelomu a monoklonální gamapatie nejasného významu**L. Kovářová, I. Burešová, R. Suská, L. Pour,
L. Zahradová, M. Penka, R. Hájek***Oddělení klinické hematologie FN Brno, pracoviště Bohunice;
Lékařské fakulta MU Brno; Univerzitní výzkumné centrum – Česká myelomová skupina Brno; Interní hematologická klinika Lékařské fakulty MU a FN Brno, pracoviště Bohunice*

Úvod: Vícebarevná průtoková cytometrie je užitečným nástrojem k analýze plazmatických buněk, jelikož s dostatečnou senzitivitou dovoluje stanovení jejich počtu a zejména rozlišení na fyziologické a patologické. V této studii jsme sledovali zastoupení plazmocytů (PC) u osob s monoklonální gamapatií nejasného významu (MGUS) a s mnohočetným myelomem (MM) s cílem nalézt rozdíly v počtu a fenotypu jejich PC a případně také definovat potenciální parametr, který by obě nemoci od sebe odlišil.

Soubor pacientů a metodika: Celkem jsme zhodnotili 25 osob s MGUS a 78 nově diagnostikovaných neléčených osob s MM. Skupina osob s MM dále, při klasifikaci dle kritérií Durie-Salmon, zahrnovala 19 pacientů v I. klinickém stadiu onemocnění (MM I), 14 pacientů v II. klinickém stadiu onemocnění (MM II) a 45 pacientů v III. klinickém stadiu onemocnění (MM III). Kostní dřevina byla inkubována s následujícími MoAb: CD38-FITC, CD138-PE, CD45-ECD, CD56-PC5, CD19-PC7. Po lýze byly vzorky analyzovány na průtokovém cytometru. Infiltrace v kostní dřevině byla analyzována též morfologicky.

Výsledky: Mezi odlišující parametry patří statisticky významně nižší infiltrace kostní dřeviny u monoklonální gamapatie nejasného významu, ať už stanovená morfologicky (2,0 vs 11,2 %; $p < 0,001$), nebo fenotypicky (0,4 vs 3,0 %; $p < 0,001$). Při srovnání s mnohočetným myelomem je pro monoklonální gamapatii nejasného významu také příznačné vyšší zastoupení reziduálních CD19+ plazmocytů (15,0 vs 1,2 %; $p < 0,001$) a nižší zastoupení patologických CD56+ plazmocytů (23,6 vs 88,6 %; $p = 0,004$) v kostní dřevině, přičemž relativní počet CD19+ PC se jeví jako jednoznačný parametr pro odlišení monoklonální gamapatie nejasného významu od všech klinických stadií mnohočetného myelomu.

Závěr: Analýzou plazmocytů kostní dřeviny a jejich fenotypového profilu, zejména stanovením reziduálních CD19+ PC, můžeme napomoci při diferenciální diagnostice monoklonálních gamapatií. Do budoucna předpokládáme také možný význam analýzy PC v kostní dřevině pro prognózu hodnocených osob a pro studium minimální reziduální choroby.
Podpořeno MŠMT LC06027.

1264

Kompenzují nové léky vliv cytogenetických negativních prognostických markerů u pacientů s mnohočetným myelomem? Aktualizované výsledky o rok později**R. Zaoralová, H. Grešliková, H. Filková, P. Němec,
J. Smetana, K. Beranová, P. Kuglík, R. Kupská,
A. Oltová, L. Pour, A. Křivanová, M. Krejčí, Z. Adam,
J. Smejkalová, R. Hájek***Česká myelomová skupina – Univerzitní centrum výzkumu a terapie myelomů Lékařské fakulty MU, Brno; Oddělení genetiky a molekulární biologie Přírodovědecké fakulty MU Brno; Oddělení lékařské genetiky FN Brno, pracoviště FDN JGM; Interní hematologická klinika Lékařské fakulty MU a FN Brno, pracoviště Bohunice*

Úvod: Mnohočetný myelom (MM) je zhoubné onemocnění způsobené maligní transformací B-buňky, její klonální proliferací a akumulací vzniklé populace myelomových buněk (MB) v kostní dřevině. Důležitým faktorem při stanovení prognózy je výskyt chromozomových změn v MB.

V naší studii jsme se zaměřili na tyto změny studované v MB: del(13)(q14) – gen RB1, t(4;14), del(17)(p13) – gen p53, gain (1)(q21) – gen CKS1B a hyperdiploidie.

Cílem studie je stanovit jejich prognostický význam u pacientů léčených přípravkem Velcade (V) nebo Thalidomid (T).

Metodika a pacienti: n = 74 pacientů; léčba kombinovaná s V (n = 40) nebo T (n = 34). Věk 64,9 ± 9,6 let; 50 % (37/74) mužů; 65 % (61/74) klinické stadium III; 82 % (61/74) bez renálních komplikací; 82 % (61/74) v 1. nebo 2. relapsu; medián follow-up 12,8 měsíců (95% IS 12,6–17,1). ORR u 61 % (45/74) pacientů. Charakteristiky pacientů léčených V nebo T jsou podobné. Detekce aberací metodu FISH na separovaných buňkách nebo clg-FISH na plné kostní dřeni.

Výsledky cytogenetických analýz: del RB1 55 % (39/70), del p53 16 % (11/68), t(4;14) 37 % (22/60), gain 1q21 61 % (36/59), hyperdiploidie 39 % (15/39). Všichni pacienti s del p53 měli zároveň del RB1 (p = 0,002). U pacientů s del p53 ve více než 50 % buněk se vyskytovala současně del RB1 (p = 0,007). U pacientů s t(4;14) ve více než 50 % buněk se vyskytovala současně del RB1 (p = 0,036). Byl pozorován trend k přítomnosti t(4;14) u pacientů s gain 1q21 (p = 0,053) a nepřítomnosti t(4;14) u pacientů s hyperdiploidií (p = 0,054). Sledované klinické parametry: Celková léčebná odezva (ORR), celkové přežití (OS), čas do progresu (TTP, PFS) a trvání léčebné odezvy (DOR). V souboru všech pacientů jsme prokázali statisticky významně (p = 0,033) kratší TTP u pacientů s gain 1q21 (medián přežití 11,9 vs 9 měsíců). U pacientů léčených T měli pacienti s gain 1q21 kratší TTP a PFS (p = 0,015, medián nedosažen vs 8,1 měsíců), u pacientů léčených V nebyl pozorován rozdíl.

Závěr: Velcade v kombinované terapii v našem souboru na rozdíl od Thalidomidu překonává vliv nadbytečných kopií 1q21. Velcade stejně jako Thalidomid překonávají negativní vliv ostatních sledovaných změn.

Podpořeno Centrem základního výzkumu pro monoklonální gamopatie a mnohočetný myelom, Brno, MU (LC 06027), grantem MŠMT ČR (MSM0021622415) a grantem IGA MZ ČR (NR9317).

SYMPOSIUM ON MOLECULAR HEMATOLOGY – LYMPHOID MALIGNANCIES

1337

Genetics of t(11;14)-negative mantle cell lymphoma

I. Wlodarska

Center for Human Genetics, C. U. Leuven, Leuven, Belgium

Mantle cell lymphoma (MCL) is an aggressive B-cell lymphoma with distinct pathologic and clinical features.

The genetic hallmark of MCL is the t(11;14)(q13;q32) that leads to a constitutive expression of CCND1 (11q13) through the action of enhancer elements in the immunoglobulin heavy chain locus (IGH) (14q32). CCND1 encodes cyclin D1 that plays an important role in the G1/S transition of the cell cycle. Although t(11;14)/IGH-CCND1 can be detected in nearly all MCLs, rare t(11;14)-negative or cyclin D1-negative MCL cases have been published. The genetics of these lymphomas, however, is poorly understood. We collected and characterized eight MCL cases lacking t(11;14) or variant CCND1 rearrangement. Immunophenotyping showed that these cases express either cyclin D1 (two cases), or D2 (two cases), or D3 (three cases). One case was cyclin D-negative. Cytogenetics and fluorescence in situ hybridization detected t(2;12)(p11;p13)/IGK-CCND2 in one of the cyclin D2-positive cases and t(6;14)(p21;q32)/IGH-CCND3 in one of the cyclin D3-positive cases. Moreover, we identified a novel cryptic t(2;14)(p24;q32) targeting MYCN in two blastoid MCLs: one negative for cyclin D and one expressing cyclin D3. Interestingly, both cases revealed expression of cyclin E. Notably, all three blastoid MCLs showed a monoallelic deletion of RB1 associated with a lack of expression of RB1 protein, and monoallelic loss of p16. In summary, this study confirms frequent aberrant expression of cyclin D2 and D3 in t(11;14)-negative MCLs and demonstrates a t(11;14)-independent expression of cyclin D1 in 25% of present cases. Novel findings include cyclin E expression in two t(11;14)-negative MCLs characterized by a cryptic t(2;14)(p24;q32) and identification of MYCN as a new lymphoma oncogene associated with a blastoid MCL. Clinically important is a predisposition of t(11;14)-negative MCLs to the central nervous system involvement.

1302

Methylation studies of the DLK1-GTL2 imprinted domain in human B-cell malignancies with IGH-involving interstitial del(14)(q)

B. Katrincskáková, I. Wlodarska, M. George, M. Jarošová, P. Vandenberghe, L. Michaux, H. Urbánková, H. Takeda, C. Charlier

Department of Human Genetics, Catholic University, Leuven, Belgium; Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc; Department of Genetics, Faculty of Veterinary Medicine of Liege, Liege, Belgium

The smallest commonly deleted region mapped in 27 leukemia/lymphoma cases with IGH-involving interstitial deletion of chromosome 14 [del(14/IGH)] (Pospisilova et al 2006) harbors the DLK1-GTL2 imprinted domain

at 14q32.31. This domain contains 3 paternally expressed coding genes and a cluster of 46 microRNAs with a maternal expression controlled by an intergenic differentially methylated region (IG-DMR). Whether any of these genes play a role of a del(14/IGH) associated tumor suppressor gene (TSG) is unknown. Assuming that a targeted deletion of either a paternally or maternally inherited chromosome 14 should result in silencing of the respective coding or non-coding imprinted genes, we undertook studies aimed at determination of the parental origin of chromosome 14 affected by del(14/IGH) in our index cases. DNA samples from 22 leukemia/lymphoma cases with del(14/IGH) were available. SNP genotyping, bisulphate conversion, PCR amplification/cloning and bisulphate sequencing of genomic DNA were established in our study. Genotyping of 3 SNPs located in the vicinity of the predicted IG-DMR enabled us to pick up 9 cases with allelic imbalance. In all these cases PCR amplification, cloning and sequencing of the bisulphate-treated DNA in the IG-DMR/SNPs region was performed. The methylated/unmethylated profile of CpG islands together with the SNP(s) allele distributed in respect to allelic imbalance allowed us to predict the parental origin of chromosome 14 in each of the 25–30 randomly selected individual clones analyzed per case. Based on our approach we determined the parental origin of chromosome 14 affected by del(14/IGH) in a total of 9 cases: 6 cases showed loss of chromosome 14 of paternal and 3 cases revealed chromosome 14 deletion of maternal origin. Our study based on chromosome specific DNA methylation pattern in the DLK1–GTL2 imprinted 14q32.31 region indicates that del(14/IGH) affects randomly of either paternally or maternally inherited chromosome 14. These results argue against the hypothesis that a candidate TSG from this imprinted domain is constantly inactivated by a targeted deletion of its active allele.

Granted by BIL05/59 and NFWO G.0610.07.

1330

The EBV-encoded EBNA1 up-regulates macrophage migration inhibitory factor (MIF) and induces ERK signalling and the activation of Elk1 in B cell lymphoma

R. Hezova, G. Kapatai, S. Leonard, J. Ehrmann, Z. Kolar, W. Wenbin, S. L. Young, B. J. C. Woodman, G. P. Murray

Laboratoř molekulární patologie Lékařské fakulty UP Olomouc; Cancer Research UK Institute for Cancer Studies, University of Birmingham, Birmingham, West Midlands, Great Britain

The Epstein-Barr virus (EBV) is implicated in the pathogenesis of several germinal centre derived B cell ma-

lignancies including Hodgkin's lymphoma (HL) and Burkitt's lymphoma (BL). EBNA1 is an EBV protein that is expressed in all virus-associated cancers; although it is required for efficient episome replication and segregation, it has also been suggested that EBNA1 may contribute more directly to oncogenesis. To elucidate a possible role for EBNA1 in EBV-associated lymphomas, we performed a microarray analysis following the expression of EBNA1 in primary tonsillar germinal centre (GC) B cells, the presumed progenitor cell of HL and BL. Microarray analysis revealed the up-regulation of macrophage migration inhibitory factor (MIF), an inflammatory cytokine that is increased in many cancers. MIF has been suggested to contribute to cancer progression through various mechanisms, including the activation of ERK MAP kinases. MIF is an attractive target for cancer therapies; several small molecule antagonists and monoclonal antibodies against MIF have already been developed. We confirmed the up-regulation of MIF in EBNA1-expressing GC B cells by qPCR, and showed that MIF protein was also up-regulated in lymphoma cell lines after transfection of EBNA1 and in GC B cells after EBV infection. Furthermore, the up-regulation of MIF in these cells was accompanied by increased ERK and Elk1 activation. Further analysis of genes differentially expressed by EBNA1 in GC B cells revealed an enrichment of genes containing potential binding sites for Elk1. This suggests that the induction of MIF is responsible for many of the transcriptional changes induced by EBNA1. We are currently investigating whether EBNA1 induces ERK signalling pathway through MIF, and the extent to which Elk-1 activity is responsible for the subsequent regulation of various EBNA1 target genes. Our data identify the oncogenic ERK MAP kinase pathway as a major target of EBNA1, and suggest that this virus protein can have important tumour-promoting effects aside from its role in viral episome maintenance.

We are grateful to the Leukaemia Research Fund, UK, to the AICR, UK and MSM 6198959216, CZ.

1280

Individual immunodominant T cell clones monitoring in patients with cancer

J. Michálek, E. Matějková, V. Foltánková, I. Kocák, L. Raida, S. E. Vitetta

Univerzitní centrum buněčné imunoterapie MU Brno; Masarykův onkologický ústav Brno; Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty UP a FN, Olomouc; Cancer Immunobiology Center, Dallas TX, USA

We investigated the presence of individual tumor-specific T cell clones in patients with leukemia, multiple myeloma,

renal cell carcinoma and metastatic melanoma. 26 patients were examined for the presence of tumor-reactive T cells using tumor antigens or dendritic cells loaded with tumor antigens. Their tumor specificity was tested using non-radioactive cytotoxicity test. Individual immunodominant T cell clones were identified by the clonotypic assay that combines *in vitro* cell culture, immunomagnetic sorting of activated IFN γ + or CD25+ T cells, T cell receptor beta locus anchored reverse transcription-PCR, and clonotypic quantitative PCR. All patients had detectable CD4+ and CD8+ tumor-reactive T cells *in vitro*. Five leukemia patients with detectable alloreactive CD4+ clones *in vitro* have also clinical grade II–IV. graft-versus-host disease (GVHD). The occurrence of CD4+ alloreactive T cell clones correlated closely with clinical signs of GVHD. Expanded tumor-reactive T cells demonstrated specific cytotoxic effect against tumor cells *in vitro*. Three patients with melanoma experienced objective responses and their clinical responses were closely associated with the *in vivo* expansion and long-term persistence of individual CD8+ T cell clones with frequencies of 10^{-6} to 10^{-3} of all circulating CD8+ T cells. Five melanoma patients with progressive disease experienced no or temporary presence of circulating melanoma-reactive T cell clones. In conclusion, the clonotypic assay is highly sensitive and predictive test that can be used for quantitative monitoring of immune response in cancer patients.

Supported by MŠMT NPVII 2B06058 and IGA MZČR 1A8709-5.

1254

Retroviral rescue with PU.1 induces derepression of both PU.1 and miR155 target genes – possible therapeutic implications for CLL

N. Čuřík, K. Vargová, J. Podskočová, P. Burda, G. F. Savvulidi, O. Ujhelly, I. A. Skoultchi, J. Zavadil, T. Stopka

Ústav patologické fyziologie 1. lékařské fakulty UK Praha; AECOM, Yeshiva University, New York, USA; Pathology, School of Medicine, New York University, New York, USA

MicroRNAs are non-coding post-transcriptional regulators of gene expression often dysregulated in human cancers including hematological malignancies. miR-155 is overexpressed in chronic lymphocytic leukemia (CLL). Disruption of negative feedback loop between PU.1 and miR-155 is a putative pathogenesis factor in CLL currently tested in our laboratory. To test if PU.1 is indeed blocked by miR-155 (supported in Vigorito 2007) in

leukemia and if the PU.1 levels could be restored we have devised retroviral system using PU.1 expressed from bicistronic lentiviral vector with GFP and the control system without PU.1. We used 2 transformed human leukemia cell lines and 2 primary CLL mononuclear cells. Retroviral rescue experiments using PU.1 lentivirus induced significantly PU.1 levels and also induced derepression of PU.1-dependent transcriptional profiles. PU.1 induced significant differentiation marker expression associated with growth inhibition *in vitro*. In addition, PU.1 transgenic overexpression competitively derepressed miR-155 targets indicating that we have caused significant change of miR-155/PU.1 ratio. We conclude that increased levels of PU.1 in leukemia cells restored differentiation capacity inhibited by miR-155, indicating its possible therapeutic use in CLL patients.

Granty: 301/06/093, NR9021-4, 2B06077, 0021620806, LC06044.

1251

Epigenetic regulation of miR155 expression – insights into pathogenesis of CLL

P. Burda, N. Čuřík, J. Kokavec, P. Bašová, J. Zavadil, T. Stopka

Ústav patologické fyziologie 1. lékařské fakulty UK Praha; Pathology, School of Medicine, New York University, New York, USA

We have identified miR-155 alongside the set of other miRNAs as targets of PU.1 using two model hematopoietic cell systems expressing a transgene encoding PU.1 fused with the ligand binding domain of the estrogen receptor. The levels of pri-miR-155 that is encoded as a BIC gene are controlled at the level of transcription and processing (Eis 2005). By chromatin immunoprecipitation we demonstrate that PU.1 is directly recruited to newly identified CpG rich region upstream pri-miR-155 regulatory regions and induces structural chromatin changes associated with gene activation. Disequilibrium in miR155/PU.1 levels is a putative pathogenesis factor in chronic lymphocytic leukemia (CLL) supported by data of miR-155 upregulation in CLL (Fulci 2007, Marton 2008) and other data demonstrating that PU.1 is targeted directly by miR-155 (Vigorito 2007). Transcriptionally active chromatin structure at the CpG rich region and in an additional region within pri-miR-155 gene coupled with significantly decreased PU.1 occupancy at these regions in CLL cells indicate PU.1-independent and possibly competitive activating mechanism during CLL pathogenesis.

1346

Novel therapy of Ph-positive CNS disease**K. Porkka***Division of Hematology, Helsinki University Central Hospital, Helsinki, Finland*

Central nervous system (CNS) involvement is a relatively common complication in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia (Ph + ALL) and chronic myeloid leukemia (CML) in blast crisis (BC). The current treatment options (intrathecal or systemic chemotherapy, radiotherapy) for CNS leukemia are not optimal in terms of efficacy and toxicity. The BCR-ABL kinase inhibitor imatinib, which is widely used in the treatment of Ph-positive leukemia, has a poor penetrance into cerebrospinal fluid (CSF) due to strong interaction with P-glycoprotein (Pgp), resulting in inadequate concentrations for kinase inhibition in leukemic cells. Dasatinib, a novel potent multikinase inhibitor, is not a substrate for Pgp and thus could cross the blood-brain-barrier. Furthermore, given the > 300 fold potency of dasatinib over imatinib in inhibiting BCR-ABL and the fact that the CSF is a low-protein environment where dasatinib is likely to exist as a free drug, suggest that even minute dasatinib concentrations may be sufficient for antileukemic activity. The aim of this study was to assess the clinical efficacy of dasatinib therapy in the treatment of CNS leukemia in a clinically relevant animal model of Ph+ CNS leukemia. We also collected patients with Ph + ALL and BC CML with leukemic CNS manifestations, who were treated with dasatinib. To date, a total of 14 patients have been included in the study, most treated with in clinical studies (Bristol-Myers Squibb, n = 9) in Europe and the US. Eleven patients received dasatinib as a front-line therapy for CNS disease, and 3 patients had a CNS relapse while on dasatinib. Some patients received intrathecal chemotherapy in combination with dasatinib. In preclinical studies, peroral dasatinib increased survival, while imatinib failed to inhibit intracranial tumor growth. Stabilization and regression of CNS disease was achieved with prolonged continued dasatinib administration. The drug also demonstrated substantial activity in 14/11 adult and pediatric patients with CNS Ph+ leukemia. Eleven evaluable patients had clinically significant, long-lasting responses, which were complete in seven patients. In three additional patients, isolated CNS relapse occurred during dasatinib therapy and in two of them it was caused by expansion of a BCR-ABL-mutated dasatinib-resistant clone, implying selection pressure exerted by the compound in the CNS. In conclusion, dasatinib penetrates the BBB and induces significant clinical responses even as monotherapy in patients with Ph-positive leukemia. Dasatinib has promising therapeutic po-

tential in managing intracranial leukemic disease, and substantial clinical activity in patients who experience CNS relapse while on imatinib therapy.

AKUTNÍ LEUKEMIE/MDS

1322

Vyšetřování buněk účastnících se v buňkami zprostředkované imunologické reakci u MDS. Možný význam nálezů pro patogenezi MDS**R. Neuwirtová, J. Karban, K. Siebertová, J. Bartůňková, V. Cukrová, M. Belíčková, A. Jonášová, M. Šišková***I. interní klinika 1. lékařské fakulty UK a VFN Praha; Centrální hematologické laboratoře VFN Praha; Ústav imunologie 2. lékařské fakulty UK a FN Motol, Praha; Ústav hematologie a krevní transfuze Praha*

Úvod: MDS low risk je vlastně prekanceróza (preleukemie). MDS high risk už má charakter onkohematologické choroby s přítomností leukemického klonu. U všech MDS je více či méně vyjádřena snížená protinfekční imunita, ale lze předpokládat i kompromitovanou protinádorovou imunitu, která jistě hraje roli ve vývoji MDS do AML. Je otázka, zda defekty v imunologickém procesu neovlivňují i mechanismus předčasné apoptózy hemopoetických buněk u MDS low risk. V předchozí práci jsme prokázali u MDS pacientů hlavně s RA defektní cytotoxicitu v buňkami zprostředkované imunologické reakci v odezvě na alogenní buňky. Rozhodli jsme se vyšetřit buňky, které participují v této reakci nebo které ji mohou ovlivňovat.

Metoda: Vyšetřili jsme subpopulace lymfocytů: B-lymfocyty, T-lymfocyty (CD3, CD4, CD8, HLA-DR, NK), CD4+TCR (α , β), CD8+TCR (γ , δ), regulační T-lymfocyty (CD4+CD25+, CD4+CD127-CD25+) a dendritické buňky. Výsledky jsme porovnali s nálezy u kontrolních osob přibližně stejného, tj. vyššího věku a s nálezy u pacientů s jinými hematologickými a onkohematologickými chorobami.

Výsledky: Našli jsme statisticky signifikantní snížení B-buněk ($p < 0,01$). Mezi subpopulacemi T-lymfocytů jsme pozorovali častější výskyt vyššího počtu CD8, aktivovaných cytotoxických CD8 a NK buněk. γ , δ -T-buňky byly významně sníženy u MDS nemocných. Regulační T-buňky byly sníženy u MDS low risk ve srovnání se staršími kontrolními osobami ($p < 0,1$), ale rozdíl byl signifikantní ve srovnání s hematologickými kontrolami ($p = 0,001$). V žádném případě jsme nepozorovali zvýšení hodnot regulačních T-lymfocytů u MDS low risk, zatímco u MDS high risk byly regulační T-buňky zvýšeny u 3 z 10 vyšetřených. Nález defektní maturace dendritických buněk u našich pacientů s MDS byl v souladu s nálezy jiných autorů.

Závěr: Naše vyšetření buněk angažovaných v imunologických reakcích spolu s dřívějším nálezem defektní cytotoxicity ukazuje na poruchu protiinfekční a protinádorové imunity u MDS. V rámci protinádorové imunity nálezy dovolují uvažovat i o ovlivnění imunologického mechanismu předčasné apoptózy hemopoetických buněk s předpokladem, že může docházet k určité inkompletnosti procesu apoptózy.

1301

Retrospektivní analýza imunofenotypu subpopulací v kostní dřeni u dětí s myelodysplastickým syndromem a aplastickou anémií

E. Mejstříková, M. Kalinová, M. Suková, K. Kramaržová, E. Vodičková, J. Housková, K. Michalová, R. Formánková, P. Smíšek, K. Zdráhalová, J. Trka, J. Starý, O. Hrušák

Klinika dětské hematologie a onkologie 2. lékařské fakulty UK a FN Motol, Praha; Ústav patologie a molekulární medicíny 2. lékařské fakulty UK a FN Motol, Praha; Oddělení klinické hematologie FN Motol, Praha; Centrum nádorové cytogenetiky 1. lékařské fakulty UK a VFN Praha

Myelodysplastický syndrom (MDS) a aplastická anémie představuje u dětí vzácná onemocnění. MDS je podobně jako u dospělých charakterizován neefektivní hematopoézou a poruchou produkce krevních elementů. Časnou fází MDS, v níž nenacházíme zvýšené procento blastů, nazýváme jako refrakterní cytopenii (RC). MDS RC je v řadě projevů podobné aplastické anémii (SAA), kde hraje významnou roli v patogenezi selhání krvetvorby aktivované T-lymfocyty. Celkem 37 dětí s MDS bylo diagnostikováno v letech 1998–2006 v ČR (JMML 8, JMML like/Noonan syndrom 2, sekundární CMML 2, refrakterní cytopenie 7, RAEB/RAEB-t 16, sekundární RAEB 2). Paralelně jsme analyzovali 27 dětí s SAA. Monosomie 7 byla přítomná u 11 dětí (JMML 3, RAEB/RAEBt 5, RC 3). Hodnotili jsme následující parametry: CD34+ a CD117+ prekurzory, procento a složení B řady, přítomnost či nepřítomnost atypické populace dle imunofenotypu a hladinu WT1. Atypická populace byla přítomná u 4 dětí s JMML, u 1 JMML like/Noonan syndromu, u 12 RAEB/RAEBt a u 2 CMML. Pacienti s RC a SAA neměli prokazatelnou atypickou populaci. Následující vzájemné korelace byly analyzovány (R. Spearman): CD34+ a CD117+ prekurzory, celková B řada a hladina WT1 transkriptu. Procento CD34 korelovalo s hladinou CD117 a WT1 ($p < 0,0001$, $R = 0,85$, $p = 0,0004$, $R = 0,71$). CD117+ prekurzory signifikantně korelovaly s hladinou WT1 ($p = 0,0004$, $R = 0,71$) a inverzně korelovaly s procentem B řady ($p = 0,009$, $R = -0,32$). Po rozdělení pacientů do 3 kategorií RC,

SAA a ostatní MDS jsme zjistili signifikantní rozdíl v hladině CD34+ prekurzorů ($p < 0,0001$), CD117+ prekurzorů ($p < 0,0001$) a hladině WT1 ($p = 0,002$). Pouze hladina WT1 se signifikantně lišila u pacientů s SAA a RC. Použití prahové hodnoty (1 % CD34+ prekurzorů) [Matsui, Leukemia 2006] mělo pouze 50% sensitivitu a 80% specificitu pro rozlišení RC a SAA (χ^2 , $p = 0,0296$). U SAA jsme pozorovali signifikantně vyšší zastoupení celkové B řady (Kruskallův-Wallisův, $p = 0,0021$). U 4/8 JMML jsme prokázali signifikantní atypie ve vývoji a v imunofenotypu B řady.

Podpořeno MSM0021620813, GACR301/06P162, VZ MZO 00064203, GAUK7543/2007.

1270

Prognostický význam podávání transfuzí erytrocytů nemocným s časnými formami myelodysplastického syndromu

J. Čermák

Ústav hematologie a krevní transfuze Praha

Anémie je nejčastějším projevem časně fáze myelodysplastického syndromu (MDS) a rozvoj přetížení železem v důsledku opakovaných transfuzí patří mezi časté komplikace u nemocných s RA či RARS (dle FAB klasifikace). Studie z nedávné doby ukazují, že počet podaných transfuzí může ovlivňovat délku přežití nemocných s MDS a že na tomto efektu se může zejména u nemocných s RA či RARS podílet sekundární potransfuzní přetížení železem. Přítomnost závislosti na podávání transfuzí jako nezávislého prognostického faktoru byla podkladem pro vypracování tzv. WPSS skórovacího systému, jenž dělí nemocné do prognosticky významných skupin dle WHO kategorie, cytogenetického rizika podle IPSS a závislosti na počtu transfuzí. V naší studii jsme efekt počtu podaných transfuzí ověřovali v retrospektivní analýze skupiny 107 nemocných s primárním MDS typu RA či RARS (dle FAB). Statistická analýza o jedné proměnné pomocí Kaplanova-Meireova testu a log rank2 testu ukázala statisticky významný rozdíl v délce přežití mezi nemocnými, kteří obdrželi ≤ 2 TU erytrocytů (RBC) měsíčně, a nemocnými, kteří dostávali > 2 TU RBC za měsíc. Regresní analýza o jedné proměnné ukázala jako nejdůležitější parametr ovlivňující délku přežití nemocných přítomnost progresu choroby směrem k leukemii ($\chi^2 = 47,7$, $P = 0,001$) a dále podávání > 2 TU RBC/měsíc ($\chi^2 = 20,4$, $P = 0,001$). Nicméně již podávání 1 TU RBC v intervalu 4–8 týdnů mělo nepříznivý efekt na délku přežití. Regresní analýza o více proměnných dle Coxe odhalila jako jediný nezávislý parametr ovlivňující délku přežití přítomnost progresu k pokročilým formám MDS ($p < 0,0001$). U nemocných bez známek progresu choroby byla závislost na

podávání > 2 TU RBC/měsíc nezávislou proměnnou ve vztahu k délce přežití jen u nemocných s dysplazií limitovanou na červenou řadu (RA, RARS, 5q-syndrom dle WHO), u nemocných s multilineární dysplazií (RCMD, RCMD-RS) byl nepříznivý efekt podávání transfuzí spjat s přítomností IM-1 či IM-2 rizika dle IPSS. Naše nálezy ukazují, že závislost na podávání transfuzí je důležitým, ale nikoli zcela nezávislým prognostickým faktorem nemocných s časnými formami MDS. Nepříznivý efekt na délku přežití byl pozorován zejména u polytransfundovaných nemocných s čistou erytroidní dysplazií (RA, RARS, 5q-syndrom), což zdůrazňuje význam včasného zahájení chelatační léčby u této skupiny nemocných s jinak poměrně příznivou prognózou.

Práce vznikla za podpory VZ MZ ČR 00023736 a grantového projektu NR 9235/3 IGA MZ ČR.

1215

Druhá celostátní léčebná studie AML-BFM 98 zvýšila úspěšnost v dosažení remise i celkové přežití dětí s akutní myeloidní leukemií v České republice

J. Starý, P. Gajdoš, H. Hrstková, L. Kopečná, J. Štěrba, D. Dembická, D. Mendelová, V. Mihál, D. Pospíšilová, B. Blažek, H. Ptoszková, J. Hak, K. Toušová, D. Procházková, Z. Černá, Y. Jabali, P. Timr, P. Smíšek, V. Vávra, K. Zdráhalová, P. Sedláček, L. Šrámková, E. Mejstříková, A. Vrzalová, K. Kramarzová, K. Michalová, Z. Zemanová, M. Jarošová, J. Housková, A. Zámková, J. Zuna, O. Hrušák, J. Trka, J. Schwarz, U. Creutzig

Klinika dětské hematologie a onkologie 2. lékařské fakulty UK a Motol Praha a spolupracující pracoviště: Praha; Brno; Olomouc; Ostrava; Hradec Králové; Ústí nad Labem; Plzeň; České Budějovice; Münster, Německo

Léčba dětí s akutní myeloidní leukemií (AML) probíhala v České republice v období červenec roku 1998 až únor roku 2004 v mezinárodní léčebné studii AML-BFM 98 ve spolupráci s Německem, Rakouskem a se Švýcarskem, se společnou databází v německém Münsteru a centrální randomizací. Pacienti standardního (SR) i vysokého (HR) rizika byli léčeni 5 bloky intenzivní chemoterapie (2 bloky obsahovaly vysokodávkovaný AraC), preventivním ozářením krania a 1 rok trvající udržovací léčbou. Randomizovaná fáze léčby srovnávala klasickou 6týdenní konsolidaci BFM protokolů s 2 krátkými bloky a roli G-CSF v časných fázích léčby. Výsledky léčby byly hodnotitelné u 70 dětí, 34 bylo řazeno do SR a 36 dětí do HR skupiny podle fenotypu a genotypu leukemie a časné odezvě na léčbu. 6 dětí (9 %) mělo Downův syndrom. Remise dosáhlo 60 dětí (85,7 %), což je o 12 % více ve srov-

nání s předchozí studií AML-BFM 93. Pět dětí (7 %) podstoupilo alogenní (n = 4) nebo autologní (n = 1) transplantaci kostní dřeně v 1. remisi. Devět dětí (15 %) zemřelo v remisi a 18 dětí (30 %) prodělalo relaps leukemie (16 izolovaných dřeňových relapsů a 2 kombinované relapsy). Dvě děti vyvinuly sekundární malignitu (sMDS a sALL), obě žijí po nepřibuzné transplantaci. 5leté přežití do selhání (EFS) a celkové přežití (OS) celé skupiny pacientů je s mediánem doby sledování 6,9 roků (4,1–9,3 roků) 44,3 %, resp. 57,1 %, ve skupině standardního rizika 52,9 %, resp. 70,6 % a vysokého rizika 36,1 %, resp. 44,4 %. Předchozí protokol léčby AML-BFM 93 dosáhl 5letý EFS/OS 42,6/45,9 %. Do mezinárodní studie bylo celkem zařazeno 473 pacientů, z nichž 88 % dosáhlo remise a 5leté přežití činilo 62 %. G-CSF zkrátil délku neutropenie, ale nesnížil výskyt infekcí. EFS obou konsolidačních ramen léčby byl stejný, ale doba léčby bloky byla zkrácena a počet toxických smrtí snížen. Účast v mezinárodní studii zvýšila nároky na diagnostiku a dokumentaci a vystavila výsledky léčby srovnání s jednou z vedoucích světových leukemických skupin.

1298

Prognóza proB ALL

O. Hrušák, J. Starý, J. Trka, K. Kramarzová, K. Zdráhalová, E. Mejstříková

CLIP Kliniky dětské hematologie a onkologie 2. lékařské fakulty UK a FN Motol, Praha; Pracovní skupina pro dětskou hematologii Praha

ProB ALL, která je u dětí i v dospělosti považována za nepříznivou, je definována jako B prekurzorová ALL, jejíž blasty neexprimují CD10. V současnosti se jako proB definuje stav, kdy méně než 20 % leukemických blastů exprikuje CD10. Ke špatné prognóze proB ALL přispívají MLL/AF4pos ALL. Dosud nebylo objasněno, zda i po vyloučení MLL/AF4pos ALL zůstává prognóza proB ALL horší. Zjišťovali jsme prognózu dětí s proB ALL ve srovnání s dětmi s jiným typem B prekurzorové ALL a vliv MLL/AF4 na tento rozdíl. Další otázkou bylo, zda citlivější definice proB ALL dokáže odhalit další pacienty s podobnou prognózou. Retrospektivně jsme zhodnotili všech 505 pacientů, u nichž jsme mezi 9/1996 a 8/2006 diagnostikovali B prekurzorovou ALL. Pacienti byli léčeni v jednom z českých center podle standardních protokolů BFM95 (290), Interfant 99 (12), Interfant 2006 (3), ALL-IC BFM 2002 (192) nebo POG9407 (5), případně byli léčeni/sledováni mimo protokol (n = 3). ProB ALL (n = 42) byla v celé kohortě spojena s horší prognózou (p = 0,0084, 5y EFS 62 % ± 7,9 %). Vyloučíme-li z analýzy MLL/AF4pos ALL (n = 10), je 5leté přežití bez události (5y EFS) 66 % ± 8,8 % a rozdíl od CD10pos pacientů již není signifikant-

ní ($p = 0,09$). Dále jsme testovali hypotézu, že i pacienti s „partial proB“, tj. s arbitrární pozitivitou CD10, ale s vysokým zastoupením CD10neg blastů (20 % a více), mají horší prognózu. Zastoupení CD10neg blastů jsme stanovili prostým rozdílem CD19pos a CD10pos blastů. Prognóza dětí s „partial proB“ ALL ($n = 45$; 8,9 %) je podobná (5y EFS 63 % \pm 7,7 %) jako u klasické proB ALL. Navíc je podobné i zastoupení hlavních genotypů ALL u proB ALL a „partial proB“ ALL ($p > 0,05$). V rámci „partial proB“ jsou naopak hlavní genotypy zastoupeny významně odlišně, než je tomu u ostatních non-proB. Spojíme-li děti s „partial proB“ a proB ALL do jedné skupiny ($n = 87$), definujeme podtyp ALL s významně horší prognózou. U tohoto podtypu platí, že i po vyloučení MLL/AF4pos dětí je prognóza horší ($n = 77$, 5y EFS 64 % \pm 5,9 %) než u zbývajících non-proB ALL (5y EFS 78 % \pm 2,2 %; $p = 0,011$). ProB ALL je tedy třeba definovat ne podle procenta blastů, exprimujících CD10, ale podle CD10neg blastů – získáme tím podtyp ALL, jehož prognóza zůstává horší i po vyloučení MLL/AF4pos ALL.
Podpořeno granty MSM0021620813, MZdNR/9531-3.

1294

Přesmyk z lymfoidní do myeloidní linie během prednizonové předfáze u dětí léčených podle protokolu ALL IC BFM2002

E. Mejstříková, E. Froňková, T. Kalina, J. Zuna, K. Mužíková, E. Vodičková, M. Vášková, P. Smíšek, V. Pelková, Z. Zemanová, J. Trka, T. Valová, L. Řezníčková, J. Starý, O. Hrušák

Klinika dětské hematologie a onkologie 2. lékařské fakulty UK a FN Motol, Praha; Oddělení klinické hematologie FN Motol, Praha; Centrum nádorové cytogenetiky 1. lékařské fakulty UK a VFN Praha

Během časně fáze léčby ALL dochází ke změnám exprese antigenů na leukemických blastech, tyto změny ale zpravidla nemění liniové zařazení. Překlasifikování leukemie z lymfoidní do myeloidní linie je vzácné. Incidence a prognostický význam časněho liniového přesmyku jsou nejasné. V období říjen roku 2002 až leden roku 2007 zahájilo 253 dětí v České republice léčbu ALL podle protokolu ALL-IC BFM 2002. Centrálně bylo provedeno morfologické, imunofenotypické a molekulárně-genetické vyšetření při diagnóze a při léčbě. U 3 dětí (původně BCP ALL) jsme pozorovali změnu imunofenotypu do myeloidní linie mezi dg a d8. Všichni 3 pacienti měli špatnou odezvu na prednizon (PPR) a u 2 nebyla u nich prokázána žádná specifická genetická aberace (včetně přestavby genu MLL), u 1 pacienta byla prokázána FLT3/ITD. U 2/3 pacientů (UPN 1, 2) byla při dg přítomna jedna uniformní populace lymfoidních blastů, v d8 blasty exprimovaly ty-

pické monocytární antigeny (CD14, CD64, zvýšení CD33) a lymfoidní antigeny klesaly (CD19) nebo zmizely (intra-TdT). U 1/3 pacientů (UPN 3) byla při dg přítomna majoritní populace lymfoidních blastů (57 %) a populace nezralých atypických myelomonocytárních blastů (15 %). V d8 jsme pozorovali převahu myelomonocytární (54 %) nad lymfoidní (32 %) populací. U všech pacientů byly podle qPCR přítomny klonální přestavby IgH jak v celkové KD v dg, d8 a 15, tak v sortovaných atypických myeloidních populacích. Všichni 3 pacienti dosáhli remise po ALL indukční léčbě. Protože všechny přesmyky byly objeveny na protokolu zahrnujícím d8, hledali jsme podobné pacienty na předchozím protokolu BFM95 (1996–2002) podle 3barevné cytometrické detekce MRN v d15, 33 a 78. U 1 pacienta se „sekundární AML M5b“ vzniklé 6 měsíců po dg ALL (PPR) jsme našli podobné změny imunofenotypu v d15 (snížení CD19, zvýšení CD14, CD33), morfolgie ukazovala 14,4 % monocytárních buněk a 7,6 % polymorfních blastů; „sAML“ nesla totožnou klonální přestavbu IgH jako diagnostická ALL. Incidence přesmyku z lymfoidní do myeloidní linie je 1,2 % u nově diagnostikovaných ALL, se špatnou odezvou na prednizon (27 % BCP-ALL s PPR) a špatnou prognózou. Nepozorovali jsme žádný přesmyk z T ALL do AML.

Podpora: MSM0021620813.

1242

Výskyt vybraných molekulárních markerov v súbore 65 pacientov s de novo akútnou myeloidnou leukémiou a normálnym karyotypom – naše skúsenosti

B. Katrincáková, T. Szotkowski, M. Divoká, M. Holzerová, J. Hubáček, J. Mužík, L. Dušek, K. Indrák, M. Jarošová

Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc; Institut biostatistiky a analýz MU Brno

Akútna myeloidná leukémia (AML) s normálnym karyotypom (NK), ktorá predstavuje najpočetnejšiu skupinu AML (zahŕňa 45–50 % všetkých AML), je na molekulárnej úrovni značne heterogénna. Vzhľadom na variabilný priebeh ochorenia u jednotlivých pacientov v tejto skupine je dôležité poznať faktory, ktoré pomôžu odlíšiť pacientov s priaznivou prognózou od pacientov s nepriaznivou prognózou. Naším cieľom bolo monitorovať výskyt vybraných prognosticky významných molekulárných markerov u de novo AML s NK a zhodnotiť ich dopad na priebeh AML u našich pacientov. Vyšetřili sme vzorky kostnej drene alebo periférnej krvi z doby stanovenia diagnózy AML u 65 pacientov s NK. Súbor kuratívne liečených pacientov zahŕňa 54 jedincov (30 žien; 24 mužov; medián veku 55 rokov, rozsah 22–73, medián sledovania 155 týždňov;

medián celkového prežívania 50 týždňov. Skrining zmien v NPM1, FLT3 a MLL génoch bol realizovaný PCR metódami s následnou detekciou zmien kapilárnou, respektíve gélovou elektroforézou. Získané výsledky boli potvrdené sekvenčnou analýzou a v prípade FLT3/ITD konvenčnou PCR špecifickou pre duplikovanú oblasť génu FLT3. Hladina expsie génu BAALC bola stanovená metódou kvantitatívnej RT-PCR. V celkovom súbore 65 pacientov s de novo AML a NK sme zachytili mutácie génu NPM1 (NPM1mut) u 52 % (34/65), FLT3-ITD u 42 % (27/65), zvýšenú expresiu génu BAALC u 31 % (20/65) a MLL/PTD u 2 % (1/65) prípadov. V súbore 54 kuratívne liečených pacientov boli sledované génové zmeny distribuované nasledovne: 50 % (27/54) NPM1mut, 39 % (21/54) FLT3-ITD, 33 % (18/54) zvýšená expresia BAALC, 2 % (1/54) MLL/PTD. Predbežne môžeme v rámci AML s NK vyčleniť 4 prognosticky významné podskupiny: FLT3-ITD+ (6/54); FLT3-ITD+/NPM1mut (15/54); NPM1mut (12/54) a podskupinu bez FLT3-ITD a bez NPM1mut (20/54). Dopad FLT3-ITD a NPM1mut na priebeh ochorenia a prognostický význam BAALC (samostatná zmena u 12/18 prípadov) bude sumarizovaný a prezentovaný v našom príspevku. Naša práca prispieva k stratifikácii pacientov s AML bez cytogenetických zmien, s primárne strednou prognózou, zachytených na našom pracovisku do ďalších prognosticky významných podskupín.
Grantová podpora: MSM 6198959205 a IGA MZ ČR NR/9481-3.

MNOHOČETNÝ MYELOM 2

1269

Léčba mnohočetného myelomu: zaměření na toxicitu léčby nových léků a profylaktická opatření

R. Hájek

Interní hematologická klinika Lékařské fakulty MU a FN Brno, pracoviště Bohunice; Česká myelomová skupina Brno

Úvod: Léčba mnohočetného myelomu (MM) nabízí nemocným díky zavedení autologní transplantace a nových léků (bortezomib, thalidomid a lenalidomid) zásadní zlepšení prognózy. Význam kvality života stoupá s délkou přežití. Jedním ze zásadních aspektů léčby současnosti se stává toxicita léčby. Nevratné vedlejší účinky znamenají trvalé následky a dlouhodobé snížení kvality života. Mimo jiné roztáčí kolo kompenzačních opatření, které znamenají další zátěž. Správnému zacházení s novými léky a s podpornou léčbou se budeme učit několik let. Ve sdělení bude uveden výčet toxicit nových léků a přehled stávajících profylaktických opatření.

Metodika: Z analýz publikovaných studií a mezinárodních doporučení je sestaven edukační panel doporučení týkající se toxicity léků a jejich profylaxe. Panel je doplněn vlastními výsledky z analýz programů České myelomové skupiny (CMG), které jsou zaměřeny na racionalizaci profylaktických opatření.

Výsledky: K dispozici je v roce 2008 několik zásadních profylaktických doporučení při léčbě MM. V rámci doporučení CMG je uplatňováno v reálné praxi základní pravidlo „malá účinnost nebo velká toxicita = nutná změna léčby“. Z profylaktických opatření je účinný program OPP (Osteonecrosis Prevention Program) při použití bisfosfonátů. Profylaktický program herpetické infekce při použití bortezomibu (Velcade) je jediným programem s doporučením optimální dávky. Nezbytné je použití profylaxe tromboembolické nemoci (TEN), zvláště při použití kombinací s antracyklinem, thalidomidem a lenalidomidem. Diskuse a randomizované studie u TEN jsou zaměřeny na určení optimální profylaxe a snížení nákladů na léčbu. Komplikovaná je situace v oblasti neuropatií, u nichž nejsou k dispozici účinná profylaktická léková opatření a toxicita je u části nemocných nevratná. O to větší je zodpovědnost lékaře při výběru vhodné léčby.

Závěr: V rámci optimalizace léčby je nezbytná znalost potenciálních toxicit různých léčebných režimů a znalost dostupných profylaktických opatření. Racionální léčba je zaměřena na maximální léčebnou odezvu, minimální vedlejší účinky a vysokou kvalitu života nemocných s MM. Zohledněny musí být i ekonomické náklady. Optimalizace léčby je dnes složitou záležitostí, která patří do rukou specialistů, kontinuálně vzdělávaných hematologů.

1303

Tromboembolická nemoc u pacientů s mnohočetným myelomem: efekt profylaxe nízkomolekulárním heparinem

P. Kessler, L. Pour, E. Gregora, M. Zemanová, M. Penka, J. Gumulec, Z. Adam, J. Bačovský, M. Brejcha, M. Fenclová, H. Fraňková, K. Havlíková, P. Hausdorf, A. Heindorfer, V. Heinzová, M. Holíková, M. Krejčí, K. Kubáčková, E. Langrová, F. Lehanka, V. Maisnar, I. Meluzínová, Y. Stavařová, J. Straub, A. Svobodník, V. Ščudla, E. Šumná, J. Ullrychová, L. Walterová, R. Hájek

Oddělení hematologie a transfuziologie nemocnice Pelhřimov; Interní hematologická klinika Lékařské fakulty MU a FN Brno, pracoviště Bohunice; Oddělení klinické hematologie FN Královské Vinohrady Praha; III. interní klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc; Oddělení klinické hematologie FN Brno, pracoviště Bohunice; Ústav klinické hematologie FN Ostrava; Mendelovo onkologické centrum Nový Jičín; Hematologicko-transfuzní oddělení nemocnice Kladno; Hematologicko-transfuzní oddělení

nemocnice Třebíč; Hematologická ambulance nemocnice Český Krumlov; Oddělení klinické hematologie nemocnice Liberec; Onkologické oddělení nemocnice Liberec; Hematologicko-transfuzní oddělení nemocnice Opava; Radioterapeuticko-onkologické oddělení FN Motol, Praha; Onkologické oddělení nemocnice Havlíčkův Brod; Oddělení klinické hematologie II. interní kliniky Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové; Hematologicko-transfuzní oddělení nemocnice Boskovice; Oddělení klinické hematologie Baťovy krajské nemocnice Zlín; I. interní klinika 1. lékařské fakulty UK a VFN Praha; Institut biostatistiky a analýz MU Brno; Hematologicko-transfuzní oddělení nemocnice Děčín

Úvod: Význam profylaxe trombotických komplikací při léčbě mnohočetného myelomu v posledních letech vzrůstá, zejména v souvislosti s léčbou thalidomidem, lenalidomidem, pulzním dexametazonem a antracykliny.

Cíle studie: 1. Zjistit výskyt symptomatické tromboembolické nemoci (TEN) v průběhu indukční fáze a stimulace podle protokolu CMG 2002. 2. Vyhodnotit efektivitu použití nízkomolekulárních heparinů (LMWH) na snížení incidence TEN během indukční fáze léčby. 3. Zhodnotit vliv denní dávky LMWH na incidenci TEN.

Soubor a metodika: 253 pacientů s mnohočetným myelomem léčených 4 kúrami VAD nebo VID a následně stimulací 2,5 g/m² cyklofosfamidu. Výskyt TEN byl prospektivně vyhodnocen na základě hlášených nežádoucích účinků. První skupina 137 pacientů byla léčena bez systematické tromboprolaxe. Druhá skupina 86 pacientů byla léčena LMWH v dávce 50–100 IUaXa 1krát denně. Dále ve skupině 104 pacientů léčených v jednom centru, částečně se překrývající se základním souborem, byl vyhodnocen efekt dávky LMWH. Pro statistickou analýzu byl použit χ^2 test.

Výsledky: Bylo zjištěno 11,4 % (29/253) případů TEN: 17krát flebotrombóza, 5krát plicní embolie, 1krát flebotrombóza + plicní embolie, 3krát povrchová flebitida, 3krát trombóza asociovaná s centrálním žilním katétrem. Ve skupině 86 pacientů léčených LMWH byla incidence TEN během indukční léčby významně redukována ve srovnání se 137 pacienty bez systematické tromboprolaxe (1,2 % vs 12,4 %, $p = 0,003$, risk reduction 11,25 %). Incidence velkého krvácení přitom nebyla rozdílná (1,2 % vs 1,5 %, $p = 0,852$). Při vyhodnocení efektu dávky LMWH na výskyt TEN u 104 pacientů byla incidence TEN při dávce > 70 IU/kg 0 % (0/28), při dávce < 70 IU/kg 7,6 % (3/39), u neléčených 15 % (5/35). Rozdíl oproti skupině neléčených byl statisticky významný jen při použití dávky > 70 IU/kg ($p = 0,002$).

Závěr: Trombotické komplikace během indukční léčby a stimulace patří u pacientů s mnohočetným myelomem k významným příčinám morbidit a mortality. Výskytem fatální plicní embolie se tyto pacienti řadí do kategorie vysoce rizikových, a je u nich tudíž plně indikovaná profylaxe

LMWH, který byl prokázán jako účinný a bezpečný, doporučená dávka LMWH je vyšší než 70 IU/kg.

1246

Úspěšná prevence osteonekrózy čelisti během užívání zolendronátu u pacientů s mnohočetným myelomem

L. Pour, Z. Adam, V. Sandecká, V. Peřina, M. Krejčí, A. Křivanová, L. Zahradová, M. Machálka, R. Hájek

Interní hematologicko-onkologická klinika Lékařské fakulty MU a FN Brno, pracoviště Bohunice; Klinika ústní, čelistní a obličejové chirurgie Lékařské fakulty MU a FN Brno, pracoviště Bohunice

Úvod: Bisfosfonáty se používají v léčbě a prevenci osteolytických komplikací. Osteonekróza čelisti (ONČ) je vedlejším účinkem této léčby. ONČ je nejméně 8 týdnů se nehojící defekt čelisti, obvykle po extrakci zubu či jiném stomatochirurgickém zákroku. U pacientů s MM je incidence této komplikace nejvyšší. Uvádíme analýzu „OPP“ programu (Osteonecrosis Prevention Program) – souboru opatření zavedeném v roce 2007, který měl za cíl minimalizovat riziko vzniku ONČ.

Soubor pacientů: V roce 2006 bylo léčeno zolendronátem celkem 43 pacientů s MM a během roku bylo podáno celkem 480 infuzí. Podobně (41; 465 infuzí) v roce 2007. Zolendronát byl podáván v běžném dávkování. Byla porovnána incidence ONČ v roce 2006 a v roce 2007 po zavedení OPP. Soubor opatření sestával z 5 základních principů: 1. stomatologické vyšetření před podáváním bisfosfonátů; 2. vysazení zolendronátu 2 měsíce před extrakcí; 3. antibiotická profylaxe amoxicilin/klavulanát 1 g p.o. 2krát denně 14 dnů při zákroku; 4. výplachy chlorhexidinem do zhojení; 5. pokračování léčby zolendronátem za 2 měsíce po zhojení.

Výsledky: V roce 2006 jsme pozorovali ONČ u 9,3 % (4/43) pacientů léčených zolendronátem. Všichni tito pacienti byli léčeni déle než 1 rok (medián 13 měsíců; rozpětí 12–36 měsíců). Ve 100 % (5/5) případů se ONČ u těchto pacientů vyvinula vždy po vytržení zubu. V roce 2007 nebyla pozorována žádná ONČ (0/41), přestože byla provedena u pacientů s mediánem užívání zolendronátu 14 měsíců (rozpětí 13–38) extrakce zubů u celkem 5 pacientů. U těchto pacientů byla použita výše zmíněná preventivní opatření. Incidence ONČ byla snížena ($p = 0,003$).

Závěr: Incidence ONČ se zvyšuje s délkou podávání bisfosfonátu. Dalším klíčovým faktorem pro vznik ONČ je invazivní zákrok na čelisti. Ale pokud je při zákroku přerušeno podávání bisfosfonátu a je použita antibiotická profylaxe, je incidence ONČ zásadně snížena. Za zcela zá-

sadní považujeme vstupní preventivní vyšetření stavu chrupu stomatologem před podáním bisfosfonátu.

1297

Účinná profylaxe herpes zoster acyklovirem u pacientů s mnohočetným myelomem léčených bortezomibem

L. Pour, Z. Adam, M. Holánek, M. Krejčí, A. Křivanová, V. Sandecká, L. Zahradová, R. Hájek

Interní hematologická klinika Lékařské fakulty MU a FN Brno, pracoviště Bohunice; Masarykova univerzita Brno

Úvod: Reaktivace varicella-zoster viru (VZV) je častou a nebezpečnou komplikací u pacientů s mnohočetným myelomem léčených bortezomibem. Podle dostupných údajů se pohybuje mezi 10 a 30 %. Naše výsledky potvrzují, že profylaxe acyklovirem je efektivní a zabraňuje nebezpečné infekční komplikaci během léčby bortezomibem. **Metody:** V období od prosince roku 2004 do prosince roku 2007 bylo na našem pracovišti léčeno bortezomibem 98 pacientů s relapsem mnohočetného myelomu. Pacienti byli léčeni standardním léčebným schématem se standardním dávkováním (aplikace Velcade den 1, 4, 8, 11 v cyklu trvajícím 21 dnů v dávce 1,3 mg/m²). Pacienti nejprve nebyli léčeni acyklovirem, vzhledem k vysoké incidenci VZV infekce byla zavedena profylaxe acyklovirem v rozdílných dávkách.

Výsledky: Prvních 11 pacientů léčených Velcade na našem pracovišti nežívalo žádnou profylaxi VZV infekce a u 4 z nich (36 %) došlo k reaktivaci VZV ve formě herpes zoster. Klinická manifestace byla zcela typická. Na základě tohoto faktu bylo zahájeno profylaktické podávání acykloviru v dávce 400 mg 3krát denně perorálně po dobu podávání Velcade. U celkem 32 pacientů léčených Velcade a touto profylaktickou dávkou acykloviru nebyla pozorována VZV infekce. Profylaktická dávka acykloviru byla snížena na 400 mg 1krát denně při léčbě Velcade. Tato profylaktická dávka byla použita u 55 pacientů bez nálezu VZV infekce.

Závěr: VZV infekce je častým závažným nežádoucím účinkem při léčbě Velcade a často vede k přerušení léčby a snižuje výrazně kvalitu života. Podle našich skutečností je profylaxe VZV infekce acyklovirem účinná a měla by být podávána všem pacientům s mnohočetným myelomem. Dávka acykloviru 400 mg 1krát denně je v našem souboru pacientů dostatečná k zabránění VZV infekci. Zásadním způsobem tak byla snížena používaná dávka acykloviru a došlo k racionalizaci profylaktické léčby.

1260

Optimalizace kombinovaných režimů CVD (Cyklofosamid, Velcade, Dexametazon) v České republice: pilotní analýza režimů CVD junior a CVD senior s nižším dávkováním u nemocných s relabujícím mnohočetným myelomem

L. Zahradová, L. Pour, Z. Adam, M. Krejčí, V. Sandecká, M. Al-Sahmani, A. Křivanová, D. Králová, R. Hájek

Interní hematologická klinika Lékařské fakulty MU a FN Brno, pracoviště Bohunice; Univerzitní výzkumné centrum – Česká myelomová skupina Brno

Úvod: Zařazení nových léků do léčebné strategie u mnohočetného myelomu znamená pro nemocné zásadně lepší šanci na dlouhodobé přežití. V současnosti probíhá optimalizace jejich použití v rutinní praxi. Cílem je dosažení maximální léčebné účinnosti a minimalizace vedlejších účinků. Zdá se, že standardní dávkování vyžaduje u nemocných se zhoršenou kondicí častější redukci dávek či přerušení léčby. V ČR jsme v roce 2007 odzkoušeli kombinované režimy CVD (Cyklofosamid-Velcade-Dexametazon) s rozdílnou intenzitou pro nemocné s dobrým performance status (CVD junior) a sníženým performance status či starší 65 let (CVD senior). Uvádíme pilotní analýzu jednoho centra, která bude následně rozšířena na analýzu pro celou ČR.

Soubor pacientů: Pilotní analýza zahrnuje 24 (11krát CVD senior; 13krát CVD junior) z celkem 36 nemocných léčených režimem CVD na Interní hematologické klinice LF MU a FN Brno-Bohunice v období od 29. 1. 2007 do 29. 2. 2008, kteří splnili tato kritéria: léčba alespoň 4 cykly nebo přerušení léčby po méně než 4 cyklech z důvodu progresu MM nebo toxicity. Vstupní charakteristika pacientů: medián věku 62,3 let (54,0–77,7); klinické stadium dle DS I (8,3 %)/II (0 %)/III (91,7 %); počet předchozích linií léčby 1 (29,2 %)/2 (58,3 %)/3 (12,5 %). V souboru nemocných s režimem CVD senior byl pozorován jasný trend ($p = 0,6$) k vyšší četnosti stadia 3 dle ISS (50 % vs 9 %) a vyšší předléčenosti (73 % vs 46 % pro 2 předchozí léčby).

Výsledky: Pro režimy CVD senior vs CVD junior byly základní výsledky následující: celková léčebná odezva (ORR = CR + PR) 36,4 % vs 76,9 % zahrnující CR (0 vs 7,7 %), VGPR (9,1 vs 30,8 %) a PR (27,3 vs 38,4 %); léčebná odezva SD 36,4 % vs 2,1 %; progresu 27,2 % vs 0 %; doba do relapsu 5,5 měsíce vs nedosažen. Ve sdělení bude podrobně zhodnocena tolerance a toxicita, rovněž celková

délka léčby a množství nutných přerušení léčby u jednotlivých režimů.

Závěr: Z předběžných výsledků vyplývá, že režim CVD senior je u starších nemocných dobře tolerován, ale jeho léčebná účinnost se zdá ve srovnání se standardním režimem CVD junior nedostatečná. Výsledky mohou být ovlivněny vyšší předléčeností seniorů, kteří mají i prognosticky nepříznivější vstupní parametry (ISS). Rozšířená analýza ze všech center upřesní tato pilotní data.

1265

Nízkodávkovaný thalidomid v léčbě mnohočetného myelomu: stejná účinnost, nižší toxicita

V. Maisnar, J. Radocha, O. Široký

Oddělení klinické hematologie II. interní kliniky Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové

Úvod: Thalidomid je jedním z léků, které jsou nově používány v terapii mnohočetného myelomu. Jeho imunomodulační aktivita a řada dalších účinků byla prokázána jako efektivní v léčbě pokročilého a refrakterního onemocnění, nověji je používán i v rámci primoterapie. Nejvhodnější dávkovací schéma však zatím není známo a je i v současnosti předmětem zkoumání řady klinických studií.

Pacienti a metody: V minulém roce jsme publikovali výsledky retrospektivní studie zaměřené na efektivitu monoterapie nízkodávkovaným thalidomidem (*Eur J Haematol* 2007; 79: 305–309). Námi používané nižší dávky (rozmezí 50–100 mg denně) měly srovnatelnou účinnost s dávkami vyššími při srovnání s výsledky jiných studií. Cílem této naší práce je vyhodnocení výskytu nežádoucích účinků thalidomidu při použití jeho nízkých dávek.

Výsledky: Celkem bylo do analýzy zahrnuto 65 nemocných s mnohočetným myelomem, kteří byli na našem pracovišti léčeni v rozmezí let 2000–2005. Medián věku sledovaného souboru byl 67 let, délka sledovaného období užívání thalidomidu byla 1–66 měsíců (medián 8 měsíců). Thalidomid byl použit převážně v rámci léčby 2. linie (1. relaps nebo primárně rezistentní onemocnění), žádný z pacientů thalidomid nedostával v dřívějším průběhu léčby. Nejčastěji z nežádoucích účinků byly různé známky neurotoxicity, celkem u 25 nemocných, tj. 38 % sledovaného souboru. Pouze u 7 pacientů (10 %) však přitom bylo nutné předčasné ukončení léčby z důvodu výskytu závažných nežádoucích účinků, tj. toxicity stupně 3, resp. 4 dle hodnocení WHO (3krát neuropatie, 1krát alergická reakce, 1krát leukopenie).

Závěr: Thalidomid je velmi účinným lékem v léčbě mnohočetného myelomu. V rámci našeho sledování jsme

prokázali srovnatelnou účinnost nízkodávkovaného thalidomidu s dávkami vyššími. Nespornou výhodou přitom je skutečnost, že podávání nižších dávek thalidomidu vede k podstatnému snížení výskytu jeho nežádoucích účinků.

1162

Dlouhodobé přežití po autologní transplantaci hematopoetických buněk u pacientů s mnohočetným myelomem: zkušenost jednoho centra

M. Krejčí, R. Hájek, Z. Adam, A. Křivanová, L. Pour, L. Zahradová, K. Krésová, J. Mayer, J. Vorlíček

Interní hematologická klinika Lékařské fakulty MU a FN Brno, pracoviště Bohunice

Úvod: Autologní transplantace periferních hematopoetických buněk hraje důležitou úlohu v terapii symptomatického mnohočetného myelomu. Cílem sdělení je analyzovat dlouhodobé výsledky autologních transplantací u MM v našem centru.

Metody: Celkem 141 pacientů s MM bylo transplantováno na Interní hematologickou kliniku LF MU a FN Brno-Bohunice v období let 1996–2002. Jako přípravný režim byl použit mefalan 200 mg/m². Medián věku při provedení transplantace byl 55 let. Medián sledování od provedení transplantace je 8,4 roku (5,1–12,1 let), přitom žije 42 % pacientů (60/141), 23 % pacientů (27/141) žije bez relapsu MM, zemřelo 58 % pacientů (81/141). Ve skupinách zemřelých a žijících pacientů s MM byla analyzována klinická stadia dle Durie-Salmona a dle ISS, typ paraproteinu, typ udržovací léčby, typy léčebné odezvy před a po transplantaci.

Výsledky: Celková léčebná odezva (CR + VGPR + PR) po transplantaci byla 90 % (121/134); u 26 % pacientů (35/134) byla CR, u 43 % pacientů (58/134) VGPR, u 21 % pacientů (28/134) PR. Medián TTP od zahájení terapie byl 40,7 měsíce, medián OS byl 72,6 měsíce. Nejvýznamnějším faktorem pro dlouhodobé přežití bez relapsu MM bylo dosažení CR po transplantaci ($p < 0,001$). Ve skupině 74 zemřelých pacientů byla CR u 12 % (9/74), ve skupině 33 žijících pacientů s relapsem byla CR u 21 % (7/33), ve skupině 27 žijících pacientů bez relapsu byla CR u 70 % (19/27). Dalším statisticky významným faktorem pro dlouhodobé přežití byla klinická stadia dle ISS ($p = 0,002$), v celém souboru 132 pacientů a v podsouboru 27 žijících pacientů bez relapsu bylo zastoupení klinických stadií dle ISS následující: stadium 1: 43 % a 67 %, stadium 2: 41 % a 26 %, stadium 3: 15 % a 7 %. V ostatních klinických parametrech nebyly zjištěny rozdíly mezi skupinami zemřelých a žijících pacientů. Cytogenetické vyšetření bylo provedeno u 59 % (16/27) žijících pacientů bez relapsu onemocnění, všech 16 pacientů mělo normální karyotyp.

Závěr: Při mediánu sledování 8,4 let žije bez relapsu po autologní transplantaci 23 % pacientů (27/141). Charakteristické rysy tohoto souboru jsou: vysoký počet CR po transplantaci (70 %), převažující klinické stadium 1 dle ISS (67 %) a normální karyotyp (59 %).

Práce byla podpořena grantem IGA NR9317.

1345

Zhodnocení přínosu biologické terapie pro prognózu nemocných s mnohočetným myelomem – zkušenosti jednoho pracoviště

V. Ščudla, J. Minařík, M. Zemanová, T. Pika, E. Faber, K. Indrák, J. Bačovský, K. Srovnalík, K. Langová

III. interní klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc; Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc; Hematologické oddělení nemocnice Vsetín; Katedra biofyziky Lékařské fakulty UP Olomouc

Úvod: Mnohočetný myelom (MM) je neobyčejně heterogenní, nevyléčitelné zhoubné onemocnění s individuálně variabilní prognózou.

Cíl studie: Zhodnocení praktického přínosu biologické terapie, tj. podání thalidomidu a bortezomibu v léčbě 2. a 3. linie při rezistenci MM na předchozí terapii.

Materiál a metody: Byly analyzovány 2 soubory MM léčené pouze konvenční chemoterapií (KCH), tj. soubor 1987–1995 (n = 78) a 1996–2007 (n = 294) i soubor 126 nemocných (1996–2007) léčených HD-terapií s transplantací autologních periferních krvetvorných buněk (HDT/ASCT, n = 126). V léčbě relapsu/progrese byla použita terapie thalidomidem s dexametazonem (TD) a většinou i s cyklofosfamidem (CTD), v případě rezistence i bortezomibem s dexametazonem (BD).

Výsledky: V souboru 1987–1995 léčeném pouze KCH bylo celkové přežití (OS) 41 měsíců. Nemocní souboru 1996 až 2007 nesplňující kritéria HDT/ASCT léčení při rezistenci na KCH režimy TD/CTD, případně i BD (n = 61), měli medián OS 61 měsíců. V celém souboru nemocných zahrzených do transplantačního programu včetně nemocných zemřelých již v indukční/předtransplantační fázi (n = 126) byl medián OS 76 měsíců. V sestavě nemocných léčených v případě relapsu/progrese po HDT/ASCT režimy TD/CTD případně BT (n = 49) byl medián OS 101 měsíců. Nemocní léčení dvojitou HD/ASCT a v případě relapsu/progrese režimy TD/CTD, případně BD (n = 32) měli kratší přežití nežli nemocní léčení režimy TD/CTD a BD (n = 80) již při 1. relapsu nebo progresi MM po 1. HDT/ASCT (OS 67 vs x měsíců).

Závěr: Z analýzy vyplynulo, že použití biologických působků, tj. thalidomidu a bortezomibu v léčbě relapsu/progrese MM, významně zlepšilo prognostický výhled a celkové přežívání nemocných léčených jak pouhou KCH, tak i HDT/ASCT.

Podpořeno VVZ 6198959205, IGA NR 9500.

SYMPOSIUM ON MOLECULAR HEMATOLOGY – STEM CELLS

1335

Wnt signaling in hematopoiesis

L. Doubravská, J. Lukáš, V. Kořínek

Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i., Praha

The Wnt gene family encodes 20 secreted proteins that act as morphogens during embryonic development and also in adult tissues. The interaction of Wnt ligand with the membrane Frizzled-LRP receptor complex triggers in the target cell cascades of intracellular molecular events called canonical or non-canonical Wnt signaling. Interestingly, the definite outcome of the binding Wnts to their receptors, i.e. canonical versus non-canonical signaling, depends on the cellular context, and also on the specific combination of the Frizzled (10 members in mammals) and LRP (2 proteins). Canonical Wnt signaling – in contrast to the non-canonical one – stabilizes β -catenin in the cytoplasm of the target cells. Accumulated β -catenin enters the cell nucleus where it associates with the TCF/LEF transcription factors and activates expression of a specific set of genes – for example Cyclin D1, c-myc, c-jun. The ability to exit reversibly the cell cycle is an important feature of all stem cell types and it is connected to the self-renewing capacity of the adult tissues. Recently, it has been documented that canonical Wnt signaling is necessary to maintain hematopoietic stem cells (HSCs) in a state of quiescence *in vivo*. On the other hand, Wnt signaling does not influence differentiation of HSCs to multiple hematopoietic lineages as demonstrated by normal development of all types of blood cells in mutant mice with conditioned deletion of the β -catenin gene. In our research we focus mainly on post-translational modifications of Wnt proteins and the influence of these modifications on signaling and morphogenic properties of individual Wnt ligands. Despite the fact that the Wnt signaling pathway is probably the most studied cellular process of current molecular and cellular biology, the data about biochemical features of Wnt polypeptides remains elusive. This is rather surprising – and encouraging – as the Wnt-receptor interaction is the „trigger“ of the entire signaling mechanism.

1241

Snf2h regulates heterochromatin structure and global transcription in blood cells**J. Podskočová, K. Vargová, J. Kokavec, V. Pospíšil, I. A. Skoultchi, T. Stopka***Ústav patologické fyziologie 1. lékařské fakulty UK, Praha; AECOM, Yeshiva University, New York, USA*

Role of SWI/SNF2 family in oncogenesis is established by studies in both mouse models and human patients. Snf2h belongs to SWI/SNF2 family of histone- and DNA-binding proteins that at expense of ATP hydrolysis regulates structure of nuclear chromatin. Knockout mice of Snf2h are embryonic lethal and heterozygotes display mild growth retardation (Stopka 2003). We used confocal laser scanning microscopy and demonstrate that Snf2h heterozygous cells derived from embryonic, hematopoietic and germinal cells display defects in global histone modification including histone H3K79 hypomethylation. H3K79 trimethylation is a chromatin mark associated previously with active transcriptional elongation. In addition, significant defects are found in Snf2h heterozygous heterochromatin structure and indicate that Snf2h has important role in the nucleosome assembly, a finding supported by studies in *Drosophila* (Fyodorov 2004). Snf2h is highly expressed in normal and leukemic blasts and its role has been implicated in cytokine-induced erythroid differentiation. By using experimental hemolysis we demonstrate that both Snf2h wild type and heterozygous mice induce erythropoiesis similarly. However, significant amount of Snf2h compensation from wild type allele was observed in Snf2h heterozygotes. Collectively, our data demonstrate role of Snf2h in gene transcription regulation and chromatin assembly during embryonic development and hematopoietic differentiation.

1348

Human embryonic stem cells: stable or vulnerable?**A. Hampl, Z. Holubcová, T. Bárta, Š. Pospíšilová, J. Verner, D. Doležalová, V. Vínarský, P. Dvořák***Oddělení molekulární embryologie Ústavu experimentální medicíny Akademie věd ČR, v.v.i., Praha; Biologický ústav Lékařské fakulty MU Brno; Ústav experimentální biologie Přírodovědecké fakulty MU Brno; Fakultní nemocnice Brno, pracoviště Bohunice*

Human embryonic stem cells (hESC) are immature cells derived from human blastocyst-stage embryos that can be indefinitely propagated in culture and can also be induced to differentiate into all mature cell types with special function. These two abilities, to self-renew and to differentiate, make hESC attractive tool for cell replace-

ment therapy, drug development, and toxicology. One of the key criteria that have to be met before hESC are used for therapy is a certainty that the cells are void of any risk of unpredictable behavior. Among such behaviors, deregulated growth of hESC derivatives upon their transplantation to the patient is the most hazardous one. Several studies have recently reported accumulation of various types of alterations to DNA of hESC that have been propagated in culture for prolonged periods of time. What types of stress induces such damage, contribution of hESC line genotype, what are the biological outcomes of such damage, and many other questions remain to be answered. We have recently begun addressing some of the issues related to the genomic instability of hESC. As numerical and structural abnormalities of centrosomes contribute to chromosomal instability in many cancers, we have assessed the metabolism of centrosomes in hESC. We have found in several independent cells lines that undifferentiated hESC are typical by unusually high frequency of mitoses with the number of centrosomes exceeding two. Labeling for gamma tubulin demonstrated that most of these supernumerary centrosomes in fact participated in formation of multipolar spindles. Importantly, although centrosome amplifications occur in high frequency (10–30 %) in hESC in early to mid passages they become suppressed in hESC in later passages (less than 5 %). We have also found that culture conditions, mainly ability of hESC to appropriately adhere to the culture substratum, influence the overamplification of centrosomes. Several molecules have been previously shown to drive amplification of centrosomes in normal cell cycle. We have found that at least two of them, Aurora A and CDK2, are overabundant and highly active in undifferentiated hESC and may thus contribute to the observed abnormalities. This is supported by the fact that chemical inhibition of CDK2 in hESC reduces the percentage of mitoses with supernumerary centrosomes. Both the integrity and number of centrosomes seem to be monitored by signaling pathways that employ established molecules involved in sensing and executing response to DNA damage. Here we show that at least some components of such pathways are developed and operative in hESC. Upon DNA damage induced by UVC-irradiation damage, hESC accumulate p53 protein that is capable of transactivation of its target genes (p21, GADD45, mdm2). UVC-irradiated hESC also phosphorylate Chk2, degrade their CDC25A phosphatase, and, according to at what stage of cell cycle hESC are exposed to DNA damaging insult, delay their cell cycle in G1 or G2/M phase. In summary, we demonstrate that although undifferentiated hESC possess some protective mechanisms to maintain its DNA pristine, they still develop conditions that are favorable to generation of genetic abnormalities. We

propose that understanding of mechanisms involved in harboring early alterations to genome of originally genetically normal hESC, and their link to the changes in their phenotype in particular, will shed some light on initial steps of carcinogenesis.

This study was supported by Grant Agency of the Czech Republic (301/05/0463), by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (1M0538, MSM0021622430), by the Academy of Sciences of the Czech Republic (AVOZ50390512, 1QS500040507, AVOZ50040507, AVOZ50040702), by Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic (NR/9293-3/2007) and by student research grant of Masaryk University 20071431e0015.

1338

In mouse embryonic stem cells, Cdk2 does not localize to the nucleus but its activity contributes to a very short G1 phase

Z. Koledová, L. Rasková-Kafková, L. Calabková, A. Krämer, V. Divoký

Ústav biologie Lékařské fakulty UP Olomouc; Internal Medicine V, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany; Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc

Cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) is the major regulator of G1/S transition and the target of activated G1 checkpoint in somatic cells. Cell cycle regulation in embryonic stem (ES) cells is distinctive from that of somatic cells. Among other differences, ES cells have very short G1 phase and do not arrest in G1 after DNA damage. Published studies suggested G1 checkpoint pathways in ES cells might be impaired. In this study, we show in two studied mouse ES (mES) cell lines, V6.5 and HM1, both G1 checkpoint pathways, the p53-p21 and the Chk2-Cdc25A, are functional in mES cells. They are activated in response to DNA damage induced by gamma irradiation. However, we detected they did not lead to abrogation of Cdk2 activity in mES cells, as they did in control fibroblast cell line NIH3T3. We hypothesized this might be due to distinctive localization of cell-cycle regulatory proteins in mES cells. We report for the first time that Cdk2 is exclusively localized to centrosomes and is not present in mES cell nuclei at any cell cycle phase. In our experiments Cdk1 does not overtake the function of Cdk2 in mES cells as has been reported in Cdk2-deficient cells. Cdk1 does not localize to nuclei of interphase mES cells and Cdk1 is not the target of activated G1 checkpoint in mES cells as its activity is not abrogated after DNA damage in G1 phase in mES cells. With Cdk2 being localized on centrosomes, we questioned its role in G1 phase regulation in mES cells. Therefore, we underwent studies with a Cdk2 inhibitor, olomoucine II. Treatment of mES cells

with concentrations of olomoucine II that inhibit Cdk2 but not Cdk1 activity increases the proportion of G1 phase cells in culture. In synchronized mES cells we demonstrate this cell-cycle profile change is due to elongation of G1 phase after olomoucine II treatment. Inhibition of Cdk2 with olomoucine II slows down the G1 phase progression and delays S phase entry of synchronized mES cells. We conclude, even being exclusively centrosomal, Cdk2 plays an important role in rapid G1 phase progression of mES cells.

Grant support: 2B06077 (MSMT CR); NR/9508 (IGA MZ CR).

1224

To the computer assisted heterochromatin densitometry of lymphocytes

K. Smetana, P. Otevřelová, H. Klamová, I. Jirásková, I. Kalousek

Ústav hematologie a krevní transfuze Praha

According to recent studies heterochromatin in central „gene rich“ and peripheral „gene poor“ nuclear regions – disregarding the gene expression – represents chromosomal territories in interphase nucleus. In central nuclear regions they appear as chromocenters and perinucleolar or nucleolus associated chromatin. The computer assisted densitometry of single lymphoblasts and mature lymphocytes indicated a higher and similar heterochromatin density in central nuclear regions. In contrast, the heterochromatin density in the nuclear peripheral regions at the nuclear membrane was significantly smaller in lymphoblasts and significantly larger in mature lymphocytes. The blastic transformation of stimulated lymphocytes produced a fluent decrease (decondensation – unraveling) of the heterochromatin density in peripheral nuclear regions at the nuclear membrane but the heterochromatin density in central nuclear regions did not change. Thus the heterochromatin regions at the nuclear membrane appear to be important not only for the cell differentiation and maturation but also for the „dedifferentiation“ of stimulated cells.

The present study was supported by the Research Project VZ 00032373601 of the Ministry of Health of the Czech Republic.

ANÉMIE

Hepcidin, DMT1, and other newly discovered participants of iron metabolism. How this new knowledge change the practice of hematology

J. T. Prchal

University of Utah, School of Medicine, Salt Lake City, USA

TEXT SDĚLENÍ NEDODÁN

1332

Současný pohled na diagnostiku a léčbu anémie chronických chorob

V. Ščudla

III. interní klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc

Anémie chronických chorob (ACD) je většinou mírná, normochromní, normocytová hypoproliferativní anémie, jde o nejčastější chudokrevnost u hospitalizovaných osob. Provází především infekční, zánětlivé, imunopatologické a neoplastické choroby, lze ji zaznamenat ale i u úplavice cukrové a závažných traumatických, pooperačních a septických stavů jako tzv. „anémii kritických stavů“ („akutní“ varianta ACD). V patogenezi ACD se uplatňuje především snížená produkce červených krvinek v důsledku nízké proliferace a zvýšené apoptózy erytroidních prekurzorů neschopných adekvátní reakce na tíži anémie (inhibiční vliv IL-1, TNF, IFN- β/γ), snížení produkce i vnímavosti k EPO a zčásti i zkrácené přežívání erytrocytů. Významnou roli hraje dysregulace homeostázy železa s poruchou jeho reutilizace s nadměrným uskladněním v elementech Mo-Ma systému vedoucím k jeho funkčnímu nedostatku pro syntézu hemu. Příčinou uvedené poruchy je nadprodukce hepcidinu, přirozeného regulátoru oběhu Fe v organizmu, včetně absorpce z GIT a utilizace z tkáňových makrofágů. ACD je nejčastěji zaměňována za anémii z nedostatku železa, od níž se odlišuje zvýšenou hodnotou S-feritinu, poklesem hodnoty transferinu i vazebné kapacity séra pro Fe, nízkou koncentrací solubilního transferinového receptoru (sTfR) včetně nízké hodnoty TfR/feritinového indexu. Při použití Perlsovy reakce lze prokázat normální nebo i zvýšený stav zásobního Fe v Mo-Ma systému s chyběním sideroblastů v kostní dřeni. Kauzální terapií ACD je úspěšná léčba základního onemocnění, ojedinelé je nezbytný krevní převod a výběrově terapie rHuE-PO, vyžadující v případě saturace transferinu < 20 % a S-feritinu < 100 ng/ml současnou suplementaci železem.

Podpora VVZ 6198959205.

1350

Diamondova-Blackfanova anémie ve světle nových poznatků

D. Pospíšilová, R. Čmejla, J. Čmejlová

*Dětská klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc;**Ústav hematologie a krevní transfuze Praha*

Charakteristika onemocnění: Diamondova-Blackfanova anémie (DBA) patří vedle Fanconiho anémie k nejnámějším vrozeným poruchám hematopoézy. Je charakterizována normochromní makrocytární anémií, retikulocytopenií, normocelulární kostní dřeni se selektivním nedostatkem erytroidních prekurzorových buněk, normálním nebo lehce nižším

počtem leukocytů a normálním nebo lehce vyšším počtem trombocytů. U 25–50 % pacientů jsou popisovány vrozené anomálie (anomálie kraniofaciální oblasti a krku, anomálie palcového paprsku na horních končetinách, anomálie srdce, ledvin a skeletu). Incidence je udávána v rozmezí 4 až 7 případů na 1 milion živě narozených. Dosud bylo popsáno více než 800 případů onemocnění. Vyskytuje se u obou pohlaví a u všech ras. U pacientů s DBA je popisováno zvýšené relativní riziko vzniku maligního onemocnění (6 %).

Etiologie a patogeneze: Přestože DBA byla poprvé popsána v roce 1936 Josephsem, její etiologie byla objasněna až po roce 2000. Nález mutací v ribozomálních proteinech (RP) u pacientů s DBA byl jedním z nejzajímavějších objevů v hematologii v posledních letech. U 25 % pacientů je mutován gen pro RPS19, u 2 % pacientů se jedná o mutace v genech pro RPS17 a RPS24; tyto proteiny jsou součástí malé ribozomální podjednotky. Nejnověji byly u dalších 20 % pacientů nalezeny mutace v genu pro RPL5, u 7 % v genu pro RPL11 a u několika pacientů též v RPL35a; tyto proteiny jsou součástí velké ribozomální podjednotky. U necelé 1/2 pacientů není genetická podstata onemocnění zatím známa, ale očekává se, že se bude také jednat o mutace v dalších proteinech spojených s proteosyntézou. Mutace v těchto proteinech ovlivňují účinnost celého proteosyntetického aparátu, a vedou tak ke snížení úrovně proteosyntézy. Pravděpodobným výsledkem snížené proteosyntézy je nedostatečná produkce řady klíčových proteinů nezbytných pro diferenciaci a proliferaci buněk. Předpokládá se, že různé tkáně jsou různě citlivé na sníženou úroveň proteosyntézy. Nedostatečná syntéza proteinů se projevuje zejména ve tkáních s rychlým obrátem proteosyntézy, jako je zejména erythropoéza. Vliv mutací na vznik různých vrozených anomálií přítomných u pacientů s DBA nebyl dosud jednoznačně objasněn. DBA se tak stala prvním onemocněním v hematologii způsobeným poruchou funkce ribozomů.

Klinické a laboratorní nálezy: V klinickém obraze dominují příznaky anémie (bledost, letargie, zvýšená dráždivost až projevy srdečního selhání). Anémie bývá patrná ihned po porodu nebo se objeví v prvních 6 týdnech života. Je obvykle těžká a vyžaduje aplikaci transfuze erytrocytární masy. 15–25 % novorozenců s DBA se rodí s nízkou porodní hmotností. U 30–40 % pacientů jsou přítomny vrozené anomálie uvedené výše. U 30–40 % pacientů je popisován malý vzrůst. U pacientů závislých na podávání transfuzí je klinický obraz výrazně ovlivněn příznaky organového poškození při přetížení organismu železem, jejichž závažnost závisí na způsobu vedení chelatační léčby. Těhotenství pacientek s DBA je vždy považováno za rizikové. U více než 40 % těhotných dochází ke zhoršení průběhu základního onemocnění se zvýšením nároků na podávání transfuzí, které je připisováno hormonálním změnám. Pacientky léčené kortikoidy jsou navíc ohroženy

vznikem hypertenze a diabetu. Makrocytóza erytrocytů se u většiny pacientů nachází až po 1. roce života, retikulo-cytopenie je obvykle přítomna již u novorozenců. Kostní dřevina je normocelulární, erytroblasty jsou však výrazně redukovány nebo zcela chybí. U 5–10 % pacientů může být počet proerytroblastů v kostní dřevině jen lehce snížený, nebo dokonce normální. Asi u 20 % pacientů se po několika letech trvání onemocnění objevuje leukopenie. U pacientů je obvykle přítomna výrazně zvýšená hladina erythropoetinu, zvýšená hladina hemoglobinu F s jeho heterogenní distribucí, zvýšená exprese i-antigenů na erytrocytech. Je popisována zvýšená hodnota aktivity erytrocytárních glykolytických enzymů, enzymů hexozomonofosfátového zkratu a zvýšená aktivita erytrocytární adenosindeaminázy (ADA).

Léčba: Léčbou první volby i dnes zůstávají kortikosteroidy. Cílem jejich podávání je dosažení co nejmenší obdenní dávky, která udrží hladinu Hb ve stabilním rozmezí dovolujícím pacientům normální aktivitu. Pokud není patrný příznivý efekt dávky nižší než 0,5 mg/kg a den, kortikoidy se vysazují vzhledem k závažnému riziku vedlejších účinků. 50 % pacientů zůstává závislých na kortikoidech. Asi u 20 % pacientů s dobrou odezvou na kortikoidy může i po několika letech dojít k nástupu remise a kortikoidy mohou být vysazeny. Při rezistenci na léčbu kortikoidy (asi 30 % pacientů) je indikováno pravidelné podávání transfuzí erytrocytární masy. Nedílnou součástí léčby pacientů na pravidelném transfuzním programu jsou chelátory železa (deferaxamin, deferasirox). Jedinou kauzální léčbou onemocnění je transplantace kostní dřeviny. U malé části pacientů byl popsán příznivý efekt kyseliny valproové, cyklosporinu A, metoklopramidu a leucinu.

Prognóza onemocnění: Závisí na léčebné odezvě na kortikoidy. Po zavedení léčby kortikoidy se zvýšil medián přežití pacientů na 42 let z původních 19 let u neléčených pacientů. Kvalita života pacientů v remisi a pacientů léčených malými obdenními dávkami kortikoidů je obvykle velmi dobrá. Pacienti závislí na podávání transfuzí jsou léčeni podobně jako pacienti s thalasemia major, jejich kvalita života je proto srovnatelná. Vedle rizika senzibilizace a přenosu virových infekcí je limitujícím faktorem přežití stupeň přetížení železem s rizikem rozvoje těžké orgánové hemosiderózy. Dlouhodobé přežití je dnes vzhledem k možnostem podávání chelátorů železa výrazně prodlouženo.

Diferenciální diagnóza: Vyžaduje vyloučení všech ostatních příčin aplazie erythropoézy, což u dětí obvykle nečiní problémy. U dospělých, u kterých je škála příčin aplazie erythropoézy nesrovnatelně širší, může být odhalených vzácných případů DBA s mírnou formou makrocytární anémie obtížné. Důležitým diagnostickým vodítkem může být nález mutací genů pro RP.

1349

Anémie a poruchy metabolismu železa

T. Lipšic

Hematologické a transfuziologické oddelenie Kliniky laboratórnej medicíny – OÚSA, VŠZaSP Lekárskej fakulty UK Bratislava, Slovenská republika

Zamyslenie – úvod: Dva z najčastejších prvkov na zemi – železo a kyslík – sú pre život esenciálne. Železo (Fe) ovplyvňuje esenciálne procesy v celom organizme – integritu a funkciu substancí, enzýmov, organel, buniek, tkanív a orgánov – pôsobí in situ alebo prostredníctvom iných dejov. Niektoré kombinácie železa a kyslíku, v čase a priestore, sú však pre biologické subjekty a deje poškodzujúce, toxické až likvidačné. Anémia – znížená väzobná kapacita krvi pre kyslík – je veľmi často následkom alebo príčinou poruchy metabolismu železa. Sekvenciu porúch metabolismu Fe a anémie často modifikujú pridružené patologické mechanizmy iných tkanív, orgánov a funkcií, ktoré boli spôsobené prvotnou alebo následnými poruchami. Vyššie uvedené súvislosti viedli k myšlienke tejto prednášky – „neklasicky“ popísať a hodnotiť to, čo plynule, vertikálne aj horizontálne, na úrovni substrátov, molekúl, buniek, tkanív, orgánov a regulačných mechanizmov v biologickom čase a priestore komplexne a kontinuálne jestvuje.

Klasifikácia: Etiologické skupiny nedostatku aj nadbytku železa tvoria poruchy príjmu (diéty), absorpcie, transportu, skladovania, výdaju a využitia, ako aj poruchy regulácie jeho metabolismu v rôznych kompartmentoch a väzbách metabolismu, solitárne alebo kombinované: (a) deficit železa – deficitný príjem, straty krvi, zvýšené nároky na železo; (b) relatívny deficit (funkčného) železa – anémie chronických ochorení (infekcie, zápal, malignita); (c) nadbytok železa – talasémia, hemoglobino-patie, enzymopatie, vrodené a získané dyserythropoetické, aplastické a sideroplastické anémie, porfýria, hemochromatóza, iné vrodené poruchy metabolismu Fe, myelodysplastické syndrómy, hepatopatie, potransfuzne hemosiderózy, stavy po TKD, off-leukemia stavy, diétny nadbytok Fe.

Frekvencia: Frekvencia anémií s poruchami metabolismu železa je veľmi vysoká. Ide o najčastejšie skupiny anémií, ale aj o najčastejšie ochorenia vôbec: (a) deficit Fe, frekvencie je vysoká – 14 % celosvetovej populácie so značnými regionálnymi výkyvmi; (b) relatívny deficit Fe pri anémii chronických ochorení má frekvenciu 5 %; (c) nadbytok Fe, globálna frekvencia nie je známa, rámcové čísla vychádzajú z frekvencie vrodených porúch metabolismu železa (0,4 %), talasémii (4 %), hemoglobino-patií (< 1 %), hemolytických anémií (< 1 %) a ochorení vyžadujúcich

chronickou substituční hemoterapii celkovo > 8 %; (d) jiné poruchy (primárne) metabolismu Fe, frekvencia je veľmi nízka.

Patogenéza: Regulácia metabolismu železa a sekvencia špecifických látok a dejov pri fyziologických podmienkach zabezpečuje jeho dostatok, dostupnosť, utilizáciu a bezpečnosť – ochranu pred toxickými účinkami. V rámci metabolismu vystupujú substancie prvej ako aj ďalších línií regulácie absorpcie, intra- a extracelulárneho transportu, transmembránového prechodu, intracelulárneho metabolismu, skladovania, výdaju a utilizácie. Rámcovo ide o poruchy vo zmysle zvýšenia alebo zníženia príjmu, absorpcie, transportu, skladovania, výdaju a regulácie. „Prevládnutie“ abnormálnej situácie nad kompenzačnými a regulačnými mechanizmami alebo poruchy regulácie vedie k závažnej patológii metabolismu železa, erytrónu, iných tkanív, orgánov a často k vytvoreniu ďalších patologických mechanizmov. (a) absolútny nedostatok železa vedie priamo k poruchám hemopoézy, menovite erytropoézy, poruche enzýmov, buniek, tkanív, funkcií skoro všetkých orgánov a systémov. (b) relatívny nedostatok železa (funkčného) má za následok nielen poruchy vyššie popísané, ale aj sekvenciu patogenetických mechanizmov spúšťaných etiologickým zápalovým, infekčným alebo malígnym agens, menovite aktiváciu makrofágového fagocytujúceho systému, patologickú produkciu cytokínov, supresiu erytropoézy a poškodenie erytrocytov. (c) nadbytok železa spôsobuje priame toxické poškodenie a deštrukciu lipidov, proteínov, ribonukleových kyselín, enzýmov, buniek a ich organel vo všetkých exponovaných tkanivách a orgánoch, vrátane tkaniva krvotvorného. (d) anémia „per se“, primárna alebo sekundárna pri poruche metabolismu Fe, spôsobuje poruchy funkcií a integrity tkanív/orgánov, poruchy metabolismu, imunity, koncepcie, vývoja a zníženie kvality života.

Diagnostika: Cieľom je komplexná sekvencia: základná diagnostika – detekcia poruchy – etiologická diagnostika – určenie stupňa poruchy – stanovenie adekvátnej terapie – monitorovanie priebehu ochorenia a efektu terapie. Klinická diagnostika: základným predpokladom je cieleňá anamnéza a podrobné somatické vyšetrenie. Laboratórna diagnostika: (a) základné hematologické vyšetrenia; (b) markery železa v sére – profil; (c) markery zápalu, infektu a tumorov; (d) základné orgánové profily – hepatálny, renálny. V prípade potreby: (e) vitamín B₁₂, foláty, EPO; (f) iné hematologické vyšetrenia: imunohepatologické, hemostaeologické; (g) špeciálne vyšetrenia: analýzy Hb, netransferínové Fe, hepcidín, cytokíny, genetické. Inštrumentálna diagnostika: (a) USG vyšetrenie (hepar, lien); (b) MRI vyšetrenia (hepar, cor); (c) biopsia (hepar) a určenie obsahu Fe (LIC); (d) magnetická susceptometria – SQUID; (e) rádioizotopové vyšetrenie ferokinetiky, erytrokinetiky, určenie celotelového Fe.

Terapia: Liečba vychádza z 2 základných situácií, nedostatku a nadbytku železa. Má byť ako pri každom ochorení primárna – kauzálna a sekundárna – symptomatická: (a) pri nedostatku Fe: zvýšený príjem diétou, adekvátna substitúcia Fe (iných súčasných deficitov), sanácia zdrojov strát; (b) pri nadbytku Fe: zníženie príjmu, terapia hyperhemolýzy a inefektívnej erytropoézy, chelácia/exkrécia Fe. **Záver:** (a) železo je „dobrý sluha a zlý pán“ – nedostatok aj nadbytok majú závažné následky; (b) anémia začína alebo končí primárne alebo sekundárne poruchou metabolismu železa a naopak nedostatok železa vždy a nadbytok často anémiou začínajú alebo pokračujú; (c) frekvencia a závažnosť týchto porúch by mala byť prioritným problémom pre program zdravia.

TRANSPLANTACE KRVETVORNÝCH BUNĚK

1276

Vliv polymorfizmů interleukinu-6 (IL-6) a monocytárního chemotaktického proteinu (MCP-1) na výsledky alogenních transplantací krvetvorných kmenových buněk

L. Raida, K. Langová, J. Pretnar, B. Vidan-Jeras, V. Koza, P. Jindra, F. Mrázek, M. Petřek, Z. Ambrůzová, K. Indrák, E. Faber

Katedra biofyziky Lékařské fakulty UP Olomouc; University Clinical Centre, Ljubljana, Slovenia; Blood Transfusion Center of Slovenia; Hematoonkologické oddělení FN Plzeň; Ústav imunologie Lékařské fakulty UP a FN Olomouc; Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc

Úvod: Vliv polymorfizmů různých cytokinových genů na výsledky alogenních transplantací krvetvorných kmenových buněk (SCT) je v posledních letech intenzivně studován, a to zejména v souvislosti s rozvojem nemoci štěpu proti hostiteli (GvHD), která významně ovlivňuje morbiditu a mortalitu.

Cíl studie: Zhodnotit vliv polymorfizmů IL-6 (IL-6-174, IL-6-nt565) a MCP-1 (MCP-1-2518, MCP-1-2076) příjemce i dárce na rozvoj akutní a chronické GvHD, relaps nádoru a mortalitu, a to při využití přípravných režimů různé intenzity.

Soubor nemocných a metody: Byla analyzována data 138 nemocných po alogenní SCT od HLA-identického dárce. 131 (95 %) bylo transplantováno pro diagnózu hematologické malignity, 64 (46 %) po přípravném režimu s redukovanou intenzitou (RIC). Medián sledování souboru byl 17 (0–97) měsíců. Remise onemocnění po SCT byla dosažena u 120 pacientů (87 %), s relapsem u 30 z nich (25 %) měsíců po SCT. K rozvoji akutní a chronické

GvHD došlo u 54 (39 %), resp. 48 (35 %) příjemců. Bylo zaznamenáno 72 úmrtí (52 %). Vliv cytokinových polymorfizmů příjemce a dárce na rozvoj GvHD, relapsu a mortalitu byl hodnocen metodami univariační a multivariační analýzy z hlediska zastoupení alel IL-6-174*G, IL-6-nt565*G, MCP-1-2518*G a MCP-1-2076*T.

Výsledky: Univariační ani multivariační analýza nepotvrdily signifikantní vliv studovaných polymorfizmů na rozvoj akutní GvHD, incidenci relapsů malignit a riziko úmrtí po SCT. Pouze manifestace IL-6-nt565*G alely u příjemců byla identifikována jako nezávislý faktor zvyšující riziko rozvoje chronické GvHD (OR 3,251; 95 % CI 1,073–9,848; $p = 0,037$).

Závěry: Na uvedeném souboru nemocných nebyl potvrzen zásadní potransplantační prognostický význam polymorfizmů uvedených cytokinů. I přes statistický průkaz vlivu polymorfizmu IL-6-nt565 příjemce na rozvoj chronické GvHD, jejíž manifestace jinak signifikantně snižuje riziko relapsu nádoru a úmrtí, přítomnost IL-6-nt565*G alely nijak nezměnila tyto nejdůležitější parametry hodnocení výsledku SCT.

Práce byla podpořena výzkumným záměrem MŠMT ČR MSM-6198959205 a grantem IGA MZD ČR NR-9099.

1305

HLA inkompatibilní pupečnicková krev jako alternativní zdroj kmenových buněk pro dětské pacienty indikované k HSCT

M. Vraná, M. Dobrovolná, P. Sedláček, L. Kupková
Národní referenční laboratoř pro DNA diagnostiku Ústavu hematologie a krevní transfuze Praha; Klinika dětské hematologie a onkologie 2. lékařské fakulty UK a FN Motol, Praha; Český registr dárců kostní dřevě Praha

Provedení transplantace hematopoetických kmenových buněk (HSCT) jako terapeutické metody je limitováno nalezením vhodného dárce. Vzhledem k demografickému vývoji i pro české dětské pacienty, indikované k HSCT ve FN Motol, klesá podíl HLA shodných sourozenců a je nutno hledat v širší rodině či HLA shodné nepříbuzné dárce z registrů. Tam, kde takový není nalezen, je třeba zvažovat transplantaci od alternativních dárců s HLA neshodami. Mezi tyto alternativní zdroje patří i pupečnicková krev (CB). Během let 1995–2007 bylo na dětské klinice FN Motol transplantováno 14 pacientů s podáním nepříbuzenských pupečnickových krví, což je téměř 10 % z provedených HSCT. Tato skupina se skládala z 12 podání štěpů od jednoho dárce a 2 double-cord transplantací. Pro pacienty z této skupiny bylo po vyhledání v registrech testováno více nepříbuzných dárců (od 1 do 7). U žádného z nich nebyla nalezena dostatečná shoda v HLA systému. Proto byla zvolena pupečnicková krev ja-

ko alternativní zdroj kmenových buněk. HLA shoda mezi pacientem a podanou pupečnickovou krví byla následující: 6/6 (HLA-A, B low res.; DRB1 high res.) v jednom případě, 5/6 v 10, 4/6 ve 3 případech. Po rozšíření HLA genotypizace na 10 znaků (v lokusech HLA-A, -B, -Cw, -DRB1, -DQB1) bylo nalezeno od 1 do 5 neshod mezi pacientem a jeho dárce. Vedle HLA shody je zásadním faktorem i množství podaných jaderných buněk. Medián dávky podaných jaderných buněk byl vysoký ($7,4 \times 10^7/\text{kg}$; 3,5–25,2) při mediánu hmotnosti pacientů 13,6 kg. U všech transplantovaných bylo dosaženo přihojení štěpu, plný dárcovský chimérimus byl zaznamenán u 13/14. Akutní GvHD (maximální stupeň II) byla zjištěna u 7/14. V současnosti přežívá 9 pacientů (EFS 64 %) 0,2–6,8 let po CBT (Medián 1,1 roku). Dva pacienti zemřeli na komplikace v souvislosti s transplantací (0,1–1,3 roku po CBT), 3 na relaps leukemie (0,3–2,2 roku po CBT). Ani dlouhodobé sledování klinické úspěšnosti těchto transplantací nedokázalo podat jednoznačné odpovědi na otázky HLA shody či příznivých neshod. Možná, že nové poznatky přinese současná aplikace 2 CB s různými HLA akceptovatelnými neshodami. Přesto zůstává nadále pupečnicková krev alternativním zdrojem HSC vhodným zvláště pro dětské pacienty.

1180

Alogenní transplantace po redukované přípravě u AML mimo kompletní remisi – potenciální vliv časného ukončení imunosuprese

M. Karas, V. Koza, K. Steinerová, P. Jindra, T. Svoboda
Hematoonkologické oddělení FN Plzeň

Úvod: Alogenní transplantace po redukované přípravě (RIT) zlepšuje prognózu nemocných s rizikovou AML, ale dle publikovaných dat má RIT provedená mimo kompletní remisi (CR) AML vysoké riziko relapsu. Potenciálním ovlivněním rizika relapsu AML po RIT je možnost posílení reakce štěpu proti leukemii (GvL) časným ukončením imunosuprese, ovšem s možnou vyšší transplantační mortalitou (TRM) při riziku rozvoje nemoci z reakce štěpu proti hostiteli (GVHD). Ve sdělení shrnujeme výsledky RIT s časně ukončenou imunosupresí u nemocných s AML mimo CR na našem pracovišti.

Pacienti a metody: Od ledna roku 2002 do ledna roku 2008 14 pacientů s AML mimo CR a mediánem věku 56 let (rozmezí 22–66 let) podstoupilo RIT. Přípravným protokol byl fludarabin ($30 \text{ mg}/\text{m}^2/\text{den}$ v den -5 až -2) a melfalan ($140 \text{ mg}/\text{m}^2/\text{den}$ v den -1). Zdrojem krvetvorných buněk byla periferní krev s mediánem transplantovaných CD 34+ buněk $4,96 \times 10^6/\text{kg}$ (rozmezí 1,88 až $10,30 \times 10^6/\text{kg}$). V 7 (50 %) případech se jednalo o příbuzného a v 7 (50 %) případech o nepříbuzného dárce. Prevencí GVHD byl cyklosporin A (CsA) a metotrexát. Re-

dukce CsA byla u nemocných bez GVHD zahájena v 2. měsíci po RIT s cílem ukončení aplikace CsA během 4 týdnů. Další postupy, léčba komplikací, jejich hodnocení a hodnocení výsledků léčby probíhalo dle standardních kritérií.

Výsledky: U všech nemocných bylo v den +30 dosaženo CR AML. Akutní GVHD se rozvinula u 6 (47 %) pacientů. Chronická GVHD se rozvinula u 8 (62 %) z 13 hodnocených pacientů a byla spojena se snížením rizika relapsu ($p = 0,03$) a zlepšením celkového přežití ($p = 0,04$). S mediánem sledování žijících pacientů 30 měsíců (rozmezí 12 až 74 měsíců) žije 7 (50 %) nemocných, z nichž 6 (43 %) v trvající CR. Pět (36 %) pacientů zrelabovalo a 4 z nich zemřeli. 3 (21 %) pacienti zemřeli z důvodu TRM. TRM do dne +100 byla 8 %. Předpokládaný PFS a OS ve 3 letech je 45 %.

Závěr: Přes určitou limitaci velikostí hodnoceného souboru získané výsledky ukazují, že redukováná příprava v kombinaci fludarabin a melfalan dosahuje časně po RIT s vysokou účinností CR AML a ve spojení s časným ukončením imunosuprese i dlouhodobou kontrolu malignity u části nemocných s následným rozvojem chronické GVHD, a to při akceptovatelné TRM.

1181

Transplantace po redukované přípravě s nepřibuzným dárce u pacientů nad 50 let s prognosticky nepříznivou AML – srovnání výsledků s pacienty transplantovanými příbuzným dárce

M. Karas, V. Koza, K. Steinerová, P. Jindra, D. Lysák, T. Svoboda

Hematoonkologické oddělení FN Plzeň

Úvod: Alogenní transplantace po redukované přípravě (RIT) může u starších nemocných s rizikovou AML zlepšit nepříznivou prognózu. Pro nemocné bez příbuzného dárce je jedinou možností provedení RIT využití dárce nepřibuzného. V tomto případě však může být RIT spojena s vyšší transplantační mortalitou (TRM) při vyšším riziku rozvoje nemoci z reakce štěpu proti hostiteli (GVHD). Ve sdělení jsou shrnuty výsledky RIT s nepřibuzným dárce u nemocných nad 50 let s rizikovou AML a tyto výsledky jsou srovnány s kontrolní skupinou pacientů transplantovaných příbuzensky.

Pacienti a metody: Od roku 2001 18 pacientů (skupina 1) s mediánem věku 57 let (52–63 let) s rizikovou AML v 1. CR (10 pacientů) nebo s AML mimo 1. CR (8 pacientů) podstoupilo RIT (fludarabin + melfalan) s nepřibuzným dárce. Zdrojem krvetvorných buněk byla periferní krev a prevencí GVHD cyklosporin A a metotrexát. Kontrolní skupinu (skupina 2) tvořilo 21 pacientů transplantovaných s příbuzným dárce, kteří se nelišili v dalších vstupních prognostických faktorech.

Výsledky: Skupina 1: všichni pacienti v den +30 po RIT dosáhli CR. Akutní GVHD se rozvinula u 44 % pacientů, z nichž u 12 % vyššího než 2. stadia. Chronická GVHD se rozvinula u 46 % pacientů. S mediánem sledování žijících pacientů 18 měsíců (1–57 měsíců) žije 9 (50 %) pacientů, z nichž 8 (44 %) v CR. Tři (17 %) pacienti zrelabovali a 2 zemřeli. Sedm (38 %) pacientů zemřelo z důvodu TRM. Předpokládaný 2letý EFS a OS je 48 %. Skupina 2: všichni pacienti v den +30 po RIT dosáhli CR. Akutní GVHD 2. stadia se rozvinula u 24 % pacientů a chronická GVHD u 38 % pacientů. S mediánem sledování žijících pacientů 15 měsíců (2–74 dní) žije 14 (67 %) pacientů, z nichž 13 (62 %) v CR. Zrelabovalo 5 (24 %) pacientů a 4 zemřeli. Tři (14 %) pacienti zemřeli z důvodu TRM. Předpokládaný 2letý EFS a OS je 62 %. Mezi skupinami nebyl statisticky významný rozdíl ve výskytu aGVHD ($p = 0,19$), chGVHD ($p = 0,73$), relapsu ($p = 0,70$), TRM ($p = 0,14$), EFS ($p = 0,16$) a OS ($p = 0,14$).

Závěr: Získané výsledky ukazují, že RIT s nepřibuzným dárce u starších pacientů s rizikovou AML přináší přes poněkud vyšší TRM uspokojivou efektivitu a že výsledky jsou srovnatelné s výsledky RIT za použití příbuzného dárce.

1158

Výsledky transplantací s použitím alternativních dárce u dětských pacientů s vysoce rizikovou leukemií v závislosti na zdroji kmenových buněk a HLA shodě mezi dárce a příjemcem

P. Sedláček, E. Mejstříková, R. Formánková, P. Keslová, M. Dobrovolná, M. Vraná, I. Kolaříková, J. Navrátilová, J. Starý

Klinika dětské hematologie a onkologie 2. lékařské fakulty UK a FN Motol Praha; Ústav hematologie a krevní transfuze Praha; Český registr dárce krvetvorných buněk Praha; Český národní registr dárce kostní dřeň Plzeň

Úvod: Alogenní transplantace kmenových buněk krvetvorby (HSCT) je léčebnou metodou u pacientů s pokročilou formou leukemie. V posledních letech je většina dětských pacientů transplantována štěpem nepřibuzenského dárce. Cílem tohoto sdělení je porovnat přežívání pacientů v závislosti na druhu použitého štěpu (kostní dřeň – BM, periferní kmenové buňky – PBSC, pupečnicková krev – CB) a na míře HLA shody mezi dárce a příjemcem.

Pacienti, metody a výsledky: V období od ledna roku 2001 do prosince roku 2007 jsme provedli HSCT neupraveným štěpem nepřibuzenského dárce u 87 pacientů ve věku 1,0–20,5 let (medián 12,2). Indikací k transplantaci byla ALL 39krát (CR1: 11krát, CR2: 21krát, CR3: 5krát, PR2+3: 2krát; Ph+: 14krát), AML 12krát (CR2: 10krát, CR3: 2krát), AHL 2krát, sekundární AL/MDS 8krát, MDS 15krát, CML 9krát (AP/BC: 2krát), NHL (CR3)

a idiopatická myelofibróza. 56 dárců (64 %) bylo shodných v 9–10/10 alelách, 21 jen v 7–8/10 alelách HLA. 42 pacientů (48 %) bylo transplantováno s použitím PBSC, 35 s použitím BM. Pro 10 pacientů byla nejvhodnějším štěpem pupečnicková krev shodná ve 4–5/6 znacích HLA (A a B antigeny, DRB1 alely). Akutní GvHD grade II byla diagnostikována u 70,9 % pacientů; grade III–IV u dalších 4,6 %. Celková incidence chronické GvHD činí 43,3 % (extenzivní u 34,9 %). Relaps byl diagnostikován u 20/86 (23,2 %) pacientů (ALL 13krát, AML 5krát, CML, MDS) 105–842 dní (medián 369) po HSCT. 7/20 (35 %) podstoupilo další chemoterapii a re-transplantaci 336–738 dní (medián 479) po první HSCT, 4 žijí (57 %; MDS, ALL, AML 2) v molekulárně-genetické remisi (7, 37, 38, 56 měsíců) po 2. HSCT. Pravděpodobnost 3letého EFS je 59,5 % a 3letého OS 66,9 %. Časná TRM v den +100 byla nízká (4,5 %), celková činí 13,8 %. 14 pacientů (16 %) zemřelo v důsledku relapsu leukemie. Přežívání se statisticky neliší podle druhu štěpu (BM: EFS/OS = 57,9/67 % vs PBSC: EFS/OS = 63,7/71,6 % vs CB: EFS/OS = 48/60 %). Přežití se významně nelišilo ani při srovnání HSCT od HLA identických ($n = 56$; EFS/OS = 57/67,1 %) či jen částečně shodných dárců ($n = 21$; EFS/OS = 70,5/75 %).

Závěr: Dětským pacientům s vysoce rizikovou formou leukemie nabízí HSCT od nepříbuzenského dárce reálnou šanci na vyléčení, a to i v případě použití částečně neshodného dárce.

Podporováno VZ FNM MZČR 64203.

1170

Výsledky nemocných s rizikovou akutní myeloidní leukemií relabující po alogenní transplantaci krvetvorných buněk: zkušenost jednoho centra

K. Steinerová, V. Koza, P. Jindra, M. Karas, D. Lysák, T. Svoboda, S. Vokurka, V. Vozobulová

Hematoonkologické oddělení FN Plzeň

Úvod: Prognóza nemocných s rizikovou AML relabující po alogenní transplantaci krvetvorných buněk (SCT) je stále velmi špatná. V našem sdělení shrnujeme výsledky nemocných, kteří zrelabovali po SCT, a srovnáváme skupiny transplantovaných myeloablativně a s redukovanou přípravou (RIC).

Materiál a metody: V retrospektivní analýze jsme hodnotili 124 nemocných s rizikovou AML transplantovaných na našem oddělení v rozmezí let 1993–2007. 36 nemocných (29 %), 17 mužů a 19 žen, zrelabovalo po SCT s mediánem 3,5 měsíce (1–49). 25 nemocných bylo transplantováno s myeloablativní přípravou (skupina I) a relabovalo s mediánem 3 měsíce (1–49) po SCT. 11 nemocných bylo transplantováno s redukovanou přípravou (skupina II) a re-

labovalo s mediánem 5 měsíců (3–28) po SCT ($p = 0,7887$). Medián věku nemocných ve skupině I byl 40 let (21–55), ve skupině II 54 let (29–64), $p = 0,0126$. Jinak byly obě skupiny srovnatelné, co se týče stadia onemocnění před SCT, prognostických faktorů a typu dárce (HLA identický příbuzný vs nepříbuzný dárce, $p = 1,0$). 16 nemocných (44 %) bylo intenzivně léčeno pro relaps (10/25 a 6/11, $p = 0,4834$), léčba se sestávala z infuze dárcovských lymfocytů (DLI, 62,5 %), chemoterapie (25 %), další alogenní SCT (12,5 %). **Výsledky:** 3 nemocní (19 %) dosáhli kompletní remise (CR) po léčbě relapsu a zůstávají v CR 3, 7 a 8 měsíců po diagnóze relapsu. 4 nemocní žijí (1 ze skupiny I a 3 ze skupiny II) s celkovým mediánem přežití (OS) v skupině I 5 měsíců, pravděpodobností přežití 1 rok 28 % a s mediánem OS ve skupině II 7 měsíců, pravděpodobnost OS v 1 roce 34 % ($p = 0,3287$). 32 nemocných zemřelo, většina z nich na progresi AML (30/32, 94 %), 1 nemocný zemřel na GVHD po podání DLI a 1 nemocný na respirační selhání. V našem souboru jsme nezaznamenali rozdíl mezi OS nemocných léčených DLI, chemoterapií či další alogenní SCT. **Závěr:** Terapie nemocných s relapsem AML po alogenní SCT je možná s poměrně nízkou mortalitou na léčbu, avšak optimální léčba relapsu je i nadále nejasná. Při srovnání skupin transplantovaných myeloablativním režimem a RIC jsme (s výjimkou věku nezaznamenali statisticky významné rozdíly v celkovém přežití, avšak srovnání křivek OS jeví tendenci k lepšímu přežívání u nemocných, kteří zrelabovali po transplantaci s nemyeloablativní přípravou.

1199

Nepříbuzenské transplantace u pacientů starších 50 let: srovnatelné výsledky jak s plně (shoda 10/10) HLA shodnými, tak s částečně neshodnými (shoda 8–9/10) dárci

P. Jindra, M. Karas, K. Steinerová, D. Lysák, T. Svoboda, V. Koza

Hematoonkologické oddělení FN Plzeň

Úvod: Nepříbuzenské transplantace jsou jedinou kurativní léčbou u některých pacientů s „high-risk“ hematologickými malignitami bez příbuzného dárce. S ohledem na vyšší transplantační mortalitu je však oprávněná zdrženlivost v použití částečně shodných nepříbuzných dárců. Vzhledem k pokrokům v HLA typizaci a podpůrné péči jsou nyní i částečně shodní dárci již považováni za reálnou alternativu, minimálně u mladších nemocných. Pro skupinu starších nemocných (≥ 50 let) jsou klinická data relativně omezená.

Metodika: Unicentrická retrospektivní analýza 72 konsekutivních pacientů ≥ 50 let věku (medián 57, rozmezí 50–70) s vysoce/středně rizikovými hematologickými malignitami, kteří byli transplantováni buď HLA molekulárně

zcela shodnými (10/10) nepříbuznými dárci (FM skupina, n = 43, medián věku 56, rozmezí 50–70), nebo s částečně shodnými (shoda 9/10, n = 27, resp. shoda 8/10, n = 2) nepříbuznými dárci (PM skupina, n = 29, medián věku 57, 50–68). Mezi skupinami nebyly signifikantní rozdíly v relevantních klinických faktorech (diagnóza a její stadium, doba sledování, typ transplantace, pohlaví CMV stav atp.).

Výsledky: Při mediánu sledování 29 měsíců (rozmezí 1–65) pro všechny pacienty bylo 3leté přežívání (OS) a přežívání bez nemoci (DFS) 43 %, resp. 39 %, zatímco non-relapsová mortalita (NRM) 40 % (29/72) a incidence relapsů 19 % (11/59). Po rozdělení na skupinu plně shodných (FM) a neshodných dárců (PM) byla data následující: 3 roky OS – 38 vs 49 % (p = 0,61), DFS – 32 vs 46 % (p = 0,33). Statisticky nesignifikantní trend pro vyšší incidenci relapsů byl pozorován u FM skupiny (26 vs 7 %, p = 0,18), NRM byla srovnatelná (40 vs 41 %, p = 1,0). Incidence aGVHD gr. ≥ III a cGVHD byly identické (14 %, respektive 44 %).

Závěr: U nepříbuzensky transplantovaných, rizikových hematologických pacientů ≥ 50 let jsme zjistili srovnatelné výsledky jak s dárci kompletně HLA shodnými (10/10), tak s dárci s 1–2 neshodami. Benefit politiky preference včasného provedení transplantace i za cenu pouze částečné HLA shody před zdlohouhým vyhledáváním kompletně shodného dárce u „high-risk“ nemocných s problematickým HLA fenotypem byla opakovaně doložena u mladých nemocných. Naše data podporují aplikaci této strategie i u starších nemocných.

NHL 1

1163

Využití pozitronové emisní tomografie při iniciačním stagingu nonhodgkinských lymfomů dětí a dospívajících (výsledky prospektivní studie)

E. Kabíčková, O. Bělohávek, J. Votrubová, D. Sumerauer, E. Drahoukoupilová, D. Kodetová, R. Kodet, M. Kynčl, J. Starý

Klinika dětské hematologie a onkologie 2. lékařské fakulty UK a FN Motol, Praha; PET centrum Nemocnice Na Homolce, Praha; Ústav patologie a molekulární medicíny 2. lékařské fakulty UK a FN Motol Praha; Klinika zobrazovacích metod 2. lékařské fakulty UK a FN Motol, Praha

Úvod: Nonhodgkinské lymfomy (NHL) tvoří 7 % zhoubných nádorů v dětském věku. Jsou to nejrychleji rostoucí nádorová onemocnění u dětí, v době stanovení diagnózy je častá lymfogenní i hematogenní diseminace. Pozitronová emisní tomografie (PET) je neinvazivní vyšetřovací metoda s vysokou vypovídající schopností, která umožňuje funkční zobrazení nádorové tkáně a zpřesnění rozsahu onemocnění. Využití PET v léčbě dětských NHL je zmiňo-

váno zřídka, většina výzkumných prací je orientována na dospělé pacienty. Cílem projektu je posoudit přínos PET k iniciační diagnostice NHL dětí a dospívajících.

Pacienti a metody: V průběhu 5 let jsme provedli v rámci iniciačního stagingu PET vyšetření u 36 pacientů s NHL (Burkittův lymfom 14, difuzní velkobuněčný lymfom 12, lymfoblastický NHL 5, PTCL 5). Medián věku v době stanovení diagnózy byl 13 let (3–19). V souboru bylo 27 chlapců a 9 dívek. Rozsah onemocnění jsme stanovili podle schématu Murphyové. Žádný pacient neměl prokázané metastázy v CNS. Výsledky PET vyšetření jsme porovnali s výsledky konvenčních zobrazovacích metod, histologickými nálezy a následným klinickým průběhem onemocnění.

Výsledky: U 1/3 pacientů PET zobrazila celkem 23 nových ložisek lymfomu (13 uzlinových, 10 mimouzlinových). Falešně negativní nález jsme zaznamenali pouze u 1 dítěte, kdy PET nezobrazila 15 % infiltraci kostní dřevě. Falešně pozitivní byla PET u 1 pacienta, kde difuzní vysoká akumulace fluorodeoxyglukózy v kostní dřevě byla způsobena myeloidní hyperplazií. Před zahájením léčby byly nálezy běžných zobrazovacích metod a PET shodné u 29 pacientů (80 %). PET správně modifikovala stadium u 5 dětí, chybně u 2 pacientů. Při stanovení rozsahu onemocnění před léčbou byla tedy PET v porovnání s konvenčním stagingem přesnější (94 % vs 86 %), měla vyšší senzitivitu (96 % vs 86 %) při stejné specificitě (88 %). Na základě nových informací získaných při PET vyšetření jsme pozměnili léčebnou strategii u 3 z 36 (8 %) dětí s NHL.

Závěr: Zařazení FDG-PET do vyšetřovacího algoritmu dětí s NHL umožnilo zrychlit a zpřesnit diagnostiku. Velkou výhodou je neinvazivnost metody, radiační zátěž je srovnatelná např. s CT vyšetřením.

Práce vznikla za finanční podpory MZO (výzkumné záměry č. 00064203).

1306

Přímé srovnání nálezů ¹⁸FDG-PET a CT u nemocných s nově diagnostikovaným nonhodgkinským lymfomem vyšetřených pomocí ¹⁸FDG-PET/CT

T. Papajík, M. Mysliveček, E. Buriánková, Z. Šedová, Z. Kubová, V. Procházka, P. Koranda, K. Indrák
Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc; Klinika nukleární medicíny Lékařské fakulty UP a FN Olomouc

Úvod: Kombinovaná metoda ¹⁸FDG-PET a CT zobrazení se stává základem moderního stážování ne-hodgkinských lymfomů (NHL). CT přináší morfologicky přesnou informaci o zobrazené tkáni, nicméně malé nádorové léze, resp. difuzní infiltrace orgánů nejsou v řadě případů tímto vyšetřením zachytitelné. ¹⁸FDG-PET na druhé straně dokáže detekovat patologickou tkáň na základě zvýšené uti-

lizace glukózy, pozitivita vyšetření však není v řadě případů nádor-specifická a hůře se anatomicky lokalizuje. Kombinace obou vyšetření dokáže eliminovat tyto nedostatky a výrazně zvýšit citlivost a specifitu stážování. Cílem práce bylo zhodnotit výsledky ^{18}F FDG-PET, CT a ^{18}F FDG-PET/CT vyšetření u nemocných s nově diagnostikovaným NHL.

Metody: U 47 nemocných s NHL byly nezávisle zhodnoceny ^{18}F FDG-PET, CT a ^{18}F FDG-PET/CT snímky radiologem a lékařem nukleární medicíny. 24 nemocných mělo diagnózu difuzního B-velkobuněčného lymfomu, 6 diagnózu lymfomu z plášťových buněk, 5 pak folikulárního lymfomu, u 5 pacientů šlo o lymfom marginální zóny a u 3 o periferní T-lymfom, ostatní typy NHL byly zastoupeny 4 případy.

Výsledky: U 2 nemocných (4 %) byla PET vyšetřením zjištěna infiltrace lymfatických uzlin (LU), které byly dle CT parametrů považovány za nezvětšené. U 11 nemocných (23 %) byla zjištěna PET pozitivní nádorová léze v mimouzlínovém orgánu, která nebyla odhalena CT. Na druhé straně 11 nemocných (23 %) mělo na CT nález zvětšených LU, jež však při PET nevykazovaly zvýšenou utilizaci glukózy, stejně tak jako 15 nemocných (31 %) mělo na CT popsanou organomegalii podezřelou z infiltrace NHL, která však nebyla prokázána na PET skenech. U 1 nemocného (2 %) PET/CT oproti CT vyšetření zvýšilo stadium choroby, u 3 (6 %) naopak vedlo ke snížení. U 2 nemocných byla prokázána PET-pozitivní léze, jež analýzou CT snímků a zhodnocením laboratorně-klinických parametrů byla shledána jako zánětlivé plicní ložisko u 1 nemocné, u druhé nemocné šlo o adenom štítné žlázy.

Závěr: ^{18}F FDG-PET/CT vyšetření při stážování NHL může zásadním způsobem ovlivnit charakteristiku popisu jednotlivých zobrazených lézí a orgánů, což je velmi důležité pro pozdější hodnocení léčebné odezvy.

Podpořeno grantem IGA MZ ČR č. NR/9502-3.

1318

Zajímavé ^{18}F FDG-PET-pozitivní vedlejší nálezy při PET/CT vyšetření u nemocných léčených pro nonhodgkinský lymfom

Z. Šedová, M. Mysliveček, T. Papajík, E. Buriánková, V. Procházka, Z. Kubová, P. Koranda, Z. Rusiňáková, L. Raida, L. Kučerová, K. Indrák

Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc; Klinika nukleární medicíny Lékařské fakulty UP a FN Olomouc; Ústav patologie Lékařské fakulty UP a FN Olomouc

Úvod: ^{18}F FDG-PET/CT vyšetření se stává základem stážování a hodnocení léčebné odezvy u nonhodgkinových lymfomů (NHL). ^{18}F FDG-PET dokáže zobrazit patologickou tkáň na základě zvýšené utilizace glukózy, pozitivita vyšetření však není lymfom-specifická. V řadě případů, zejména pak v období časného nebo finálního stážování, se setká-

váme s překvapivými novými či vedlejšími PET-pozitivními nálezy, které je nutné velmi obezřetně interpretovat. V mnoha případech nám pomůže současně prováděné CT vyšetření, vždy je však nutné nálezy porovnat s dostupnými anamnestickými, klinickými, ale i laboratorními daty. Cílem práce je představit zajímavé vedlejší nálezy restážovacích ^{18}F FDG-PET/CT vyšetření u nemocných s NHL, které byly zjištěny u našich nemocných.

Metody: Retrospektivně byly radiologem, lékařem nukleární medicíny a hematologem zhodnoceny ^{18}F FDG-PET, CT, ^{18}F FDG-PET/CT snímky, klinická a laboratorní data u 15 nemocných léčených pro NHL, u kterých byl na PET/CT skenech zaznamenán nejasný, PET-pozitivní nález.

Výsledky: U 4 nemocných bylo zjištěno ložisko ve štítné žláze (biopticky 3krát adenom, 1krát karcinom štítnice), u 3 pacientů byl nalezen zánětlivý plicní infiltrát (v jednom případě šlo o toxoplazmovou pneumonii). U 2 pacientek po autologní transplantaci byla nalezena PET-pozitivní hyperplázie thymu. U 2 nemocných byl zjištěn PET-pozitivní nespecifický zánět žaludku a střeva, u 1 nemocného výrazná nespecifická ložiska akumulace glukózy v tračníku (vše ověřeno biopticky). U 2 nemocných byl v odstupu po léčbě lymfomu nalezen PET-pozitivní, biopticky verifikovaný granulomatozní zánět (u 1 byla potvrzena sarkoidóza). U 1 pacientky byl na PET/CT skenech zachycen výrazně akumulující myom dělohy, u 1 nemocné pak vaskulitida velkých cév.

Závěr: Na příkladu vedlejších PET-pozitivních nálezů zjištěných u nemocných léčených pro NHL demonstrujeme nutnost pečlivého hodnocení takových lézí a úzké spolupráce lékaře PET-centra s hemato-onkologem. K definitivnímu určení etiologie procesu je často nezbytné provést bioptické vyšetření PET-pozitivní tkáně.

Podpořeno grantem IGA MZ ČR č. NR/9502-3.

1262

Identifikácia genetických aberácií u pacientov s DLBCL

D. Ilencíková

Oddelenie onkologickej genetiky NOÚ Bratislava, Slovenská republika

Úvod: Klinicko-patologická heterogenita DLBCL vykazuje heterogenitu v molekulárnej patogenéze tohto ochorenia. Klasické molekulárne štúdie identifikovali najmenej 3 rôzne genotypy DLBCL. Prvý typ zodpovedá za približne 40 % a je asociovaný s prestavbou BCL6 génu. Druhý genetický typ DLBCL vykazuje jednu z niekoľkých molekulárnych porúch génov BCL2 a BCL6 spojených s aktiváciou protoonkogénov REL, MUC1, BCL8 a C-MYC. Tretí typ je daný „transformačnou dráhou“, ktorá zahŕňa transformáciu už existujúceho folikulárního lymfómu s prestavbou génu BCL2. Aberácie týchto génov sú považované za primárne chromozómové aberácie. Medzi sekundárne

chromozómové aberácie patrí predovšetkým delécia génu p53, p16. Sem patria tie aberácie, ktoré predstavujú nadbytočný alebo chýbajúci genetický materiál v genóme. Oni sú často príčinou histologickej transformácie nízkomaligného na vysokomaligny a skrátenej doby prežívania.

Materiál a metódy: V rokoch 2006–2007 bolo na oddelení vyšetrených 140 pacientov s DLBCL. Materiálom bol parafrínový blok uzliny u 29/140 (20,71 %), čerstvé tkanivo uzliny v 2/140 (1,43 %) a PK/KD u 130/140 (92,85 %). Metódou konvenčnej a molekulovej cytogenetiky (iFISH) sme vyšetrili 140 vzoriek kostnej drene a periférnej krvi pacientov s DLBCL. Metódou FISH sme vyšetrili aberácie génov BCL6, IgH a p53. Metódou molekulovo-genetickej diagnostiky sme vo vzorke kostnej drene sledovali prítomnosť buniek s translokáciou bcl2/IgH. Metódou iFISH sme u 29 pacientov retrospektívne vyšetrili tumorové tkanivo z parafrínového bločku.

Výsledky: V súbore 140 pacientov sme mohli genetickými metódami zachytiť genetické aberácie u 39 pacientov (27,86 %) v tkanive KD a PK a 23/26 pacientov (88 %) v tumorovom tkanive. Primárne chromozómové aberácie sme identifikovali u 4 pacientov metódami konvenčnej cytogenetiky KD a PK, metódou FISH u 17 pacientov a metódou molekulovej diagnostiky 4 pacientov. Sekundárne zmeny sme mohli vyšetriť u 15 pacientov konvenčnou cytogenetikou. U 7 pacientov sme potvrdili prítomnosť translokácie Bcl2/IgH, čo poukazuje na vývoj DLBCL z folikulového lymfómu. U 23 pacientov sme metódou FISH z fixovaného tumorového tkaniva uzliny zistili prítomnosť chromozómových aberácií. Najfrekvencovanejšou aberáciou bola zmena génu IgH a BCL6. Sledovali sme klinicko-patologické a genetické korelácie nálezov.

Projekt bol podporený MZ SR 2005/ 01-NOU-16.

1196

ArrayCGH mapování zmnožené oblasti 7q u γ/δ hepatosplenického T-buněčného lymfomu

H. Urbánková, P. Van Loo, S. Shetty, B. Roland,

L. Krenacs, P. De Paepe, M. Jarošová,

P. Vandenberghe, C. De Wolf-Peters, I. Wlodarska

Department of Human Genetics and Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology and Bioinformatics Group, Department of Electrical Engineering, Catholic University Leuven, Leuven, Belgium; Department of Medical Genetics, Alberta Children's Hospital, Calgary, Canada; Institute of Biotechnology, Bay Zoltan Foundation for Applied Research, Szeged, Hungary; Department of Pathology, AZ St Jan AV, Brugge, Belgium; Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc; Department of Human Genetics, Catholic University Leuven, Leuven, Belgium; Department of Pathology, Catholic University Leuven, Leuven, Belgium

γ/δ hepatosplenický T-buněčný lymfom (gdHSTCL) je vzácné, agresivní onemocnění spojené se špatnou

prognózou. Cytogeneticky je tento typ lymfomu charakterizován přítomností izochromozomu 7q [i(7)(q10)], která vede k monosomii krátkých a trisomii dlouhých ramen chromozomu 7. Molekulární význam této aberace zůstává dosud neznámý. Podařilo se nám získat materiál a data 6 pacientů s gdHSTCL. U 3 z nich byl nalezen ring chromozom 7 [r(7)], který podle výsledku fluorescenční in-situ hybridizace (FISH) (LSI D7S486/CEP7 Abbot-Vysis) obsahoval 3–5 nadpočetných kopií oblasti 7q31. Dva pacienti měli typický i(7)(q10) a 1 pacient i(7)(q10) a zároveň add(7)(q32). Pro mapování a určení nejmenší společné zmnožené oblasti 7q (SCGR) jsme provedli array komparativní genomickou hybridizací (arrayCGH) s vysokým rozlišením zaměřenou specificky na chromozom 7. ArrayCGH čip pro chromozom 7 byl sestaven s použitím 1722 BAC/PAC klonů z Chori 32K knihovny (<http://bacpac.chori.org>; Fiegler et al 2003). Čip pokrývá chromozom 7 s rozlišením přibližně 92 kb. ArrayCGH analýza 2 případů s i(7)(q10) ukázala podle očekávání ztrátu genetického materiálu celých krátkých ramen 7p a duplikaci celých dlouhých ramen 7q. U pacienta s i(7)(q10) a add(7)(q32) byla prokázána ztráta 7p a parciální duplikace 7q (7q11q31). Ve všech 3 případech s r(7) odhalila metoda arrayCGH parciální delecí telomerické oblasti 7p, duplikaci 7q11q33 a další zmnožení oblasti 7q21q33. Velikost této zmnožené oblasti a úroveň amplifikace sekvencí v ní zahrnutých se lišila případ od případu. Určená SCGR pokrývala přibližně 24 Mb v oblasti 7q21.1q31.1. FISH s použitím BAC klonů lokalizovaných v dané oblasti prokázala přítomnost 3–8 nadpočetných signálů. Předpokládáme, že v dané oblasti jsou lokalizovány geny, které hrají významnou roli v patogenezi gdHSTCL. V současné době probíhá analýza transkriptomu dostupných případů zaměřená na identifikaci upregulovaných genů z SCGR.

Práce je podporována grantem Česko-vlámské spolupráce ve výzkumu a vývoji, Belgium Research Foundation, BIL05/59.

1291

Genetické vyšetrenia T-lymfómov u detí

K. Hlinková, D. Ilenčíková, M. Čermák, J. Šuvada,

E. Bubanská, I. Jenčo, L. Plank

Oddelenie onkologickej genetiky Národného onkologického ústavu Bratislava, Slovenská republika; Klinika detskej onkológie Lekárskej fakulty UK a DFNSP Bratislava, Slovenská republika; Klinika detskej onkológie FNŠP a SZU Banská Bystrica, Slovenská republika; Oddelenie detskej onkológie FN Košice; Ústav patologickej anatómie Jesseniovej lekárskej fakulty a MFN Martin, Slovenská republika

Úvod: T-lymfómy u detí sú pomerne vzácne, tvoria približne 12 % non-hodgkinových lymfómov (NHL). Genetické

vyšetrenia T-lymfómov u detí môžu prispieť k upresneniu diagnózy ochorenia, poskytnúť informácie o progresii ochorenia a zároveň môžu byť nápomocné tam, kde je morfológická diagnóza nejednoznačná. K detekcii chromozomálnych aberácií u detí s T-lymfómami využívame okrem metód konvenčnej cytogenetiky i metódy FISH analýzy a molekulárno-genetické metódy.

Materiál a metódy: Na našom pracovisku sme retrospektívne vyšetrili 26 pacientov diagnostikovaných v rokoch 1999–2008, u ktorých sme sledovali najčastejšie chromozomálne aberácie. Molekulárno-genetickým vyšetrením sme na základe heteroduplex analýzy sledovali prestavbu génov pre T-bunkové receptory (TCR $\alpha\delta$ -14q11, TCR β -7q34 a TCR γ -7p15). Ako vyšetrovací materiál sme použili DNA izolovanú z kostnej drene, resp. periférnej krvi a z fixovaného materiálu uzliny. FISH analýzou sme detekovali chromozomálne aberácie prostredníctvom troch typov sond: sil/tal (del(1)(p32,p32), TLX3 (t(5,14)(q35,q32) a TCR sonda α/δ (t(1,14)(p32,q11)). U všetkých pacientov sme sledovali deléciu nádorového supresorového génu p16 (9p21) a amplifikáciu génu ABL (9q34). Vyšetrovacím materiálom FISH analýzy bol fixovaný tumor uzliny, pričom v niektorých prípadoch sme použili natívny tumor uzliny. V priebehu liečby sme na základe pozitívneho nálezu sledovali prítomnosť patologického klonu vo vzorke kostnej drene resp. periférnej krvi. Tým sme mohli u niektorých pacientov monitorovať ochorenie a zistiť odozvu na liečbu.

KONFERENČE NELEKÁRSKÝCH PROFESÍ 1

1336

The developments within the EBMT Nurses Group and special nursing care at the University Hospital in Zürich

E. Aerts

BMT Ward, University Hospital Zürich, Dpt. of Medicine, Zürich, Switzerland

Introduction: The Nurses Group of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) is a non-profit organisation that aims to promote all aspects of nursing care surrounding the transplantation of haematopoietic stem cells.

EBMT-NG Members: Members of the EBMT-NG are mainly nurses and health-care professionals from centres that are active in any kind of haematopoietic stem cell transplantation (HSCT). Currently, the Nurses Group has over 500 members; all coming from 50 different

countries within 4 continents of the world. The EBMT-NG currently has 3 Sub Committees, in which experts from different countries are represented. At this moment in time, the Nurses Group has 6 National Groups: The Netherlands, Germany, Spain, Switzerland, United Kingdom and the Middle-European Group, which consists of 8 countries from East Europe.

Haematology nursing practice in Zürich, Switzerland: At the University Hospital Zürich, bone marrow transplantations have been done for more than 32 years. During this time, therapy and care had to change and adapt over and over again, to keep in line to the update of knowledge from research. Many efforts are undertaken to improve and consolidate good quality care. We are working in a multi-disciplinary transplant team with nurses, assistants and a secretary. At our ward, we cure beside transplantation patients, patients with acute leukaemia as well, and patients with other haemato/oncological diseases, who need a chemotherapy. This presentation will focus on the developments of the special nursing care in Zürich.

Haematology nursing practice in Europe: The EBMT-NG has undergone many interesting developments in 2007. The Members of the research sub-committee published numerous articles on the management of oral mucositis and nutrition, and a „research priorities questionnaire“ was created. The analyses from this questionnaire will be presented during this meeting. Experts working in the field of HSCT have made a DVD about Graft versus host disease. Graft versus host disease (GvHD) remains one of the most serious side effects of allogeneic haemopoietic stem cell transplantation. The DVD has been developed for healthcare professionals, to support them during training, as well as to lend support to both patients and carers. The DVD is currently being translated into foreign language formats.

EBMT-NG Meetings: The EBMT-NG board is preparing the 25th Annual Meeting of the EBMT Nurses Group, which will be held in Gothenburg, Sweden, 2009. In 2007, the EBMT-NG developed a questionnaire to identify the learning needs of haematology nurses in Europe.

It is well known that haematology nursing and the role of nurses involved in the care of patients with a haematological disease throughout Europe is very diverse. The findings from this survey will be used to plan practice development initiatives targeted at haematology nurses throughout Europe. During this presentation, discussion will focus on how the results of the questionnaire can be used to guide the development of educational initiatives. I hope that this abstract has made you curious to know more about the EBMT-NG and you are hereby invited to visit our web site www.ebmt.org or to contact any member of the NG board for more information.

1292

Doporučený standard a skutečné personální obsazení nelékařskými profesemi hematologických jednotek intenzivní péče a center pro transplantace krvetvorných buněk

E. Bystřická, J. Ščudlová, V. Pavlicová, M. Zítková, L. Vylitová, B. Sedláčková, M. Visokaiová, B. Nagyová, V. Kořístková

Hematologicko-onkologické oddělení FN Plzeň; Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc; II. interní klinika Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové; Interní hematologická klinika Lékařské fakulty MU a FN Brno, pracoviště Bohunice; Ústav hematologie a krevní transfuze Praha; I. interní klinika 1. lékařské fakulty UK a VFN Praha; Klinika hematologie a onkologie FN Košice, Slovenská republika; Klinika dětské hematologie a onkologie 2. lékařské fakulty UK a FN Motol Praha; Klinika dětské onkologie Lékařské fakulty MU a FN Brno, pracoviště FDN JGM

Soudobé medicínské a ošetrovatelské trendy, které se soustředí na zajištění maximální kvality péče, přinesly potřebu definovat doporučený standard pro personální obsazení transplantačních a hematologických jednotek intenzivní péče. Toto doporučení bylo schváleno výborem České hematologické společnosti České lékařské společnosti J. E. Purkyně v listopadu roku 2006 a publikováno v časopisu *Transfúze a Hematologie* dnes (2007; 1: 35–36): poměr sestry/pacienti by neměl být menší než 2 : 1, poměr ošetrovatelky-sanitárky/pacienti by neměl klesnout pod 1,5 : 2, dále má mít transplantační centrum dostupného transplantačního koordinátora, sociální a dietní sestry, fyzioterapeuta, farmaceuta a datamanážera. Položili jsme si otázku, jaká je skutečnost na jednotlivých centrech. Formou dotazníku jsme se pokusili zmapovat situaci nejen v transplantačních centrech České a Slovenské republiky, ale i v zahraničí. V ústním sdělení uvedeme výsledky našeho šetření.

1333

Význam stanovení hladiny leukocytů ve slině pro posouzení stomatitidy a přihojení štěpu z pohledu sestry

J. Vítková, R. Pink

Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc; Klinika ústní, čelistní a obličejové chirurgie Lékařské fakulty UP a FN Olomouc

Na našem transplantačním oddělení ve spolupráci s Klinikou ústní, čelistní a obličejové chirurgie LF UP a FN Olomouc probíhá studie, jež sleduje nárůst bílých krvinek ve výplachu dutiny ústní. Do studie jsou zařazeni pacienti autologně transplantovaní pro diagnózu myelom

nebo lymfom, kteří jsou ochotni spolupracovat a podepsali se studií souhlas. Při každé transplantaci se podává vysoce dávkovaná chemoterapie, která vyvolává mnoho infekčních komplikací. Jednou z nejzávažnějších komplikací je stomatitida, jen z nemožnosti příjmu léků per os, potravy a tekutin vede k celkovému zhoršení stavu nemocného. V prevenci stomatitidy před transplantací je nezbytné pečlivé, ale šetrné ošetření stomatologa a pečlivá hygienická péče o dutinu ústní během transplantace. Studie srovnává hladinu bílých krvinek ve slinách a v krevním obraze se stavem stomatitidy. Jaká je role sestry, jak se výplachy provádí a jaký je přínos studie, bude předmětem sdělení.

1193

Srovnání vybraných ukazatelů ošetrovatelské péče na transplantačních jednotkách v Curychu, Plzni a Olomouci

A. Koukalová, P. Kibitzová, E. Bystřická, J. Ščudlová

Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc; Hemato-onkologické oddělení FN Plzeň

Sdělení prezentuje zkušenosti ze studijního pobytu ve Švýcarsku, kde probíhá od ledna roku 2008 do června roku 2008 odborný modul v hemato-onkologické péči (Curych a St. Gallen). Během našeho působení na hemato-onkologických klinikách zjišťujeme, že i při zdůrazňování oborové spolupráce v léčebném i ošetrovatelském procesu transplantací kostní dřeně či periferních kmenových buněk je právě jednotný komplexní přístup na transplantačních jednotkách velice obtížně dosažitelný. V současnosti každé transplantační centrum kostní dřeně postupuje na základě svých dosažených výsledků, volí adekvátní léčebné i ošetrovatelské metody vyhovující hygienicko-epidemiologickým standardům. Není neobvyklé, že existují podstatně významné rozdíly v ošetrovatelské péči mezi jednotlivými centry v České republice i v zahraničí. Naší snahou je předložit srovnání ošetrovatelské péče a jejich požadavků 3 transplantačních center (transplantační jednotka – vybavení, vzduchotechnika, hygienická péče, systém návštěv, systém převlíkání a ochranných prostředků personálu, způsob přípravy jídla, pitný režim, podmínky volného režimu/izolačního) v Curychu, v Plzni a v Olomouci. Možností, jak sjednotit některé postupy a prohloubit spolupráci transplantačních center, je zavedení výměnných pracovních stáží, které mohou zvýšit kvalitu poskytované odborné ošetrovatelské péče na jednotlivých centrech. Projekt bude probíhat pod patronátem FN Plzeň a Hematologické společnosti České lékařské společnosti J. E. Purkyně. Cílem je kontinuální zvyšování vzdělávání sester v hematologickém oboru v České republice. Získaná specializace by měla usnadňovat zdra-

votním sestřám orientaci v oboru a prohloubit jejich odborné vědomosti a uplatňovat je plánovitě v praxi.

1223

Reverzní izolace – aktuální situace na transplantačních centrech ve střední a východní Evropě

I. Chvojková, Z. Hlinková, J. Ščudlová, V. Pavlicová, K. Moravcová, J. Wintnerová, L. Vylitová

Hemato-onkologické oddělení FN Plzeň; Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc; II. interní klinika Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové; I. interní klinika 1. lékařské fakulty UK a VFN Praha; Klinika dětské hematologie a onkologie 2. lékařské fakulty UK a FN Motol Praha; Ústav hematologie a krevní transfuze Praha

Úvod: Reverzní izolace (RI) představuje systém přísného bariérového ošetřování těžce imunitně oslabených pacientů. V rámci této izolace jsou využívány různé postupy, které slouží k ochraně pacientů před infekcí přenášenou přímým kontaktem, vzduchem, vodou nebo potravou. Ojedinelé studie však ukazují na rozdílnosti v praktikování RI mezi jednotlivými transplantačními centry a rovněž samotný efekt takové izolace bývá zpochybňován s výjimkou požadavku pečlivé hygieny rukou.

Cíle: Ověřit aktuální charakteristiky RI v transplantačních centrech střední a východní Evropy. Navrhnout oblasti dalšího výzkumu.

Metodika: Dotazník distribuovaný 18 transplantačním centřům střední a východní Evropy v září až říjnu roku 2007.

Výsledky a parametry: 10/18 (55 %) transplantačních center odpovědělo. 100 % center provádí transplantace krevetvorných buněk s využitím režimu RI, 100 % center provádí alogenní transplantace na 1lůžkovém pokoji, 46 % center provádí autologní transplantace na 2lůžkovém pokoji. Vybavenost pokojů: umyvadlo 92 %, WC 92 %, sprcha 85 %, základní nábytek 100 %, TV 100 %, chladnička 46 %. Klimatizace: HEPA filtry 76 %, žádná 24 %, trvale zavřená okna 69 %. Voda pro tělesnou hygienu: sterilní 8 %, upravená (filtr, desinfekce, ionizace) 38 %, běžná 54 %. Voda pro ústní hygienu: sterilní 15 %, upravená 46 %, balená 38 %. Pitná voda: sterilní 24 %, balená 76 %. Strava: nízkobakteriální nebo s dietním omezením 100 %. Ložní prádlo: sterilní 46 %, běžné nemocniční 54 %. Zákaz návštěv zcela ve 24 % center.

Závěr a diskuse: I přes nízký počet zúčastněných center je patrné, že RI hraje významnou roli při ošetřování transplantovaných pacientů ve střední a východní Evropě, ale je patrná výrazná rozdílnost a přesnost v jednotlivých přístupech. S cílem získat více objektivních dat a porovnat praxi v západní a východní Evropě byly v únoru až

březnu roku 2008 kontaktovány EBMT transplantační centra napříč kontinentem. Tyto nové poznatky budou prezentovány v ústním sdělení. Do budoucna by bylo přínosné analyzovat hygienicko-epidemiologické parametry v centrech s ohledem na praktikované přístupy v rámci ošetřování v RI.

EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE

1234

Metody studia funkce P-glykoproteinu a mnohočetná léková rezistence

P. Mlejnek

Ústav biologie Lékařské fakulty UP Olomouc

Mnohočetná léková rezistence (multidrug resistance – MDR) představuje vážný problém při léčbě nádorových onemocnění chemoterapií. V současné době je známo několik mechanismů vzniku MDR. Velmi často je její vznik spojován se zvýšenou expresí membránového transportéru P-glykoproteinu (P-gp). P-gp je produktem MDR1 genu a patří do velké rodiny tzv. ABC (ATP-binding cassette) transportérů. P-gp exportuje široké spektrum cytotoxických látek ven z buňky, čímž snižuje intracelulární akumulaci léčiva, a navozuje tak rezistenci. Existuje velké množství prací, které ukazují korelaci mezi zvýšenou expresí P-gp a vznikem MDR u nádorových buněk, zejména v experimentech in vitro. Někteří autoři ovšem soudí, že zvýšená exprese P-gp neumožňuje zcela vysvětlit fenotyp MDR. Data odvozená z klinických studií jsou ještě kontroverznější, nicméně platí, že zvýšená exprese P-gp je spojena se špatnou prognózou. Protichůdné výsledky v této oblasti mohou mít řadu příčin. Jako hlavní je možné uvést 2: (a) vznik MDR je zřejmě podmíněn více faktory; (b) rutinně používaný experimentální přístup k posouzení příspěvku aktivity P-gp ke vzniku MDR je založen na nepřímých důkazech. Analýza metodických přístupů ukazuje, že ani velmi pokročilé metody, pokud jsou nepřímé nebo poskytují „jen“ kvalitativní data, neumožňují posoudit skutečný příspěvek exprese P-gp ke vzniku pozorované rezistence. V naší laboratoři se snažíme zavést robustní analytické metody, pomocí kterých lze kvantitativně monitorovat obsah použitého léčiva uvnitř buněk. Věříme, že nalezení kvantitativního vztahu mezi změnami intracelulárního obsahu léčiva a pozorovanou rezistencí je přístup, který umožní odhadnout skutečný příspěvek P-gp nebo jiných transportérů ke vzniku MDR. Tuto strategii testujeme na buněčných liniích in vitro. Naše výsledky na základě přímého měření intracelulárního obsahu léčiva ukazují, že aktivita P-gp se podílí na pozorované rezistenci pouze částečně.

Projekt je podporován grantem Ministerstva zdravotnictví ČR, grant NR9482-3.

1249

Disruption of negative feedback loop between PU.1 and miR-155 is a putative pathogenesis factor in chronic lymphocytic leukemia (CLL)

K. Vargová, J. Kokavec, J. Zavadil, T. Stopka

Ústav patologické fyziologie 1. lékařské fakulty UK Praha; Pathology, School of Medicine, New York University, New York, USA

Role of small non-coding microRNAs (miR) in hematopoiesis has been recently established by work demonstrating critical importance of miR-223 for granulocytic development (Johnnidis 2008) and miR-155 in lymphocytic differentiation (Thai 2007) in mice. Importance of miR-155 is further supported by several independent discoveries demonstrating its increased levels in human diffuse large B-cell lymphoma (Eis 2005, Kluvier 2005, Volinia 2006, Lawrie 2007, Rai 2008) and in chronic lymphocytic leukemia (CLL) (Fulci 2007, Marton 2008). PU.1 is ETS family transcription factor involved in myeloid differentiation that targets directly miR-155 (Vigorito 2007). We demonstrate in primary CLL (N = 27) and normal (N = 13) peripheral blood mononuclear cells significantly increased miR-155 levels and also demonstrate that PU.1 levels are significantly decreased. In addition, we have tested genes that are targets of both miR-155 and PU.1 including CSF1R and FOS and again demonstrate their significantly decreased expression. Using gene expression profiling of CLL peripheral lymphocyte samples compared to normal controls, we have determined significant downregulation of the PU.1 mRNA and of additional numerous miR-155 targets previously reported to be required for myeloid differentiation. In conclusion, disturbance in miR-155/PU.1 ratio is a putative pathogenesis factor in CLL where miR-155 targets including PU.1 and PU.1-dependent transcriptional profiles are significantly downregulated whereas miR-155 is strongly upregulated.

1247

B-cell associated microRNA clusters miR-17-92, miR-106b-25 and miR-106a-363 are targets of PU.1

V. Pospíšil, K. Vargová, J. Kokavec, J. Zavadil, T. Stopka

Ústav patologické fyziologie 1. lékařské fakulty UK Praha; Pathology, School of Medicine, New York University, New York, USA

MicroRNA clusters 17-92, 106b-25 and 106a-363 when processed into specific set of miRs belong to important regulators in B-cell development and lymphoma (Ventura 2008). B-cell development is also regulated by ETS family transcription factor PU.1 (SPI1, Sfp1) and its target

genes. PU.1 fused to the ligand binding domain of the estrogen receptor (PU.1-ER) expressed and activated in PU.1 null mouse hematopoietic progenitors induced both polycistronic RNA of 17-92, 106b-25 and 106a-363 clusters and also levels of spliced miRs including 17-5p, 20a, 92, and 106b. In addition, we demonstrate that 106a-363 is a direct target of PU.1 that upon binding upstream of the 106a into several PU.1 binding regions cause active chromatin state including histone H3K9 hyperacetylation. We present evidence that the 17-92, 106b-25 and 106a-363 polycistronic RNAs are directly regulated in PU.1-dependent mode.

1191

Příprava zralých a funkčních dendritických buněk s vysokou produkcí IL-12 pro klinické využití při protinádorové vakcinaci

K. Macková, P. Vidláková, Z. Hroteková, L. Kovářová, K. Skálová, D. Očadlíková, J. Michálek

Univerzitní centrum buněčné imunoterapie MU Brno; I. dětská interní klinika Lékařské fakulty MU a FN Brno, pracoviště FDN JGM

Dendritické buňky (DB) jsou považovány za nejúčinnější antigen-prezentující buňky, které sehrávají klíčovou roli v aktivaci T-lymfocytů a indukcii protinádorové odpovědi. Optimální postup *in vitro* přípravy zralých DB, které jsou charakterizovány expresí kostimulačních molekul CD83, CD80, CD86, expresí HLA I. i II. třídy, vysokou produkcí interleukinu IL-12 a nízkou produkcí IL-10, je stále hledán. Zatímco donedávna byl kladen důraz především na imunofenotyp DB, v současnosti je stále více vyzdihován význam IL-12. Produkce IL-12 je nezbytná k polarizaci imunitní odpovědi tak, aby došlo k optimální aktivaci pomocných (Th1) i cytotoxických (Tc) T-lymfocytů. V této studii jsme porovnávali několik postupů *in vitro* přípravy zralých DB pro potřeby klinické studie. Metodou gradientové centrifugace byly izolovány mononukleární buňky z periferní krve zdravých dárců. Jejich adherentní frakce byla po 2hodinové inkubaci kultivována v přítomnosti IL-4 a GM-CSF po dobu 5 dnů. Následně byl přidáván antigen (apoptická tělíčka buněk myelomové linie ARH 77) a různé, již dříve popsané maturační koktejly (MK) cytokinů zahrnující buď IFN γ a LPS (MK1), TNF α , IL-1 β , PGE2 a IL-6 (MK2), nebo IFN α , TNF α , IL-1 β , PGE2 a TLR7/8 ligand R848 (MK3). Imunofenotypizace byla prováděna na průtokovém cytometru FACS Canto a produkce cytokinů byla měřena pomocí FACS Array. Nejprve bylo provedeno hodnocení fenotypu DB, které neprokázalo statisticky významné rozdíly mezi použitými MK při dostatečně vysoké expresi (nad 80 %) jednotlivých maturačních markerů CD83, CD80, CD86 a HLA-DR.

Značné rozdíly však byly zaznamenány v produkci cytokinů. Produkce IL-12 byla nejvyšší s MK1 (2 619–5 349 pg/ml), částečná produkce IL-12 byla zaznamenána s MK3 (202 až 378 pg/ml) a zanedbatelná byla s MK2 (0–4,2 pg/ml). Přitom poměr mezi produkcí IL-12 a IL-10 byl nejvyšší u MK1, dobrý u MK3 a nevyhovující u MK2 (13,5; 6,5; 0,07). Pro přípravu vakcíny na bázi DB pro plánované klinické studie bude využíván maturační koktejl MK1 obsahující IFN- γ a LPS, který nejlépe splňuje kritéria optimalizované vakcíny zralých DB silně produkujících IL-12.
Tato práce byla podpořena grantem MSMT LC06027 a IGA NR8945-4.

1161

Molekulární identifikace T-lymfocytárních klonů specifických pro reakci štěpu proti leukemii

V. Foltánková, E. Matějková, M. Bartoš, M. Dendis, A. Stejskalová, L. Raida, K. Indrák, J. Mayer, J. Michálek
Univerzitní centrum buněčné imunoterapie MU Brno; Genex CZ, s.r.o., Brno; Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc; Interní hematoonkologická klinika Lékařské fakulty MU a FN Brno, pracoviště Bohunice

Cílem studie bylo identifikovat a charakterizovat klony T-lymfocytů, které jsou specificky reaktivní vůči leukemickým buňkám. Tyto klony jsou schopny navodit reakci štěpu proti leukemii (graft-versus-leukemia – GVL), jež je využívána při alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk v adoptivní imunoterapii hematologických nádorových onemocnění. V primární smíšené leukocytární reakci (mixed leukocyte reaction – MLR) in vitro byly T-lymfocyty dárce vystaveny nenádorovým buňkám příjemce (pacienta). Nežádoucí aloreaktivní klony T-lymfocytů byly selektivně depletovány pomocí anti-CD25 imunotoxinu. Alodepletované T-lymfocyty byly poté stimulovány v sekundární MLR leukemickými buňkami téhož příjemce. Populace aktivovaných protileukemických T-lymfocytů byla imunomagneticky separována na základě produkce aktivačního markeru INF- γ nebo CD25. K identifikaci individuálně specifických protileukemických klonů T-lymfocytů jsme využili tzv. „klonotypového eseje“, jež se zakládá na analýze jedinečné sekvence hypervariabilní oblasti podjednotky β TCR receptoru (TCRB-VDJ). Ze separovaných buněk byla izolována poly(A) mRNA, z níž jsme reverzní transkripcí získali cDNA. Cílový úsek cDNA jsme amplifikovali dvěma různými PCR metodami – anchor PCR a PCR s primery specifickými pro variabilní region TCRB. cDNA knihovna obsahující všechny možné sekvence TCRB-VDJ byla vytvořena ligací PCR produktu do plazmidového vektoru a transformací *Escherichia coli*. Plazmidy izolované z bakteriálních kolonií byly sekvenovány.

Předpokládáme, že frekvence jednotlivých TCRB-VDJ sekvencí v rámci analyzovaných bakteriálních kolonií odpovídá procentuálnímu zastoupení příslušných aktivovaných T-lymfocytárních klonů v buněčné populaci. Charakterizovali jsme T-lymfocytární klony aktivované leukemickými buňkami pacientů léčených s AML a CLL. Populace selektivně depletovaných protileukemických T-lymfocytů dárce byly oligoklonální, tj. vyskytoval se zde omezený počet individuálních imunodominantních klonů, které hrají významnou roli ve specifické GVL reakci.

Práce byla podpořena grantem MŠMT NPVII, 2B06058.

1175

Příprava protinádorové vakcíny pro pacienty s mnohočetným myelomem na bázi dendritických buněk naložených monoklonálním imunoglobulinem podle podmínek správné výrobní praxe

D. Očadlíková, L. Zahradová, L. Kovářová, J. Smejkalová, L. Pour, P. Vidláková, D. Kyjovská, J. Moravcová, M. Rycová, M. Penka, J. Michálek, R. Hájek
Univerzitní centrum buněčné imunoterapie MU Brno; Interní hematoonkologická klinika Lékařské fakulty MU a FN Brno, pracoviště Bohunice; Oddělení klinické hematologie FN Brno, pracoviště Bohunice

Od června roku 2006 byla zahájena na našem pracovišti klinická studie fáze II zaměřená na podání protinádorové vakcíny pacientům s mnohočetným myelomem (MM). V září roku 2007 bylo dokončeno vyhodnocení imunitní a klinické odpovědi u prvních 4 pacientů. Vakcína obsahovala dendritické buňky (DB) pacienta naložené autologním monoklonálním imunoglobulinem (MIg), Id-proteinem, produkovaným myelomovými buňkami. Jednalo se o 4 pacienty s MM ve fázi stabilního či mírně aktivního onemocnění. Každému pacientovi bylo podáno 6 vakcín s odstupem 1 měsíce, intradermálně. Podle podmínek správné výrobní praxe (SVP) byly kultivovány DB z mononukleárních buněk periferní krve (MNPK) pacienta po dobu 9 dnů. 6. den kultivace byly naloženy autologním Id-proteinem izolovaným z plazmy pacienta metodou afinitní chromatografie podle podmínek SVP. Po provedení testů bezpečnosti a jakosti byla vakcína splňující kritéria pro podání aplikována pacientovi. Imunofenotypizace DB byla prováděna na průtokovém cytometru, imunologická odpověď na vakcínu byla hodnocena metodou ELISpot. Klinická odpověď byla sledována pomocí koncentrace MIg v séru pacientů. Po ukončení vakcinace byli pacienti sledováni v rámci imunomonitoringu a klinické odpovědi dalších 6 měsíců. Celkem bylo připraveno 24 vakcín vyhovujících kritériím podání. Ze 60 × 10⁶ MNPK bylo získáno 8,66 × 10⁶ DB (0,89–32,0 × 10⁶), medián

(min–max). Funkční charakteristika DB byla prokázána pomocí imunofenotypizace na průtokovém cytometru, v den podání bylo HLADR/CD86 pozitivních 95,00 % DB (50,10–99,30 %), medián (min–max). U 29,17 % aplikací (7/24) došlo po podání vakcíny k zarudnutí v místě vpichu a u 62,5 % (15/24) aplikací i ke vzniku zatvrdnutí. Medián vymizení lokální reakce byl 4 dny (2–6). U 1 pacienta byly zaznamenány subfebrilie do 37,2 °C po každém podání vakcíny. Metodou ELISpot byla zaznamenána imunologická odpověď u 75 % (3/4) pacientů. V průběhu dosavadní doby sledování 21 měsíců došlo k progresi choroby u 2 pacientů, 2 zůstali bez progresu MM. Vakcína na bázi DB byla velmi dobře snášena bez závažných vedlejších účinků. Klinická studie pokračuje vakcinací dalších pacientů s MM.

Tato práce byla podpořena grantem MSMT LC 06027.

NHL 2

1293

Význam eradikace minimální reziduální choroby u pacientů s nonhodgkinskými lymfomy

V. Procházka, T. Papajík, Š. Rožmanová, M. Jarošová, K. Indrál

Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc

Úvod: Folikulární lymfom je stále považován za konvenčně nevléčitelné onemocnění. Cílem moderních léčebných postupů je navození eradikace nádorového klonu a navození dlouhotrvající remise onemocnění. Efektivní metodou k posouzení kvality remise je molekulárně-genetické (PCR) vyšetření fúzní přestavby genů Bcl2/IgH, která je pozitivní u většiny pacientů s folikulárním lymfomem (FL), vzácněji i u lymfoplazmocytárního (LPL) a B-difúzního velkobuněčného lymfomu (B-DLCL).

Metoda: Přestavba Bcl-2/IgH byla vyšetřována pomocí 2kolové nested PCR – z kostní dřeně a periferní krve při diagnóze, při restázování choroby a při pravidelných kontrolách. Celkem bylo zachyceno 92 Bcl-2/IgH pozitivních pacientů s mediánem věku při diagnóze 52 let. Převažovala diagnóza FL (86/92), ojediněle byl zastoupen B-DLCL (4/92) a LPL (2/92). Pokročilá choroba (stadium III/IV dle Ann Arbor) diagnostikována v 84,7 % případů, bulk přítomen v 55 %. Pacienti byli stratifikováni dle prognostického rizika (IPI): nízké 48 %/střední 41 %/vysoké 11 %. Léčba v první linii: 65 konvenční chemoterapie, 27 pacientů podstoupilo vysocedávkovanou léčbu s autologní transplantací periferních kmenových buněk. Jeden nemocný byl transplantován alogenně. Rituximab byl použit v rámci léčby 1. linie u 50/92 nemocných. Medián sledování souboru nemocných je 43 měsíců.

Výsledky: Léčebná odpověď byla hodnocena u 72 pacientů: 46 dosáhlo CRm, 12 CR+ a 14 pacientů dosáhlo partiální remise nebo stabilní choroby. Celkové přežití (OS) a přežití bez známek progresu (PFS) bylo v 5 letech 73 %, respektive 36 %. Nemocní, kteří dosáhli CRm, měli nižší pravděpodobnost progresu lymfomu (PFS v 5 letech, $p < 0,001$; 67 % vs 12 %) a větší pravděpodobnost přežití (OS v 5 letech, $p = 0,01$; 92 % vs 54 %) než nemocní s horší léčebnou odpovědí.

Závěr: Dosažení CRm po první linii léčby je spojeno se signifikantně delším intervalem do progresu choroby, což se v delším časovém horizontu promítá i do delšího přežití nemocných. Pro prognózu nemocných je klíčová kvalitní léčebná odpověď bez ohledu na cestu, jakou je dosažena. *Podpořeno výzkumným záměrem MŠMT (MSM 6198959205).*

1182

Kvantitativní sledování minimální reziduální choroby a proliferační aktivity u pacientů s lymfomem z buněk pláště (MCL)

H. Břízová, M. Mrhalová, M. Neradová, R. Kodet

Ústav patologie a molekulární medicíny 2. lékařské fakulty UK a FN Motol, Praha

Molekulárním znakem lymfomu z buněk pláště (mantle cell lymphoma – MCL) je patologická transkripce genu pro cyklin D1 v důsledku t(11;14). Kvantitativní detekce overexpresu cyklinu D1 je tak molekulárním markerem MCL a napomáhá diferenciální diagnóze. Z hlediska prognózy je onemocnění MCL charakteristické rychlou progresí a rezistencí na konvenční terapii B non-Hodgkinovských lymfomů (B-NHL). Přesto existuje skupina pacientů s dlouhým přežitím bez nutnosti agresivní terapie. Nezávislý, statisticky významný prognostický faktor představuje u pacientů s MCL proliferační aktivita. Cílem práce je zavedení kvantitativního sledování minimální reziduální nemoci (MRN) a proliferační aktivity u pacientů s MCL. Zavedli jsme kvantitativní PCR umožňující přesně monitorovat: (1) expresi cyklinu D1 jako molekulárního markeru onemocnění a (2) expresi Ki-67, topoizomerázy II α a TPX2 jako proliferačních markerů v asociaci s nepříznivou prognosou u pacientů s MCL. Hladinu cyklinu D1 jsme vyšetřili u 95 aspirátů kostní dřeně (KD) od pacientů s MCL, 39 KD od pacientů s jiným B-NHL a 10 aspirátů od zdravých dárců. Zvýšenou hladinu cyklinu D1 jsme detekovali pouze u KD s infiltrací buňkami MCL (100% specifita). Získali jsme spolehlivý marker vhodný pro analýzu infiltrace KD, včetně detekce MRN. Dynamiku exprese cyklinu D1 v průběhu onemocnění jsme sledovali u 73 KD od 20 pacientů s MCL. Pozorovali jsme úbytek, případně nárůst hladiny cyklinu D1 při dosažení remise, případně relapsu onemocnění a prokázali jsme prediktivní hodnotu

vyšetření. Pro pacienty s MCL jsme zavedli nový přístup umožňující přesné kvantitativní stanovení exprese Ki-67, topoizomerázy II α a TPX2. Variabilita proliferační aktivity může odrážet heterogenní klinický obraz choroby. Kvantitativní stanovení cyklinu D1 poskytuje spolehlivý cíl pro molekulární sledování dynamiky MRN u pacientů s MCL. Molekulární sledování hladiny cyklinu D1 umožňuje lépe definovat léčebnou odpověď a kvalitu remise, případně včasný záchyt nárůstu onemocnění. Kvantitativní detekce proliferační aktivity poskytuje vhodný nástroj přesného, reprodukovatelného a objektivního stanovení prognostických faktorů. V budoucnu může přispět k určení charakteru onemocnění, případně individualizaci terapie podle rizika.

Podpořeno granty GAUK 46/2006 a MZ ČR 0064203/6704.

1213

Autologní transplantace krvetvorných buněk v první linii léčby zlepšuje léčebné výsledky u pacientů s Mantle cell lymfomem

S. Vokurka, V. Koza, P. Jindra, K. Steinerová, M. Karas, D. Lysák, T. Svoboda

Hemato-onkologické oddělení FN Plzeň

Souhrn: Mantle cell lymfom (MCL) patří mezi prognosticky nepříznivé lymfoidní neoplázie se střední dobou přežití kratší než 5 let. Začleněním imunoterapie anti-CD20 ke konvenční chemoterapii a intenzifikací léčby včetně vysokodávkované chemoterapie s autologní transplantací krvetvorných buněk (APSCT) lze částečně zlepšit léčebné výsledky, ale žádný z těchto postupů nelze pokládat za kurativní.

Cíl: Ověřit efekt APSCT v první linii léčby u pacientů s nově diagnostikovaným MCL.

Metodika: Prospektivní, unicentrické sledování. Hodnocení léčebné odpovědi podle National Cancer Institute (NCI) kritérií. Porovnání doby od diagnózy do relapsu/progrese (EFS) a doby celkového přežití od diagnózy (OS) u pacientů léčených s APSCT a bez této léčby.

Soubor: 48 pacientů s nově diagnostikovaným MCL a po úvodní sérii indukční chemoterapie (CHOP, R-CHOP, VAD + chlorambucil) v letech 1996–2005.

Výsledky: 19/48 (39 %) pacientů s mediánem věku 54 (37–71) let v 1. kompletní (CR) nebo parciální remise (PR) bylo indikováno k APSCT s přípravou protokolem BEAM. Celkem 29/48 (61 %) pacientů bylo dále sledováno. Autologní transplantace zvýšila četnost kompletních remisí z původních 47 % na 94 % pacientů. 3leté PFS a OS u pacientů s APSCT bylo významněji delší než ve skupině bez ní: 51 % vs 15 % ($p = 0,0003$), resp. 87 % vs 42 % ($p = 0,016$). Medián věku a IPI index 3–5 byly signifikantně vyšší u netransplantovaných pacientů: 69 (44–77)

vs 54 (37–71), $p = 0,0002$, respektive 65 % vs 27 %, $p = 0,017$.

Závěr: Data ukazují na efekt dalšího zlepšení léčebné odpovědi a pravděpodobnosti 3letého PFS a OS u pacientů s APSCT v 1. linii léčby. Vliv nižšího věku a IPI indexu na výsledky sledování by vyžadoval další sledování. Pacienti však i nadále relabují a alogenní transplantace musí být vždy zvažována, obzvláště u mladších pacientů.

1307

Význam prognostických faktorů u nemocných s difúzním B-velkobuněčným lymfomem nově diagnostikovaným a léčeným chemoterapií nebo chemoterapií v kombinaci s rituximabem

Z. Kubová, T. Papajík, V. Procházka, L. Raida, J. Hubáček, J. Vondráková, R. Urbanová, J. Procházková, A. Hluší, T. Szotkowski, Z. Šedová, J. Lukeš, L. Kučerová, M. Štícha, T. Pavlík, V. Kajaba, K. Indrák

Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc; Oddělení klinické biochemie FN Olomouc; Ústav patologie Lékařské fakulty UP a FN Olomouc; Univerzitní centrum buněčné imunoterapie MU Brno

Úvod: Kombinace rituximabu (R) a chemoterapie (CHT) zlepšila výsledky léčby a prognózu difúzního B-velkobuněčného lymfomu (DLBCL), ale také změnila prediktivní hodnotu řady prognostických ukazatelů (PU). Cílem práce bylo hodnocení významu vybraných PU ve vztahu k přežití bez progrese (PFS) a celkovému přežití (OS) u nemocných s DLBCL léčených CHT nebo CHT v kombinaci s R.

Metody: U 290 nemocných s DLBCL byl zhodnocen význam hladiny hemoglobinu (Hb), počtu lymfocytů (lymfo), laktát-dehydrogenázy (LDH), β -2-mikroglobulinu (B2M), sérové tymidinkinázy (s-TK), antigenu Ca-125, receptoru pro interleukin-2 (IL-2R), mezinárodního prognostického indexu (IPI) a jeho věku přizpůsobené varianty (aalPI) vzhledem k PFS a OS.

Výsledky: Nemocní s Hb menším než 120 g/l měli nižší 3leté OS, jen pokud byli léčení CHT, stejně tak jako nemocní s počtem lymfo pod $1,4 \times 10^9/l$. Zvýšená LDH si uchovávala svůj význam pro 3leté OS v éře R-CHT (88 % vs 80 %, $p = 0,037$) i CHT (70 % vs 40 %; $p = 0,001$), ve vztahu k PFS význam nalezen nebyl. Rozdíl v OS byl zjištěn u hladiny B2M větší než 3,0 mg/l, a to jak u R-CHT (90 % vs 79 %; $p = 0,015$), tak i u CHT (78 % vs 42 %, $p = 0,001$), podobně i pro PFS. Nemocní s s-TK větší než 15 U/l měli nižší OS než při léčbě R-CHT (91 % vs 77 %, $p = 0,018$), tak při samotné CHT (75 % vs 45 %, $p = 0,001$), významný rozdíl v PFS byl nalezen jen u CHT. Hladina Ca-125 větší než 35 I/l měl význam pro předpověď kratšího OS opět jen u CHT, stejně tak jako hodnota IL-2R vyšší než 115 pmol/l. Výpovědní hodnotu pro OS i PFS si

uchoval IPI, pokud byly hodnoceny skupiny nemocných s IPI 0–2 a 3–5, a to jak v éře CHT (3letý OS 73 % vs 35 %, $p = 0,001$), tak i R-CHT (91 % vs 72 %, $p = 0,001$). Zajímavá byla situace u nemocných mladších 60 let, kde pacienti s IPI 2–3 léčení jen CHT měli kratší OS (89 % vs 45 %, $p = 0,001$) a hraničně i PFS (75 % vs 55 %, $p = 0,084$) než pacienti s IPI 0–1. Ti, kteří byli léčení R-CHT, měli pravděpodobnost OS (90 % a 91 %, $p = 0,755$) i PFS (90 % vs 86 %, $p = 0,699$) identickou, což bylo také dáno intenzivnější R-CHT u rizikovějších nemocných.

Závěr: R-CHT zlepšuje prognózu nemocných s DLBCL, ale také snižuje výpovědní hodnotu řady PU.

Podpořeno VVZ MSM 619 895 9205 a 619 895 9223.

1284

Rituximab v kombinaci s chemoterapií nelimituje sběr periferních kmenových buněk a jejich přihojení po vysoce dávkované terapii a autologní transplantaci u nemocných s difúzním B-velkobuněčným lymfomem

T. Papajík, T. Pavlík, L. Kučerová, Z. Kubová, V. Procházka, E. Faber, L. Raida, I. Skoumalová, Z. Pikalová, J. Vondráková, L. Dušek, K. Indrák
Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc; Univerzitní centrum buněčné imunoterapie MU Brno; Ústav patologie Lékařské fakulty UP a FN Olomouc

Úvod: Publikované analýzy neprokázaly negativní vliv předchozího podání rituximabu (R) a chemoterapie (CHT) na sběr a přihojení autologních periferních kmenových buněk (PKB) u nemocných s nonhodgkinovými lymfomy. Tyto práce naznačily, že užití R by mohlo zlepšit výsledky vysoce dávkované terapie (HDT), a to mj. díky schopnosti R působit lymfodepleci v periferním oběhu. V naší práci analyzujeme efekt R-CHT na sběr a přihojení PKB u nemocných s difúzním B-velkobuněčným lymfomem (DLBCL).

Metody: 69 rizikových nemocných s DLBCL mladších 65 let, kteří po iniciační léčbě dosáhli kompletní nebo parciální remisi, bylo v letech 1999–2007 indikováno k HDT s následnou autologní transplantací (AT) PKB. 31 pacientů bylo iniciačně léčeno CHT, 38 pak kombinací R-CHT. PKB byly mobilizovány po režimu cyklofosamid + etoposid u 6 pacientů, u zbývajících 63 pak po kombinaci cytosin-arabinosid + mitoxantron. Filgrastim byl podáván v dávce 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ode dne 8. BEAM jako přípravný režim před AT byl použit u všech nemocných.

Výsledky: Kombinace R-CHT neovlivnila sběr PKB, a to jak z hlediska množství mononukleárních buněk (medián $5,24 \times 10^8/\text{kg}$ u skupiny CHT a $3,77 \times 10^8/\text{kg}$ u skupiny R-CHT, $p = 0,800$), tak i CD34+ PKB ($13,80 \times 10^6/\text{kg}$ u skupiny CHT a $7,81 \times 10^6/\text{kg}$ u skupiny R-CHT, $p = 0,110$).

Trend k vyššímu zastoupení CFU-GM byl zjištěn ve štěpech nemocných s CHT (medián $98,1 \times 10^4/\text{kg}$) oproti pacientům s R-CHT ($76,6 \times 10^4/\text{kg}$), $p = 0,068$. Významný rozdíl byl nalezen v počtu BFU-E u skupiny CHT ve srovnání s R-CHT ($90,9 \times 10^4/\text{kg}$ vs $31,3 \times 10^4/\text{kg}$; $p = 0,001$). Přihojení štěpu bylo ale v obou skupinách identické, a to jak v granulocytech (11 dní; $p = 0,420$), tak i trombocytech (10 dní; $p = 0,530$). Doba do dosažení hodnot granulocytů $1,0 \times 10^9/\text{l}$ a trombocytů $50 \times 10^9/\text{l}$, resp. $100 \times 10^9/\text{l}$ se v obou skupinách nelišila, stejně tak jako hodnoty hemoglobinu, granulocytů a trombocytů v den +100 po HDT a AT. Skupina léčená R-CHT měla významně lepší 3leté přežití bez události (90 % vs 67 %, $p = 0,041$).

Závěr: Iniciační kombinace R-CHT nemá zásadní negativní dopad na mobilizaci a následné přihojení PKB po HDT, a naopak vede k snížení rizika relapsu a přežití bez návratu choroby.

Podpořeno VVZ MSM 619 895 9205 a MSM 619 895 9223.

1311

Primární CNS lymfomy – zkušenosti centra M. Hrudková, D. Belada, L. Smolej, J. Malý

Oddělení klinické hematologie II. interní kliniky Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové

Primární lymfomy centrálního nervového systému (CNS) jsou vzácná onemocnění postihující nejčastěji mozkový parenchym, méně často meningy, optické nervy či míchu. V naprosté většině případů se jedná o nonhodgkinské lymfomy (NHL) klinického stadia IE. Nejčastějším histologickým typem je DLBCL. Na OKH II. interní kliniky LF UK a FN Hradec Králové bylo od roku 1998 do února roku 2008 diagnostikováno 22 pacientů s primárními CNS lymfomy – 10 mužů (45 %) a 12 žen (55 %) s věkovým mediánem 62,5 let (rozmezí 51–78 let). U 17 pacientů (77 %) se jednalo o DLBCL, u 4 (17 %) o FL, u 1 pacienta nebylo přesné histologické zařazení možné (B-NHL, NOS). Pro diagnózu byla použita u 17 pacientů stereotaktická biopsie pod MR kontrolou, u 5 radikální resekce tumoru. 21 pacientů bylo diagnostikováno ve stadiu IE, 1 pacient ve stadiu IIE. Intenzifikovaným protokolem kombinujícím chemoterapii na bázi vysokých dávek metotrexátu a cytarabinu a radioterapii (dle de Angelisové) bylo léčeno 21 pacientů, u 1 pacienta vzhledem k věku a špatnému vstupnímu klinickému stavu léčba zahájena nebyla. Bylo dosaženo 12 kompletních remisí (55 %), 3 pacienti (14 %) progredovali na léčbě, 1krát se jednalo o stabilní chorobu a u 4 pacientů nebylo možné zhodnocení léčebné odpovědi pro krátkou dobu podání chemoterapie, 1 pacient je stále léčen. Léčbu dokončilo 12 pacientů (u 2 z nich neproběhla radioterapie vzhledem k pokročilému věku), 8 pacientů léčbu nedokončilo pro progresi na léčbě, její

komplikace či úmrtí, 1 pacient je stále léčen. 15 pacientů zemřelo (1krát úmrtí bez zahájení léčby, 2krát relaps, 3krát progresse na léčbě, 8krát komplikace léčby, 1 pacient se SD). Pravděpodobnost přežití ve 2 letech je 40 %. Kombinovanou chemoterapií a radioterapií je možné u mladších pacientů s dobrým vstupním celkovým stavem dosáhnout vysokého procenta kompletních remisí a dlouhodobého přežití. Léčbu je však nutno zahájit neodkladně po stanovení diagnózy a pro diagnózu je výhodnější stereotaktický odběr vzorku. Radikální diagnostické zákroky s sebou přinášejí zhoršení neurologického deficitu, stejně i věk pacientů nad 60 let je spojen s horšími léčebnými výsledky.

Podpořeno výzkumným záměrem MZ č. 00179906.

KONFERENCE NELÉKAŘSKÝCH PROFESÍ 2

1172

Edukační proces u hematoonkologicky nemocných

E. Lihosithová, D. Divišová, M. Zítková

Interní hematoonkologická klinika Lékařské fakulty MU a FN Brno, pracoviště Bohunice

Úvod: Učení neboli edukace nemocných je významnou součástí ošetrovatelské péče. Edukaci lze v užším smyslu vymezit jako záměrné získávání vědomostí, dovedností, v širším smyslu jde o změnu v myšlení člověka, která se projevuje v jeho jednání a chování a přispívá k udržení nebo zlepšení jeho zdravotního stavu a kvality života.

Metoda: Ke zhodnocení úrovně edukace byl vypracován dotazník, který hodnotil 2 ukazatele, objektivní a subjektivní. Objektivní ukazatel zahrnoval jednotlivé oblasti edukačního procesu: otázky z oblasti sebek péče, prevence, užití pomůcek, způsobu, místa a času, kde byla edukace ošetrovatelským personálem prováděna. V otázkách z oblasti sebek péče a užití preventivních opatření a pomůcek bylo zjišťováno subjektivní hodnocení edukace nemocnými pomocí škály 1–5 (kdy 1 = výborně a 5 = nedostatečně) z pohledu srozumitelnosti a dostatečnosti. Šetření bylo provedeno anonymně u 100 respondentů (návrstnost byla 80 %). Dotazník vyplňovali nemocní v průběhu 3.–5. dne hospitalizace. Výsledky šetření byly vyhodnoceny pomocí statistického multivariantního zpracování.

Výsledky: Při použití korelačního koeficientu byla zjištěna významná souvislost mezi četností opakované hospitalizace a hodnocením edukace v oblasti sledování a hodnocení intenzity bolesti a účinků léků. Nemocní hospitalizovaní 3 a vícekrát hodnotí informace spíše průměrně oproti nemocným hospitalizovaným 1–2krát. Dále byl

potvrzen vztah mezi věkem respondentů a též hodnocením edukace v oblasti sledování a hodnocení intenzity bolesti a účinků léků. Dalším potvrzeným vztahem je závislost věku a hodnocení informací týkajících se péče o dutinu ústní.

Závěr: Šetření nám ukázalo zajímavé aspekty týkající se edukace nemocných a potvrdilo význam této oblasti. Pokud má být edukace nemocných účinná, musíme v praxi uplatňovat funkce a cíle edukace, pracovat s charakteristikou edukantů, upravit metody a formy edukace vzhledem k individuálním odlišnostem, kontrolovat a hodnotit námi prováděnou edukaci.

1221

Léčba „novými léky“ (Velcade, Thalidomid) – zkušenosti s organizací péče o nemocné s mnohočetným myelomem

J. Budková, E. Gregora, T. Kozák

Oddělení klinické hematologie FN Královské Vinohrady Praha

Mnohočetný myelom (MM) je zhoubné onemocnění, charakterizované abnormální proliferací a akumulací myelomových buněk, vzniklých maligní transformací v určité fázi diferenciaci B-lymfocytové řady. Mezi nejčastější projevy nemoci patří kostní postižení, porucha funkce ledvin či útlum krve tvorby. Incidence choroby je 3–4/100 000 obyvatel, stoupá po 60. roce věku a tvoří 10–15 % hematologických malignit. Cílem léčby je zmírnění až odstranění příznaků choroby a navození dlouhodobé remise. V terapii MM se nově používá bortezomib (Velcade) a thalidomid. Bortezomib je proteazomový inhibitor a je indikován pro léčbu relapsu MM a u pacientů rezistentních na primoterapii. U thalidomidu se využívá jeho antiangiogenní aktivity, podílí na indukci apoptózy a stimulace NK buněk a indikuje se u MM v primoterapii, při progresi a nebo při rezistenci choroby na léčbu předchozí. Thalidomid i bortezomib jsou při léčbě kombinovány s kortikoidy a/nebo cytostatiky pro jejich synergní účinek. S ohledem na stadium nemoci a další faktory (věk apod.) existuje několik léčebných schémat. Těm pak odpovídá i individuální přístup v organizačním zajištění terapie. Pro všechny režimy je společné ambulantní podávání, resp. podávání na stacionáři v pravidelných cyklech. Před zahájením každého cyklu je nutné zajištění periferního žilního přístupu, laboratorní kontrola, sledující léčebnou odpověď, sledování výskytu nežádoucích účinků, základní fyzikální vyšetření a monitorace fyziologických funkcí. Samozřejmostí je pravidelná edukace pacienta. Současně se základní léčbou probíhá i podpůrná léčba, odpovídající klinickému stavu každého pacienta. Oba léky se primárně používají v hematoonkologických centrech, nicméně po edukaci týmu je lze vzhledem k jejich

účinnosti, bezpečnosti a ambulantnímu způsobu podávání úspěšně použít i na spádových hematologických pracovištích.

1212

Srovnání antimikrobiálních a běžných centrálních žilních katétrů u pacientů s alogenní transplantací krvetvorných buněk

K. Kabátová-Maxová, J. Škardová, L. Bufková-Karasová, J. Červená, P. Kibitzová, J. Kostková, A. Laštovková, R. Novotná, M. Řeřichová, R. Schröderová, J. Zíková, L. Dolejšová, E. Bystřická, S. Vokurka

Hemato-onkologické oddělení FN Plzeň

Úvod: Centrální žilní katetry (CŽK) umožňují realizovat intenzivní transplantační léčbu pacientů s hematologickými malignitami. O klinickém efektu kanyl s antimikrobiální úpravou používaných v rámci alogenních transplantací krvetvorných buněk je velmi málo informací.

Cíl: Porovnat efekt běžných a antimikrobiálně upravených CŽK u pacientů léčených alogenní transplantací krvetvorných buněk.

Metodika: Prospektivní, nesponzorovaná, nerandomizovaná srovnávací studie. Statistika zpracována na GraphPad Statistica Software.

Soubor: 49 pacientů s běžným víceluminálním a netunelizovaným CŽK a 58 pacientů s CŽK s antimikrobiálním chlorhexidin/silver-sulfadiazin potahem.

Výsledky: Nebyly statisticky významné rozdíly mezi skupinami pacientů s ohledem na věk, pohlaví, intenzitu předtransplantační přípravy, trvání leukopenie, počet dní se zavedeným CŽK a počet převazů okluzních krytí CŽK. V antimikrobiální skupině bylo pozorováno méně pacientů s rozvojem horečky (67 % vs 77,5 %, $p = 0,28$), méně dní s výskytem horečky u pacienta [2 (0–18) vs 4 (0–16), $p = 0,17$], méně dní s horečkou na 1 000 dní se zavedeným CŽK (108 vs 147, $p = 0,001$), méně pacientů s pozitivními hemokulturami z CŽK (36 % vs 45 %, $p = 0,05$) a opakovaně pozitivními hemokulturami z CŽK (8,6 % vs 26 %, $p = 0,018$), méně pozitivních hemokultur z CŽK na 1 000 dní se zavedeným CŽK (14 vs 29, $p = 0,005$) a méně pozitivních kultur z hrotu CŽK po jeho vyjmutí (17,3 % vs 34,6 %, $p = 0,065$).

Závěr: Výsledky studie mají klinickou a v některých charakteristikách i statistickou významnost ($p < 0,05$). Menší počet pacientů s výskytem horečky, méně horečnatých dní a méně opakovaně pozitivní hemokultury z CŽK nepřímou ukázkou na možnost méně intenzivní antipyretické a antibiotické léčby potřebné u pacientů se zavedeným antimikrobiálním CŽK. Výsledky a skutečný dopad na spotřebu antibiotik by však měly být ověřeny v randomizované studii s větším počtem pacientů.

1206

Diagnostika a léčba aplastické anémie u gravidní pacientky

J. Springerová, R. Bramborová, D. Belada

Oddělení klinické hematologie II. interní kliniky Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové

23letá gravidní pacientka byla přeložena na naše oddělení v červenci roku 2007 s progredující pancytopenií. Byla provedena řada diagnostických vyšetření vedených s obezřetností na těhotenství. Na základě trepanobiopsie byla stanovena diagnóza aplastické anémie. Byla zahájena léčba – kortikoterapie, stimulace růstovým hormonem, antioitická a antimykotická léčba, substituce transfuzemi erytrocytů a trombocytů a sledování pacientky na porodnicko-gynekologické klinice. Léčba byla komplikována přetrvávající pancytopenií, aftózní stomatitidou, bolestivým výhřezem hemoroidů, subfebriliemi a zhoršeným psychickým stavem. Proto bylo těhotenství ukončeno císařským řezem. Pacientka byla po porodu přeložena na transplantační oddělení, kde byla podána první léčebná volba – antithymocytární globulin, a začal se vyhledávat vhodný nepřibuzenský dárc. V prosinci roku 2007 provedena nepřibuzenská alogenní transplantace, kde po překonání vedlejších komplikací byla pacientka propuštěna do domácího léčení. V únoru roku 2008 byla diagnostikována akutní GVHD kůže. V současné době pacientka dochází na naše oddělení k léčebné terapii GVHD a je v dobrém psychickém a fyzickém stavu.

1204

Úspěšná kombinace systémové a lokální terapie nemocné s kožním T-lymfomem

J. Krpatová, V. Pavlicová, D. Belada

Oddělení klinické hematologie II. interní kliniky Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové

T-lymfomy je možno rozdělit na 2 skupiny, a to vzniklé z T-lymfocytárních prekurzorů (T-lymfoblastické lymfomy) a ze zralých T-lymfocytů (periferní T-lymfomy). První skupina je histologicky dobře charakterizována, druhá skupina již méně. Imunofenotyp periferních T-lymfocytů je velmi různorodý. Výskyt T-lymfomů je mnohem řidší než jejich B-lymfatických protějšků (jen 10–15 % všech lymfomů). Jedná se o 68letou pacientku, u které byl T-lymfom diagnostikován na základě histologického vyšetření z ulcerované léze 7 × 6 cm velké na levém ramenním kloubu v červnu roku 2007. Pacientka byla přijata na standardní oddělení 28. 6. 2007 k plánované chemoterapii CHOP-21 ve složení prednison, endoxan, doxorubicin, vinkristin. Rána silně zapáchala, jednalo se o nekrotickou tkáň. Pacientka byla zpočátku velmi nedůvěřivá, styděla

se ránu ukázat. Pro špatný psychický stav byl domluven pohovor s psychologem. K ošetření defektů byly zvoleny moderní převazové techniky. Pacientka dobře tolerovala chemoterapii a měla uspokojivé hodnoty glykemií, proto bylo rozhodnuto o další terapii ambulantně. Podáno 6krát CHOP-21 a poté následná radioterapie levého ramene v dávce 36 Gr/18 fr. Pacientka se cítí dobře, dosaženo kompletní remise, defekt zhojen, dochází na plánované ambulantní kontroly.

1174

Spirituální potřeby jako součást holistického pohledu

D. Štrajtová, P. Juřeníková, E. Mičudová, M. Zítková

Interní hematoonkologická klinika Lékařské fakulty MU a FN Brno, pracoviště Bohunice

Úvod: Současné moderní ošetřovatelství má za cíl uplatňovat holistický pohled na nemocného člověka, tedy do ošetřovatelského procesu zahrnout nejen biologické, psychologické, sociální, ale také spirituální potřeby. Duchovní potřeby se významnou měrou podílejí na průběhu choroby i vnímání vlastního života nemocných.

Metoda: Cílem průzkumného šetření provedeného v roce 2006 ve FN Brno bylo zmapování potřeb, přání a požadavků nemocných v duchovní oblasti. Šetření bylo provedeno formou anonymního dotazníku u 200 respondentů (návratnost byla 100 %). Dotazník obsahoval 17 položek, které zjišťovaly kromě základních demografických informací subjektivní přání a potřeby nemocných a úroveň informovanosti o duchovních aktivitách ve FN Brno. Výsledky šetření byly zpracovány pomocí statistického multivariantačního zpracování.

Výsledky: Výsledky šetření potvrdily důležitost saturace duchovních potřeb v péči o nemocné. 51 % nemocných očekává od duchovní péče v nemocnici poskytnutí duchovní opory, možnost promluvit si o trápení či pochopení smyslu života. 12 % nemocných očekává pomoc při vyrovnání se s bolestí a 11 % v pomoci při odloučení se od rodiny. 37 % nemocných vnímá závažnost svých duchovních potřeb na stejné úrovni ve srovnání s obdobím před nemocí, 24 % nemocných tuto potřebu hodnotí jako větší. Statistický test nezávislosti 2 potvrdil významnou souvislost mezi vyjadřovanou spokojeností s možnostmi duchovní služby a přijímaným náboženstvím, největší spokojenost vyjadřovali příslušníci římskokatolické církve. Tento test potvrdil i významnou souvislost mezi vnímáním závažnosti duchovních potřeb nemocnými a vhodností umístění kaple.

Závěr: Jedna z ošetřovatelských diagnóz je definována jako „spirituální nepohoda nebo spirituální tíseň“, která může vést k dezintegraci osobnosti, zhoršení akceptace

nemoci a utrpení či sociální izolaci. Oblast spirituality je nedílnou součástí kompetencí zdravotnického pracovníka, který respektuje holistický pohled na pacienta.

1207

Co je to etika, sestřičko?

L. Kalvodová

Interní hematoonkologická klinika Lékařské fakulty MU a FN Brno, pracoviště Bohunice

„Co je to etika, sestřičko?“ je prezentace, která v první části vysvětluje pojmy etika, morálka, deontologie. Etika je nauka o morálce, teorie mravnosti a morálky. Chování a jednání jedinců a institucí poměřujeme podle obecně platných norem. Zjišťujeme mravní kategorie dobré-špatné, čestné-nečestné, lidské-nelidské, věrné-zrádné atd. A právě zkoumáním mravního rozhodování, chování se zabývá etika. Dále se zabýváme pojmem „předporozumění“, to je, že všichni rozumíme a chápeme, co se obecně pojmy a jednáním myslí. Vyjadřujeme předporozumění mravního hodnocení, svědomí, dobrovolnosti, odpovědnosti, sociálního zřetele a vlastní mravní hodnoty. Práce sestry se řídí právě těmito obecně platnými mravními hodnotami a je podle jejich dodržování také hodnocena. Prakticky lze vycházet z náplně práce. Následuje srovnání povinností sester z roku 1870 a 2007 v jakémsi desateru a zhodnocení posunu v povinnostech a etickém chování a jednání práce sestry v rozpětí 137 let. V závěru se letmo dotkneme etických kodexů práce sester.

KONFERENCE ZDRAVOTNÍCH LABORANTŮ 1

1239

40 let HLA laboratoře Transfuzního oddělení a krevní banky Fakultní nemocnice Brno

Z. Válková, L. Marešová, H. Jursová, A. Kostadinov, P. Vorlová, J. Řepková, A. Bartoníčková, L. Janků

Transfuzní oddělení a krevní banka, HLA laboratoř FN Brno

HLA laboratoř Transfuzního oddělení a krevní banky (TO a KB) FN Brno od svého založení MUDr. Zdeňkem Hillem v roce 1968 prošla několika etapami svého vývoje, který kopíroval vývoj HLA problematiky v České republice. 60. a 70. léta minulého století patřila vyšetřování protilátek proti HLA antigenům u těhotných žen a aglutinačním a cytotoxickým testům k vyšetření protilátek proti leukocytům a trombocytům. Spolupráce s Československou aka-

demií věd (ČSAV) a Institutem klinické a experimentální medicíny (IKEM) v Praze přinesla zavedení sérologického stanovení HLA antigenů I. třídy. V průběhu 80. let 20. století byly rutinně vyšetřovány HLA antigeny I. třídy i leukocytární a trombocytární protilátky, které byly v průběhu 90. let 20. století rozšířeny o sérologické vyšetření HLA antigenů II. třídy a o fluorescenční a fotometrické metody na stanovení protilátek. 20. století končilo na HLA laboratoři zavedením molekulárněbiologických technik – metod PCR. Autoři sdělení předkládají ucelený přehled vývoje jednotlivých metodik prováděných na HLA laboratoři TO a KB FN Brno včetně počtu jednotlivých typů vyšetření provedených v období let 2001–2007. Souhrnně bylo ve sledovaném období na HLA laboratoři provedeno celkem 6 378 sérologických typizací HLA I. a II. třídy, 15 110 stanovení metodami PCR a 69 473 vyšetření leukocytárních a trombocytárních protilátek. V roce 2008 je plánováno zavedení nových metod molekulární biologie pro diagnostiku slabých a variantních antigenů D. HLA laboratoř v Brně má po 40 letech působení platné místo mezi laboratořemi s HLA problematikou v České republice a se zaváděním nových metod její přínos pro klinická pracoviště FN Brno i nadále poroste.

1287

Patologické nálezy při screeningovém vyšetření APTT

L. Slavík, J. Úlehlová, J. Ježáková, M. Sýkorová, P. Chalupníková, L. Kořínková, M. Sečkařová

Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc

APTT test patří k základním a nejvyužívanějším koagulačním vyšetřením. V našem sdělení bychom se rádi zaměřili na problematiku diferenciální diagnostiky při patologickém nálezu APTT. APTT se využívá jako screeningový test k vyšetření poruch vnitřní koagulační cesty, kdy se na patologiích podílí zejména defekty faktorů VIII, IX, XI a XII. Nicméně velmi frekvenční příčinou prodloužení APTT je také přítomnost inhibitorů, jak proti jednotlivým faktorům, tak proti aktivačním povrchům fosfolipidů. Z hlediska klinického dopadu je třeba diagnostiku zaměřit především na odlišení inhibitorů lupoidního typu, resp. defektu F XII, které prakticky nepředstavují riziko krvácení, ba naopak představují trombofilní riziko. Komplexní diferenciální diagnostiku demonstrujeme na 2 kauzistikách, které představují v prvním případě pacienta s typickým nálezem lupus antikoagulans a v druhém případě pacienta s kombinací lupus antikoagulans a smíšeného inhibitoru. Z hlediska klinického dopadu je komplexní znalost možností diferenciální diagnostiky

APTT velmi důležitá pro optimální volbu zajištění invazivních výkonů u vyšetřovaných pacientů.

1286

Diseminovaná intravaskulární koagulopatie

J. Úlehlová, L. Slavík, P. Chalupníková, J. Ježáková, L. Kořínková, M. Sečkařová, M. Sýkorová

Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc

Diseminovaná intravaskulární koagulopatie (DIC) představuje získaný syndrom systémové poruchy krevního srážení, který může vzniknout na podkladu sekundárního nebo jiného základního onemocnění nebo patologického stavu. DIC je život ohrožující syndrom, který je velmi obtížně definovatelný jak klinicky, tak laboratorně a léčebně. Při DIC dochází k systémovému poškození endotelu cév, trombocytů a rozvratu v plazmatickém koagulačním systému. Dynamika syndromu závisí na mnoha faktorech, jako jsou příčina vzniku, fáze a charakter DIC. Hlavní roli však hrají komponenty koagulačního systému, což jsou trombocyty, endotel cév a plazmatický koagulační systém. DIC může doprovázet gynekologické a porodnické komplikace, infekce (septikemie, viremie), nádorová onemocnění včetně leukemií, traumata, popáleniny, nekrózy tkání, jaterní choroby, srdeční a periferní cévní postižení, imunitní reakce, otravy, šok, léky atd. Diagnostika DIC je dána závažností klinického stavu a poločasem sledovaných markerů, proto nelze využít moderních markerů (trombin-antitrombinové komplexy, F 1 + 2 štěpení fibrinogenu, příp. fibrinové monomery). Z laboratorních parametrů pro diagnostiku využíváme snížení hladiny trombocytů (resp. přítomnost schistocytů), snížení hladiny antitrombinu III, protrombinového času, aktivovaného parciálního tromboplastinového času, trombonového času, fibrinogenu a pozitivitu D-dimeru, resp. fibrin-fibrinogen degradačních produktů. Dle charakteru rozlišujeme formu DIC chronickou a akutní. U akutní DIC je nejčastějším iniciálním klinickým projevem krvácení a hypoperfuze orgánů. Bez adekvátního terapeutického zásahu dochází k rozvoji šokového stavu a úmrtí pacienta. U chronického DIC jsou v popředí klinického obrazu tromboembolické projevy (žilní a arteriální trombózy, infarkty, nebakteriální trombotická endokarditida). Krvácení je lehkého až středně těžkého stupně, hlavně v oblasti kůže a sliznic. Vyskytuje se u maligních onemocnění, jaterních onemocnění. Součástí prezentace jsou 2 kauzistiky. První kauzistikou je pacient s typickou chronickou formou DIC v důsledku rozsáhlého hemangiomu. V druhém případě se jedná o pacienta s akutní formou DIC v důsledku akutního septického stavu.

1272

Kvantitativní stanovení hematopoetických progenitorových buněk na hematologickém analyzátoru krevních buněk**J. Jurášová, E. Opichalová, A. Lapčíková, J. Ježáková, M. Novák, Z. Pikalová, B. Škůrková***Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc*

Zralé krevní buňky mají omezenou životaschopnost a jsou kontinuálně nahrazovány mladšími buňkami proliferujícími a diferencujícími se z pluripotentních hematopoetických kmenových buněk. Elementy všech hematologických vývojových linií jsou obnovovány z primitivních hematopoetických progenitorových buněk (HPC). Znak CD34 byl historicky 1. diferenciačním markerem rozpoznatelným na primitivních lidských hematopoetických buňkách. HPC buňky či buňky nesoucí znak CD34+ jsou vyplavovány do periferního krevního oběhu po předchozí chemoterapii a následné stimulaci pacienta nebo dárce růstovými faktory. Stanovení jejich počtu je využíváno jako marker indikující optimální čas sběru periferních kmenových buněk (PBSC) k jejich následné transplantaci. V současné době se pro kvantifikaci těchto buněk prakticky používají 2 metody: (1) analýza metodou průtokové cytometrie, (2) stanovení počtu HPC buněk pomocí automatického hematologického analyzátoru Sysmex XE-2100. První metoda kvantifikace CD34+ buněk pomocí průtokové cytometrie je na našem pracovišti běžně používána a zajišťuje velmi přesné výsledky díky velkým souborům analyzovaných buněk. Je však náročná na čas a finance, vyžaduje odbornost obsluhy a zkušenost při interpretaci výsledku. V laboratoři rutinního provozu jsme zavedli i druhou metodu. Automatický hematologický analyzátor Sysmex XE-2100 využívá speciální software HPC MASTER a příslušnou lyzační reagentii. Nezralé buňky jsou více rezistentní k lýze. Software dovoluje analýzu cílových buněk užitím IMI kanálu (Immature Myeloid Information). V porovnání s první metodou je druhá metoda levnější, rychlejší a nenáročná na erudici obsluhy. Z těchto důvodů ji lze využívat v běžném laboratorním provozu. Je však méně přesná. Cílem naší práce bylo zhodnocení těchto analytických přístupů, vyhodnocení přijatelnosti pro předtransplantační vyšetření pacientů a dárců, stanovení cut-off počtu HPC k určení optimálního času sběru PBSC, a tím k získání kvalitního štěpu. Naměřené výsledky jsou předmětem našeho sdělení.

1289

AML z pohledu morfologie a průtokové cytometrie**M. Hončíková, T. Kozák, M. Špaček, P. Salačová***Oddělení klinické hematologie FN Královské Vinohrady Praha*

AML je maligní transformace kmenové hematopoetické buňky, která je spojená s úplnou nebo částečnou ztrátou schopnosti diferenciaci při zachovalé schopnosti proliferace. Etiologie není doposud známa. V období leden roku 2007 až únor roku 2008 jsme vyšetřili 49 pacientů s podezřením na akutní leukemii, u 26 byla diagnostikována AML, 15 ALL, 8 RAEB. Při podezření na akutní leukemii vždy vyšetřujeme krevní obraz a kostní dřeň v mikroskopu, cytochemické barvení a imunofenotypizační vyšetření. Na základě morfologického hodnocení krevního obrazu a kostní dřenež kontinuálně navazuje vyšetření na průtokovém cytometru, které z velké části upřesní typ akutní leukemie. Definitivní závěr akutní leukemie dle WHO klasifikace určí až soubor všech vyšetření včetně molekulární genetiky.

1288

Sledování spermatogeneze u mužů s Hodgkinovým lymfomem pomocí průtokové cytometrie**H. Ouvínová, T. Kozák, J. Marková, M. Havranová***Oddělení klinické hematologie FN Královské Vinohrady Praha*

Hodgkinův lymfom (HL) je systémové nádorové onemocnění lymfatické tkáně (převážně postihující lymfatické uzliny, ale i jiné orgány s lymforetikulární tkání). 70 % pacientů je v době diagnózy ve věku 18–35 let a většina z nich nemá ještě děti. Dlouhodobé remise dosahuje 85–95 % pacientů a jejich životní naděje je v současné době 40 let. Toto onemocnění je provázeno poruchou fertility (plodnosti) mužů. Nádorové onemocnění má již před léčbou supresivní vliv na tvorbu spermií. V době diagnózy má většina mužů s HL výraznou oligo/azoospermii (nízký počet až nepřítomnost spermií v ejakulátu), která se dále prohloubí během léčby. Pokud během chemoterapie/radioterapie nedojde k ireverzibilnímu poškození zárodečné tkáně varlete, je až v 80 % naděje, že se do 5 let spermatogeneza (a tedy i plodnost) obnoví. Proto je sledování spermatogeneze u mužů s HL velmi důležité. Měření některých kvalitativních i kvantitativních znaků spermií pomocí průtokového cytometru nám umožňuje kit SpermFlow

firmy Exbio. Důležitými parametry, které ovlivňují schopnost oplodnění a které je možno stanovit, jsou počet spermií, jejich životnost, integrita akrozomu a přítomnost intraakrozomálního vazebného proteinu. Přítomnost leukocytů v ejakulátu může upozornit na eventuálně probíhající zánět či infekci močového ústrojí. Díky jednoduchému použití kitu na průtokovém cytometru lze i u pacientů s maligními lymfomy sledovat spermatogenezi v rámci kontrolních vyšetření.

CLL 1

1267

Expres reverzní telomerázy (hTERT) u pacientů s B-CLL

R. Plachý, J. Pavlíček, H. Urbánková, M. Novák, T. Papajík, M. Jarošová

Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc

Úvod: B-chronická lymfatická leukemie (B-CLL) je nejčastěji diagnostikovanou leukemií u dospělých. Molekulárně-biologické prognostické markery nabývají v posledních letech stále většího významu při přesnějším definování rizikových skupin nemocných. Jedním z nově studovaných markerů je expres reverzní telomerázy (hTERT).

Cíl: Záměrem naší práce bylo stanovit expresi hTERT u pacientů s B-CLL, určit její dopad na prognostickou stratifikaci těchto pacientů a porovnat expresi telomerázy s prognostickými markery, které jsou u pacientů s B-CLL standardně vyšetřovány, tj. mutačním stavem variabilních částí těžkých řetězců imunoglobulinů, cytogenetikou a flow-cytometricky stanovenou hladinou ZAP-70.

Materiály a metody: Vyšetřena byla expres genu hTERT u 47 pacientů s B-CLL. RNA byla získána z mononukleární frakce nebo plné periferní krve z doby diagnózy. Kvantita transkriptů hTERT byla vztažena k expresi genu ABL za použití hydrolyzačních sond (LightCycler, Roche).

Výsledky: Medián expres hTERT u pacientů s nemutovanými řetězci IgVH byl 4násobný ve srovnání s mediánem expres hTERT ve skupině s mutovanými řetězci IgVH. Vysoká expres hTERT statisticky signifikantně korelovala s nemutovaným stavem IgVH ($p < 0,00001$). Celková shoda mezi mutačním stavem IgVH a expresí hTERT byla 87 %. Naproti tomu shoda mezi mutačním stavem IgVH a ZAP-70 byla pouze 62 % a navíc mezi nimi nebyl prokázán statisticky signifikantní vztah ($p = 0,31$).

Shrnutí: Expres hTERT vykazuje vysokou konkordanci s mutačním stavem řetězců IgVH. K posouzení role hTERT jako potenciálního „surrogate markeru“ mutačního stavu IgVH bude potřeba provést analýzy na větším souboru pacientů.

Práce je podporována granty: LF UP 91110211 a IGA NR 9484-3.

1266

High resolution melting curve analysis (hrMCA) – metoda pro rychlou detekci mutací genu TP53 u pacientů s B-CLL

J. Pavlíček, R. Plachý, B. Kantorová, M. Holzerová, H. Urbánková, T. Papajík, M. Jarošová

Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc

Úvod: B-chronická lymfatická leukemie (B-CLL), nejčastěji diagnostikovaná leukemie dospělého věku, je charakterizována vysokou biologickou a klinickou heterogenitou. Mezi významné prognostické markery patří mutační statut IgVH a chromozomální aberace 11q-, +12, 13q-, a 17p-. Změny na chromozomu 17 zahrnují také tumorový supresor TP53. Kromě delecí bývá gen TP53 poškozen bodovými mutacemi. Zlatým standardem v detekci bodových mutací je přímé sekvenování. Tento přístup je však finančně a časově náročný. Jako alternativa přímého sekvenování by mohla sloužit analýza křivek tání (High Resolution Melting Curve Analysis – hrMCA). hrMCA je založena na srovnání teplot tání (T_m) PCR produktů kontroly a testovaného vzorku. Pokud je T_m rozdílná, jedná se velmi pravděpodobně o vzorek s mutantní sekvencí genu TP53.

Cílem projektu bylo otestovat vhodnost metody hrMCA jako alternativy přímého sekvenování. Specifita a senzitivita byla posuzována ve srovnání s přímým sekvenováním. Pro analýzu byly použity exony 5–8 (obsahují 94,2 % popisovaných mutací genu TP53).

Metodika: Analýza byla provedena na souboru 47 pacientů s diagnózou B-CLL, u kterých byla cytogeneticky detekována delecce 17p. DNA byla získána z mononukleární frakce nebo plné krve z doby diagnózy. Po PCR amplifikaci exonů 5–8 byla provedena hrMCA na přístroji LightCycler 480 (Roche). Všechny vzorky byly následně osekvenovány na přístroji ABI 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Výsledky: Ze 47 pacientů byla metodou hrMCA detekována mutace u 22 (47 %) pacientů. U 5 pacientů mutace v exonu 5, u 6 pacientů mutace v exonu 6, u 6 pacientů mutace v exonu 7 a u 5 pacientů mutace v exonu 8. Všechny mutace detekované metodou hrMCA byly ověřeny přímým sekvenováním. V sekvenovaných vzorcích, které vyšly po hrMCA jako nemutované, nebyly prokázány žádné další mutace.

Závěr: hrMCA se jeví jako vhodná alternativa pro screening mutací v genu TP53. Její předností je nízká cena, rychlost, vysoká citlivost, nízká možnost záměny vzorku a cross-kontaminace z důvodu provádění celé analýzy v jedné zkumavce. Před zavedením do rutinního použití je třeba provést analýzu na větším souboru pacientů.

Práce je podporována granty MSM 619 895 92 05 a IGA NR 9484-3.

1259

Nové a fenotypicky neobvyklé varianty genu p53 u pacientů s chronickou lymfocytární leukemií**S. Peková, M. Špaček, I. Železná, A. M. Buhl, L. Smolej, T. Kozák, M. Průcha***Nemocnice Na Homolce, Praha; FN Královské Vinohrady Praha; Rigshospitalet, Kodaň, Dánsko; FN Hradec Králové*

Aberace genu p53 jsou považovány za prognosticky nepříznivý faktor. Přibližně polovina všech nádorů má poškozený gen p53, v případě CLL přibližně 10 % pacientů nese defekt p53. Aberace p53 jsou standardně zjišťovány cytogeneticky, jako delece 17p-, kam byl p53 mapován. Nicméně i cytogeneticky normální karyotyp může skrývat defekty p53, které jsou postižitelné pouze molekulárními technikami. Nalezené mutace p53 jsou velmi heterogenní, od krátkých inzercí, delecí, bodových substitucí až po sestřihové varianty, které jsou postižitelné pouze na úrovni RNA. Díky vysoké heterogenitě mutací nalezených na molekulární úrovni je problematické rozhodnout o jejich fenotypové relevanci, proto je nutné ověřit nalezené varianty p53 i funkčně (FASAY). Pomocí funkčního testu FASAY jsme otestovali 661 diagnostických vzorků CLL pacientů. Zčásti se jednalo o retrospektivní, zčásti o prospektivní konsekutivní vzorky. Sekvence kódující sekvence exon 4 – exon 10 genu p53 pro potvrzení klonálního charakteru nalezené mutace byla provedena v 563 případech retrospektivních vzorků a FASAY pozitivních konsekutivních vzorků. V celém souboru 661 pacientů byla mutace nalezena v 87 případech (13,2 %). Srovnáním se sekvenčním vyšetřením jsme zjistili, že 32 případů bylo postižitelných pouze pomocí senzitivní techniky FASAY. Tudiž pouhým sekvenováním p53 uniká 4,9 % případů s drobnou porcí p53 mutantního klonu, který však může podlehnout klonální evoluci a přerůst původní leukemickou populaci, která mutaci p53 nese. Pomocí FASAY jsme identifikovali i 9 fenotypicky zvláštních, teplotně-senzitivních variant p53 a novou sestřihovou variantu „ δ ex6“, na jejichž biologické charakterizaci intenzivně pracujeme.

1300

Screening genetických prognostických faktorů u pacientů s B-CLL metodou MLPA**L. Mihók, A. Žáková, M. Džubasová, M. Čermák, P. Nováková, D. Ilencíková, L. Plank***Oddelenie onkologickej genetiky Národného onkologického ústavu Bratislava, Slovenská republika; Ústav patologickej anatómie Jesseniovej lekárskej fakulty UK a MFN Martin, Slovenská republika*

Cieľ: Detekcia numerických a štruktúrnych chromozómových aberácií u pacientov s chronickou lymfocytovou

leukemiou B-typu (B-CLL), ktoré predstavujú významné prognostické faktory predikujúce nepriaznivý priebeh ochorenia. Etablovanie molekulovo-genetickej vyšetrovacej metódy MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) pre skríning prognostických markerov a korelácia získaných nálezov s metódou interfázovej FISH (I-FISH) analýzy. Detekcia a určenie frekvencie výskytu sporadických chromozómových aberácií asociovaných s B-CLL.

Metódy: 72-hodinová kultivácia periférnych leukocytov stimulovaných mitogénom Pokeweed, I-FISH, fragmentačná analýza s využitím komerčného kitu SALSA MLPA CLL1(P037) a CLL2 (P038) (MRC-Holland) a genetického analyzátoru ABI PRISM 3130.

Výsledky: Vzorky kultivovanej periférnej krvi u 93 pacientov s B-CLL boli vyšetrované primárne metódou MLPA a pozitívne nálezy následne verifikované metódou I-FISH. Chromozómové aberácie boli detekované u 74 % pacientov, z toho 1 aberáciu malo 63,8 %, 2 aberácie 27,5 % a 3 a viac aberácií 8,7 % pacientov. Najčastejšie detekované boli genomické delécie 13q14.3 (58 %), 11q23 (21,7 %), 17p13.1 (20,3 %) a trizómia 12 (17,4 %). Vyšetrením metódou MLPA boli zachytené aj ďalšie sporadické chromozómové zmeny väčšinou v kombinácii s minimálne jednou z frekventovaných aberácií. Boli to del6q25 (4,3 %), del9p21 (CDKN2A/B) (5,8 %), dup2p24.1 (MYCN) (4,3 %), dup8q24.12 (MYC) (4,3 %), del10q23.31 (PTEN) (2,9 %) a trizómia 19 (4,3 %). Genetické nálezy týchto chromozómových aberácií budú porovnané s klinickým priebehom ochorenia.

Záver: Porovnanie výsledkov metódy MLPA a I-FISH potvrdilo dobrú koreláciu oboch vyšetrení. Metóda MLPA predstavuje rýchlu a efektívnu metódu pre presnejšiu charakteristiku patognomických oblastí a je vhodnou skríningovou metódou pre identifikáciu širokého spektra chromozómových aberácií pri genetickom vyšetrení pacientov s B-CLL.

1253

Přítomnost heterozygotní delece ATM nedeterminuje odpověď CLL buněk na fludarabin**S. Čejková, L. Ročňová, D. Potěšil, J. Šmardová, J. Malčíková, D. Žezulková, M. Doubek, Y. Brychtová, Š. Pospíšilová, J. Mayer, M. Trbušek***Centrum molekulární biologie a genové terapie Interní hematologické kliniky Lékařské fakulty MU a FN Brno, pracoviště Bohunice; Ústav chemie Přírodovědecké fakulty MU Brno; Ústav patologie FN Brno, pracoviště Bohunice; Oddělení lékařské genetiky FN Brno, pracoviště FDN JGM*

Úvod: Abnormality genů TP53 nebo ATM významně zhoršují prognózu CLL pacientů. V několika studiích byla prokázána silná rezistence CLL buněk s abnormalitami genu TP53 k fludarabinu, stěžejnímu léku pro toto one-

mocnění. Předběžné publikované výsledky naznačují, že by se rezistence na fludarabin mohla pojit i s mutacemi genu ATM anebo nízkou hladinou tohoto proteinu. Cílem naší práce bylo zjistit souvislost mezi delecí genu ATM v CLL buňkách a jejich citlivostí na fludarabin a dále stanovit, zda u těchto buněk dochází k indukci dráhy Atm/p53, která se aktivuje po poškození DNA chemoterapeutiky.

Metodika: Delece TP53 a ATM jsme detekovali pomocí I-FISH a mutace TP53 funkční analýzou FASAY s následnou sekvenací. Pro sledování efektu fludarabinu (25; 6,3; 1,6 a 0,4 µg/ml) jsme použili test buněčné viability (WST-1 assay). Stabilizaci proteinu p53 jsme detekovali pomocí western blotu a expresi cílových genů aktivovaných proteinem p53 pomocí Q-RT-PCR.

Výsledky: Kultivace CLL buněk s fludarabinem (48 hod) poskytla zřetelnou křivku přežití v závislosti na jeho koncentraci u většiny z 59 testovaných vzorků. Citlivost na fludarabin jsme stanovili při koncentraci 1,6 µg/ml, která poskytla nejzřetelnější rozdíly mezi jednotlivými vzorky. Skupina vzorků s abnormalitami TP53 (n = 20) byla na fludarabin výrazně rezistentnější než zbývající CLL (p = 0,012; Mannův-Whitneyův U-test). Při srovnání skupin s delecí ATM (n = 21) a wt (n = 18) jsme nepozorovali žádné významné rozdíly (p = 0,71). U všech testovaných vzorků s delecí ATM (n = 6) a wt (n = 4) jsme pomocí western blotu pozorovali jasnou stabilizaci proteinu p53 po aplikaci fludarabinu. Také Q-RT-PCR analýza cílových genů aktivovaných proteinem p53 (PUMA, BAX, p21) potvrdila jejich jasnou indukci u všech testovaných vzorků s delecí ATM (n = 7) i vzorků wt (n = 6). Buňky s abnormalitami TP53 byly naprosto refrakterní k jakékoli indukci, což potvrdilo jasnou dělicí linii mezi nimi a ostatní CLL.

Závěr: Naše výsledky ukazují, že přítomnost delece ATM u CLL buněk nemůže být považována za marker rezistence na fludarabin. Zdá se také, že kináza Atm není kritická pro aktivaci p53 dráhy po aplikaci tohoto chemoterapeutika. Podporováno grantem IGA MZ č. 8445-3/2005.

1186

Sledování klonálního vývoje u B-CLL metodou I-FISH

A. Berková, L. Pavlišťová, J. Březinová, L. Babická,
E. Malinová, L. Grosová, J. Tajtlová, E. Cmunt,
J. Schwarz, I. Marinov, J. Karban, M. Trněný,
Z. Zemanová, K. Michalová

Centrum nádorové cytogenetiky Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. lékařské fakulty UK a VFN Praha;
I. interní klinika 1. lékařské fakulty UK a VFN Praha;
Ústav hematologie a krevní transfuze Praha

Cílem studie bylo určit frekvenci nově získaných cytogenetických změn v rámci klonální evoluce u opakovaně vy-

šetřených pacientů s B-CLL, porovnat molekulárně cytogenetické nálezy s výsledky mutační a expresní analýzy a následně vyhodnotit vliv evoluce klonu na klinický průběh onemocnění.

Metoda: V letech 1982–2006 jsme vyšetřili 1161 pacientů s B-CLL. 102 pacientů, diagnostikovaných podle standardních kritérií, bylo zahrnuto do prezentované studie. Genomické aberace byly detekovány metodou I-FISH se sadou DNA sond (Abbott Vysis) detekující trizomii chromozomu 12, del(13)(q14.3), delecí genu ATM (11q22.3) a delecí genu p53 (17p13.1). Znaky ZAP-70 a CD38 byly analyzovány na průtokovém cytometru a IgVH mutační stav byl určen sekvenováním.

Výsledky: Při úvodní analýze byly cytogenetické abnormality nalezeny u 69 ze 102 pacientů. Při následném vyšetření byly u 25 pacientů zjištěny nově získané aberace: monoalelická del(13)(q14.3) v 10 případech, bialelická del(13)(q14.3) ve 3, vývoj z monoalelické k bialelické del(13)(q14.3) ve 3, del(11)(q22.3) ve 4, del(17)(p13.1) ve 3, trizomie chromozomu 12 v 1 a del(13)(q14.3) společně s del(17)(p13.1) v 1 případě. 14 z těchto pacientů mělo nemutovaný a 7 mutovaný IgVH gen. Ze 7 pacientů s mutovaným IgVH stavem, 6 nově získalo některou z variant del(13)(q14.3) a u 1 byla nově nalezena del(11)(q22.3). Charakterizace pacientů s klonálním vývojem a statistické zhodnocení výsledků bude prezentováno.

Závěr: Neprokázali jsme statisticky významnou souvislost s nemutovaným IgVH stavem, se ZAP-70 nebo CD38 pozitivitou ani s dobou celkového přežití. Potvrdili jsme, že „high-risk“ delece, nalezené v jakékoli fázi onemocnění, znamenají pro pacienta špatnou prognózu a zejména delece genu p53 předurčuje rezistenci k chemoterapii. I-FISH analýzy představují pouze jeden z možných pohledů na nestabilitu genomu u B-CLL. V dalších studiích bude pro hodnocení klonálního vývoje nutná jejich kombinace s konvenční cytogenetickou analýzou stimulovaných CLL buněk.

Práce byla podpořena granty IGA MZCR 9244-3, MSM 0021620808, MZO 00064165 a LC535.

TRANSFUZNÍ LÉKAŘSTVÍ

1316

Nová legislativa v transfuzní službě

D. Stárková

Ministerstvo zdravotnictví ČR Praha

Koncem roku 2007 nabyl účinnosti nový zákon č. 378/2007 Sb., o léčivech, který významně změnil stávající právní úpravu regulace léčivých přípravků s ohledem na dosažení plné kompatibility zákona s požadavky předpisů Evropského společenství. Z oblasti problematiky týkající

se krve byly do něj a nové vyhlášky zpracovány směrnice 2002/98/ES, 2004/33/ES, 2005/61/ES a 2005/692/ES, v nichž jsou stanoveny standardy na jakost a bezpečnost krve. Vyhláška o lidské krvi a jejích složkách, která nabyla účinnosti v letošním roce, je prováděcím předpisem k zákonu č. 378/2007 Sb. a stanoví bližší požadavky na odběr, vyšetření a posouzení způsobilosti dárce krve k odběru, zpracování, skladování, distribuci lidské krve a jejích složek, jakost a bezpečnost transfuzních přípravků a surovin z lidské krve a jejích složek pro další výrobu, výdej transfuzních přípravků, dovoz nebo vývoz transfuzních přípravků a suroviny pro další výrobu mimo země Evropských společenství, včetně pravidel zabezpečující systém jakosti a správnou výrobní praxi při těchto činnostech. Dále tento návrh stanoví bližší podmínky povolování výroby, distribuce a výdeje transfuzních přípravků, včetně změn vydaných povolení. Pravidla správné praxe rozvádí pro každou z uvedených oblastí požadavky na systém zabezpečování jakosti, zaměstnance, provozní prostory a zařízení, dokumentaci, zásady a postupy výroby a kontroly jakosti, podmínky smluvních činností, postupy v případě reklamace, hemovigilanci, sledovatelnost, stažení transfuzních přípravků a systémů vnitřní kontroly. Je samostatným příspěvkem k zabezpečení stabilního a funkčního systému jakosti i předpokladem pro fungování tohoto systému vcelku, a to s cílem využít všechny dostupné prostředky k trvalému zabezpečení jakosti a bezpečnosti transfuzních přípravků a surovin z lidské krve a jejích složek pro další výrobu.

1275

Moderní markery jakosti transfuzních přípravků

R. Procházková

Transfuzní oddělení Krajské nemocnice a.s., Liberec

Při standardní kontrole jakosti transfuzních přípravků (TP) jsou hodnoceny základní parametry: obsah účinné látky (u erytrocytů obsah hemoglobinu, hematokrit; u trombocytů jejich počet) a buněčná kontaminace, zejména příměs leukocytů. Struktura a funkce krevních buněk (KB) jsou během odběru, zpracování a skladování ovlivněny řadou faktorů. KB podléhají morfologickým a biochemickým změnám, které limitují jejich skladovatelnost a viabilitu. V praxi je hodnocen volný hemoglobin jako marker stupně hemolýzy u erytrocytů (RBC) a pH u trombocytů (PLT). Pro účely validací nových procesů je doporučováno hodnocení markerů metabolického stavu, apoptózy a aktivace KB. Metabolické alterace KB se odrážejí ve změnách pH, zvýšení LDH, konzumpci glukózy a produkci laktátu. Změny specifické pro RBC jsou pokles intracelulárního K^+ , ATP a 2,3-DPG, jejich obsah v erytrocytu se

po transfuzi obnovuje. Globálním markerem apoptózy je annexin V. Zvýšení jeho hladiny je v přímé relaci se stupněm buněčného poškození RBC i PLT. Změnou specifickou pro PLT je aktivace. Jejím významným markerem je povrchová detekce nebo vzestup hladiny P-selektinu (průkaz degradace α -granulí). Byla prokázána souvislost mezi hladinou cytokinů (IL-1 β , IL-6, IL-8, RANTES) v TP a následnými nehemolytickými febrilními potransfuzními reakcemi (hladina cytokinů v TP souvisí zejména s obsahem zbytkových leukocytů v TP). Odrazem obsahu leukocytů v TP je i vzestup hladiny sFAS-L v TP během skladování.

Vlastní zkušenosti: V prospektivní studii byly hodnoceny markery buněčného poškození u TP získaných aferézou a z plné krve (u RBC: K^+ , laktát, LDH, pH a annexin V; u PLT: pH, LDH, laktát, annexin V, sP-selektin).

Výsledky: U všech typů TP došlo během skladování ke zvýšení hladin uvedených markerů ($p < 0,05$). U RBC byl nejvýznamnější vzestup u TP bez leukodeplece ($p < 0,001$). Krevní buňky nebyly aferézami poškozeny ani zvýšeně aktivovány. V jakosti přípravků ze 2 separátorů nebyly zjištěny významné rozdíly. Použité technologie neovlivnily stav apoptózy a aktivace buněk v přípravcích na konci skladování. Klíčový význam pro vývoj změn v krevních buňkách měly podmínky skladování produktů a příměs leukocytů.

1160

Erythrocytaferéze v léčbě rodinného výskytu hereditární hemochromatózy

J. Pták, J. Vaculová

Hematologicko-transfuzní oddělení nemocnice Frýdek-Místek

Je popisováno využití cyto redukční erythrocytaferézy při léčbě 3 členů rodiny s výskytem hereditární hemochromatózy. Otec (70 let) je nositelem mutace HFE genu C282Y/C282Y, 1. syn (40 let) mutace v HFE genu C282Y/C282Y a 2. syn (43 let) složené mutace HFE genu C282Y/H63D. Sestra obou pacientů je nositelkou složené mutace HFE genu C282Y/H63D a matka všech dětí je nositelkou stejné mutace jako její dcera. Obě ženy léčbu nevyžadují a jsou bez laboratorních a klinických projevů onemocnění. Otec je léčen pro diabetes mellitus, oba synové jsou bez klinických potíží. Diagnóza byla stanovena primárně u otce při náhodném vyšetření. Hladiny feritinu v okamžiku zahájení léčby byly u jednotlivých pacientů 1 616, 2 400 a 647 $\mu\text{g/l}$. U otce bylo provedeno 10 léčebných erythrocytaferéz v období 8 měsíců, s průměrně odebraným objemem erytrocytů 910 ml, při dosažení hladiny feritinu 76 $\mu\text{g/l}$ byla léčba prozatím ukončena. Prvnímu synovi bylo doposud provedeno 11 aferéz v období 10 měsíců s průměrně odebraným objemem erytrocytů 1 050 ml, současná hladina feritinu je 385 $\mu\text{g/l}$, léčba ještě není ukončena. Druhému

synovi byly doposud provedeny 3 erytrocytaferézy v období 4 měsíců s průměrně odebraným objemem erytrocytů 1 095 ml a doposud dosaženou hladinou feritinu 115 µg/l s předpokladem brzkého ukončení léčby. Cílová hodnota hematokritu byla u všech výkonů nastavena na 0,32. Interval mezi jednotlivými výkony byly 3–5 týdnů. Aferézy byly prováděny na kontinuálním separátoru COBE-Spectra. Pro substituci byl použit fyziologický roztok, při odebraném objemu erytrocytů větším než 800 ml byl použit 5% albumin. V průběhu aferetické léčby nebyly pozorovány žádné vedlejší reakce s výjimkou intermitentního vzniku 2–3denního pocitu zvýšené únavnosti po aferéze. Erytrocytaferéza se jeví jako sofistikovaná a bezpečná léčebná metoda pro pacienty s hereditární hemochromatózou.

1155

Individuální rozdíly v efektivitě léčby intrakoronární transplantací vyšší dávkou buněk kostní dřeně zjištěné pomocí sestamibi SPECT/FDG PET myokardu

M. Kamínek, J. Meluzín, L. Groch, R. Panovský, S. Janoušek, J. Mayer, M. Klabusay, J. Lukl, J. Ostřanský, M. Richter

Klinika nukleární medicíny Lékařské fakulty UP a FN Olomouc; I. interní kardiologická klinika Lékařské fakulty MU a FN u sv. Anny Brno; Interní kardiologická klinika Lékařské fakulty MU a FN Brno, pracoviště Bohunice; I. interní klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc

Cíl: V předchozí práci jsme prokázali závislost úpravy funkce v infarktovém ložisku pomocí autologní intrakoronární transplantace mononukleárních buněk kostní dřeně (BMC) na množství podaných buněk [Am Heart J 2006; 152: 975]. Cílem této práce byla analýza vlivu rozdílné úrovně vychytávání perfuzního radiofarmaka ^{99m}Tc-sestamibi (MIBI) v infarktovém ložisku na následnou úpravu funkce levé komory.

Metodika: Do studie byli zahrnuti pacienti s průkazem ireverzibilního poškození po akutním infarktu myokardu dle dobutaminové echokardiografie, SPECT a PET. BMC transplantace vyšší dávkou (100 000 000 buněk) bylo léčeno 37 pacientů, zatímco 36 pacientů bylo náhodně zařazeno do kontrolní skupiny. Programem 4D-MSPECT bylo kvantifikováno vychytávání MIBI/FDG, ejekční frakce levé komory (EF) a end-diastolický/end-systolický volum (EDV/ESV) před léčbou a 3 měsíce poté.

Výsledky: U responderů léčby (vzestup EF ≥ 5 % bez nárůstu EDV/ESV, zlepšení regionální funkce) bylo vychytávání MIBI v infarktovém ložisku vyšší než u nonresponderů (minimální uptake 24 % ± 12 % vs 15 % ± 11 % maxima, P < 0,05). Úprava funkce byla dále kalkulována v podskupinách pacientů s různou úrovní vychytávání MIBI

(0–10 %, 11–20 %, 21–30 %, 31–40 % a 41–50 %). Signifikantní rozdíl byl zjištěn u 2 podskupin BMC léčených pacientů: u 16 pacientů s velmi nízkou kumulací MIBI < 30 % maxima se EF významněji neupravila (z 35 % na 38 %) a došlo k nárůstu EDV/ESV ze 178 ml/118 ml na 198 ml/125 ml, zatímco u 21 pacientů s reziduálním vychytáváním MIBI v rozmezí 31–50 % maxima se funkce významně zlepšila (průměrná EF ze 41 na 49 % a EDV/ESV ze 155 ml/94 ml na 151 ml/81 ml, P < 0,05). Podobné třídění nebylo patrné v kontrolní skupině: u pacientů s vychytáváním MIBI v rozmezí 31–50 %, resp. < 30 % maxima se EF zvyšovala pouze o 2, resp. 3 %, EDV/ESV narůstaly shodně u obou podskupin ze 146 ml/82 ml na 158 ml/86 ml, resp. ze 171 ml/111 ml na 191 ml/120 ml (P = NS).

Závěr: Naše výsledky svědčí pro rozdílnou efektivitu intrakoronární BMC transplantaci u individuálních pacientů a pro možnost použít SPECT/PET zobrazení pro výběr pacientů, kteří budou mít maximální prospěch z této léčby. Práce byla podpořena výzkumnými záměry MŠMT (MSM 0021622401 a 6198959205).

1339

Praktické aspekty diagnostiky syfilidy

H. Zákoucká

Syfilis patří mezi celosvětově rozšířená závažná onemocnění. Podle odhadů WHO jsou ročně nově diagnostikovány miliony onemocnění (1 999–12 mil, s maximem v rozvojovém světě), což má za následek 2 000 000 ohrožených těhotenství ročně (25 % končí potratem a 25 % porodem nemocného novorozence).

Rovněž ve vyspělých zemích (západní Evropa) dochází k nárůstu incidence zhruba od konce 90. let minulého století. V České republice se tento trend projevil výrazně ihned po roce 1989. Zásadní roli v šíření hraje zejména rizikové sexuální chování a rovněž příliv migrantů z oblastí s nesrovnatelně vyšší incidencí (např. země bývalého SSSR). Stejný trend – vzestup počtu zejména akutních, infekčních případů můžeme pozorovat v poslední době (tj. zhruba od roku 2006). Situace se projevila i ve výskytu čerstvé syfilisy u opakovaných dárců krve. 90 % případů je přeneseno pohlavním stykem (koitálním, orálním nebo análním), 10 % infekcí nepohlavně (transplacentárně – vrozená onemocnění; náhodný kontakt s lézí – líbání; profesionální expozice; teoreticky je možný i přenos krevní transfúzí – v posledních 30 letech byly v odborné literatuře popsány pouze 3 případy; nebo kontaminovaným předmětem – nasliněná tetovací jehla). Infekce postihuje nejčastěji ženy a muže mezi 15–30 lety věku.

Zákonné normy týkající se screeningu syfilisy – zvláště zákon 258/00 Sb., vyhláška 195/05 Sb., vyhláška 411/04 Sb. ve znění pozdějších předpisů atd.

Etologické agens – *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* (TPP)

Jejím přirozeným hostitelem je pouze člověk, experimentálně některé druhy vnímavých savců (subhumánní primáti, králík, morče, vepř domácí). Příbuzná agens – *Treponema pallidum* subsp. *endemicum*, *Treponema pallidum* subsp. *pertenue*, *Treponema carateum* – způsobují nevenerecké treponematózy, onemocnění nejčastěji dětské populace endemických oblastí (tropy a subtropy). Značná genetická příbuznost (> 95 %) mezi těmito bakteriemi se projevuje ve shodné morfologii a protilátkové odpovědi makroorganismu na probíhající onemocnění. Dosud proto není možné odlišit bakterie mikroskopii nativního preparátu, přímou imunofluorescenční mikroskopii, průkazem vytvořených protilátek ani běžně používanými molekulárně-genetickými metodami.

Diagnostika

Vzhledem k závažnosti a povaze onemocnění není indikována pouze klinickým podezřením, ale je rovněž součástí obligátních vyšetřovacích schémat:

- u dárců krve, tkání a orgánů
- v rámci prenatální péče
- základní screening novorozenců
- předoperační příprava
- za hospitalizace

Přímá diagnostika

Detekce bakterie TPP v biologickém materiálu je vhodná pro stadia, kdy je biologický materiál s treponematy přístupný odběru a kdy lze očekávat jejich přítomnost v dostatečném množství (zejména časná manifestní syfilis). Využití a standardizace přímých testů je však ovlivněno celou řadou podmínek, které mohou výrazně snížit citlivost vyšetření (lidský faktor, časová prodleva, náklady na provedení testu a jeho skutečný význam pro konkrétní stanovení diagnózy).

Používané metodiky – zástinová mikroskopie, přímá imunofluorescence (DFA-TP), impregnace kovy (stříbření), molekulární diagnostika – PCR (polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce).

Nepřímá diagnostika

Průkaz protilátek v séru, plazmě nebo CSF, u imunokompetentního pacienta je možné nalézt protilátkovou odpověď na přítomnost treponemat serologickými testy zhruba od 4.–5. týdne po infekci a dále většinou během celého života (a to i po úspěšné léčbě, tř. IgG). Spolehlivost a reprodukovatelnost vyšetření protilátek v krvi a liquoru je důvodem jeho nezastupitelnosti při rutinní diagnostice.

Netreponemové testy, prokazující nespecifické antikardiolipinové protilátky (mikro- a makroflokulační metodiky – RPR, VDRL aj.), jsou využívány (v kombinaci s treponemo-

vými testy) ke screeningu a k posouzení aktivity choroby a úspěšnosti léčby (vzestup, resp. pokles titru protilátek). Protilátky jsou detekovatelné již asi 4 týdny po infekci.

Jsou však zatíženy poměrně vysokým procentem (2–10 %) falešně pozitivních výsledků a také výskytem falešně negativních reakcí (v počátku onemocnění před sérokonverzí; u pozdní latentní syfilis představuje až 30 % případů; zonální fenomén u akutní syfilis). Zonální fenomén se může projevit u sér s vysokým titrem specifických a nespecifických protilátek v době akutní syfilis (1–2 %) a znamená únik aktivních, infekčních případů onemocnění. Vzhledem k uvedeným skutečnostem není vhodné používat netreponemové testy jako jediný screeningový test. Treponemové testy jsou založeny na principu detekce specifických protilátek proti antigenům TPP (lipoproteinům). Sérokonverzi jsou schopny zachytit okolo 5.–6. týdne po infekci. Patří k nim testy screeningového panelu (TPHA, TP-PA, EIA, ELISA, chemiluminiscence) i konfirmační testy k ověření diagnózy (FTA-ABS, western blot). Je možno jimi odděleně vyšetřovat IgM třídu protilátek (posouzení aktivity syfilis a úspěšnosti léčby, intrauterinní infekce). Samozřejmě i zde je nutné počítat s možným výskytem falešně negativních reakcí, zejména v inkubační době a na počátku 1. stadia (asi 2 % u testů pro třídu IgG a až 30 % u testů pro třídu IgM), a falešně pozitivních (asi 1–2 %) reakcí.

Závěr

Syfilis zůstává, vzhledem ke způsobu šíření, stále významným epidemiologickým problémem. Je i jednou z priorit ECDC a EU. Využití obligátních vyšetřovacích postupů (u těhotných, novorozenců, dárců krve, tkání, orgánů a při diff. dg. aj.) a dodržování zákonných norem je jedním z nejuspěšnějších nástrojů v boji s jejím výskytem v populaci. S rozvojem molekulární biologie a diagnostiky se nabízí nové možnosti. Standardní test odpovídající správné laboratorní praxi (včetně kontroly falešně negativních výsledků) vhodně doplní sérologické testy, které v diagnostice syfilis mají a budou mít klíčovou a nezastupitelnou roli.

KONFERENCE ZDRAVOTNÍCH LABORANTŮ 2

1183

Schistocyty – malé, ale významné elementy

B. Škůrková, A. Lapčíková, J. Juráňová, J. Indráková

Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc

Nález schistocytů v nátěru periferní krve může být diagnosticky významným ukazatelem závažného až život ohrožujícího stavu nemocného. Je proto velmi důležité na jejich přítomnost co nejdříve upozornit. Schistocyty (schizocyty) jsou buněčné fragmenty červených krvinek,

kteří mají tvar trojúhelníku či helmy. Vyskytují se často u intravaskulární hemolýzy nejrůznějšího původu. Mikroangiopatická hemolytická anémie (MAHA) může mít celou řadu příčin. Setkáváme se s ní např. u hemolyticko-uremického syndromu (HUS), trombotické-trombocytopenické purpury (TTP), při komplikacích v těhotenství (HELLP syndrom). Charakteristický je nálezní schistocytů u diseminované intravaskulární koagulace (DIC). V našem sdělení bychom vás rády seznámily s postupem hodnocení schistocytů v periferní krvi a uvedly identifikaci těchto fragmentů na hematologickém analyzátoru, zvláště pak jejich hodnocení v nátěru. Přednáška je doplněna zajímavými kazuistikami.

1203

Základní laboratorní metody v onkocytogenetice

M. Mešková, A. Příkrylová, I. Syslová

Oddělení lékařské genetiky FN Brno, pracoviště FDN JGM

V onkocytogenetické laboratoři zpracováváme a kultivujeme biologický materiál hematologických pacientů. V našem sdělení chceme představit práci v laboratoři od přijetí materiálu až po jeho kultivaci a hodnocení pomocí počítačového analyzátoru obrazu. Závěrem vás chceme seznámit s problémy, které provází kultivace kostních dřeních onkologických pacientů a s benefitem, který toto vyšetření pacientům přináší.

1205

Pohled cytogenetika na různé typy leukemií

V. Linková, A. Oltová, G. Vaňková

Oddělení lékařské genetiky FN Brno, pracoviště FDN JGM; Katedra genetiky a molekulární biologie Přírodovědecké fakulty MU Brno

Akutní a chronické leukemie tvoří velmi heterogenní skupinu maligních hematologických onemocnění a představují celosvětový problém. V našem příspěvku představíme toto onemocnění, jeho dělení a charakteristické cytogenetické rysy, které slouží ke stanovení prognózy.

1194

Význam klasické cytogenetiky ze stimulovaných lymfocytů periferní krve

J. Kropáčková, I. Prekopová, J. Hanzlíková, M. Holzerová, H. Urbánková, J. Balcárková, J. Pavlíček, J. Indráková, T. Papajik, M. Jarošová

Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc

Chronická lymfatická leukemie (CLL) je nejčastější leukemie dospělého věku. Jedná se o heterogenní nádorové

onemocnění vycházející z geneticky změněného B-lymfocyty. Přestože nejsou příčiny vzniku onemocnění známy, byly určeny časté chromozomové změny, které mají prognostický význam. Delece chromozomu 17p a 11q jsou spojeny s nepříznivým klinickým průběhem onemocnění, naopak nemocní s delecí na chromozomu 13q mají dobrou prognózu a jejich celkové přežití dosahuje až 11 let. Tyto změny jsou určovány metodou fluorescenční in situ hybridizace (FISH) s rutinním panelem sond a jsou detekovány až u 80 % nemocných. Cytogenetické studie založené na klasickém cytogenetickém vyšetření dovoluje určit chromozomové změny asi u 30–50 % nemocných. Většina cytogenetických vyšetření bez stimulace B-lymfocytů je neúspěšná, pro nízkou proliferativní aktivitu CLL buněk in vitro. Pro stimulaci buněk in vitro proto byly vyvinuty nové metody, jejich výsledky potvrzují, že použití pouze metody FISH k určení chromozomových změn není dostatečné a že metodou klasické cytogenetiky je možné odhalit především translokace, které se u CLL mohou vyskytovat až v 60 %. Pro úspěšné cytogenetické vyšetření se nejčastěji používají stimulační látky jako např. TPA (Phorbol-12-myristate-13-acetát). Na základě publikovaných výsledků jsme na našem pracovišti zavedli kultivační techniku s použitím imunostimulátorů, kterými jsou CpG-oligonukleotidy DSP30 a interleukin 2 (IL2). Pro rutinní vyšetření používáme periferní krev a buňky jsou kultivovány jak s TPA, tak s DSP30 a IL2. Ve svém sdělení seznámíme s metodikou kultivace buněk periferní krve s použitím DSP30 a na příkladech nemocných s CLL ukážeme výsledky, které potvrzují význam použití klasické cytogenetiky pro určování chromozomových změn u nemocných s CLL.

Podporováno grantem IGA NR 9484-3, MSM 6198959205.

1200

Cytogenetika a molekulární cytogenetika myelodysplastického syndromu (MDS)

I. Prekopová, J. Indráková, H. Urbánková, J. Balcárková, M. Holzerová, J. Kropáčková, J. Hanzlíková, J. Vondráková, M. Jarošová

Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc

Myelodysplastický syndrom je klonální hematopoetické onemocnění charakterizované cytopenií a dysplazií kostní dřeně. Je to onemocnění vyššího věku s mediánem 60 let. Pro MDS je charakteristická špatná odpověď na chemoterapii s dlouhodobými cytopeniemi a nízkým počtem remisí. U 25–30 % nemocných dochází po určité době k postupnému vývoji MDS do akutní leukemie, nejčastěji do akutní myeloidní leukemie. U dětí se MDS vyskytuje jen zřídka, a pokud se vyskytne, je charakterizováno rychlejším průběhem a zvratem do akutní leukemie. Cytoge-

netické změny hrají důležitou roli v patogenezi, diagnóze a prognóze a v poslední době se zvyšuje i jejich význam při výběru cílené léčby nemocných s MDS. Změny chromozomů se objevují v erytroidních, myeloidních a megakaryocytárních prekurzorových buňkách, což svědčí o vzniku neoplazie v pluripotentní kmenové buňce. Chromozomové změny jsou přítomné asi u 50 % nemocných s de novo MDS a až v 80 % nemocných se sekundární MDS. Balancované chromozomové změny, které zahrnují také translokace, jsou u nemocných s MDS méně časté, zatímco nebalancované změny jako delecce a amplifikace jsou častější. Intersticiální delecce dlouhých ramen chromozomu 5 (5q-), která se může vyskytovat samostatně nebo s dalšími změnami, je nejčastější změnou u de novo MDS. Podle WHO klasifikace je 5q- syndrom považován za samostatnou podjednotku MDS s příznivou prognózou. Naopak nemocní s delecí nebo monozomií chromozomu 7 a nemocní s komplexním karyotypem mají prognózu nepříznivou. Pro přesné určení chromozomových změn používáme klasickou cytogenetiku, metody FISH a u nemocných s komplexním karyotypem metodu mnohobarevné fluorescenční in situ hybridizace (M-FISH). V našem sdělení ukážeme na příkladech nemocných s MDS, kteří byli diagnostikováni a léčeni na Hematoonkologické klinice Lékařské fakulty UP a FN v Olomouci, metodiku cytogenetického vyšetřování nemocných, nejčastější nálezy chromozomových změn a jejich přesné určení klasickou cytogenetikou a metodami molekulární cytogenetiky.

Práce je podporována grantem MSM 6198959205.

1176

Solidní tumory dětského věku metastazující do kostní dřeně – soubor cytologických nálezů

M. Kokeszová, P. Blažková, B. Jordanová, P. Kučerová, S. Valníček, S. Köhlerová, O. Zapletal, M. Penka, B. Habanec, A. Oltová, J. Štěrbá

Oddělení klinické hematologie FN Brno, pracoviště FDN JGM; Bioptická stanice FN Brno; Oddělení lékařské genetiky FN Brno, pracoviště FDN JGM; Klinika dětské onkologie Lékařské fakulty MU a FN Brno, pracoviště FDN JGM

Nádory dětského věku se odlišují od nádorů v dospělosti především histogenetickým původem. U dospělých převažují epiteliální novotvary, u dětí jsou nejčastější zhoubné nádory krvetvorných orgánů a solidní tumory z mezodermy a neuroektodermy. U dětí dochází často k rychlému růstu nádoru a časnému metastazování. Přesto infiltrace kostní dřeně (KD) solidním tumorem patří mezi ojedinělé nálezy. Morfologická klasifikace patologických buněk v KD je nezbytnou součástí určení typu a vstupního rozsahu nádorového onemocnění spolu s vyšetřeními zobra-

zovacími, endoskopickými, koagulačními, biochemickými, histopatologickými, imunologickými a molekulárně genetickými. Mezi solidní nádory metastazující do KD u dětí patří zejména neuroblastom, sarkomy měkkých tkání, Ewingův sarkom/PNET, dále osteosarkom a retinoblastom. Na našem pracovišti byla v posledních 5 letech diagnostikována infiltrace KD u dvou dětí s Ewingovým sarkomem (ES), u 3 dětí s rhabdomyosarkomem a u 8 pacientů s neuroblastomem. Za tuto dobu bylo na Klinice dětské onkologie léčeno 27 dětí s ES, 19 s rhabdomyosarkomem a 60 s neuroblastomem. V našem sdělení prezentujeme vybrané morfologické nálezy v nátěrech KD, otiscích trepanobiopsií a otiscích tumorů (barvení MGG a vybraná cytochemická barvení) s konkrétním popisem patologických buněk. Rovněž zmiňujeme histologické a molekulárněgenetické nálezy. Chceme ukázat, že hematologické pracoviště může svými časově i finančně dostupnými metodami hodnocení nátěru kostní dřeně významně přispět i k diagnóze nehematologické malignity.

CLL 2

1308

Richterův syndrom: současný pohled na diagnostiku a léčbu

D. Belada, L. Smolej, M. Hrudková, P. Štěpánková, J. Malý
Oddělení klinické hematologie II. interní kliniky Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové

Richterův syndrom (RS) byl poprvé popsán v roce 1928 a představuje transformaci chronické lymfocytární leukemie do agresivního lymfomu s incidencí mezi 2–8 %. Nejčastěji se jedná o difuzní B-velkobuněčný lymfom, ale vzácněji může dojít k transformaci do Hodgkinova lymfomu, prolymfocytární leukemie či akutní lymfoblastové leukemie. Maligní elementy agresivního lymfomu mohou vzniknout buď transformací původního CLL klonu, nebo představují samostatný nový klon. V etiopatogenezi je diskutována role viru Epstein-Barrové a následné genetické abnormality, které zahrnují mutace genu p53, c-myc onkogenu, delecí 11q23 a další. Rizikovými faktory pro vznik RS jsou: pokročilé stadium CLL, nemutovaný IGVH status, zvýšená exprese ZAP-70, CD 38 pozitivita, genetická nestabilita a intenzivní imunosuprese. Klinicky se RS prezentuje typicky B-symptomy, rychle rostoucí lymfomovou masou, splenomegalií, zvýšenou hodnotou LDH, hyperkalcemií, trombocytopenií. Časté je extranodální postižení (plíce, GIT, CNS). Při podezření na vznik RS je naprostou nezbytností histologická verifikace. Nově je pro diagnostiku RS s výhodou užívána pozitronová emisní tomografie, která dokáže zobrazit místa transformace CLL (většinou PET negativní) do agresivního lymfomu

(většinou PET pozitivní). Léčebné možnosti v případě agresivních nonhodgkinských lymfomů (DLBCL) zahrnují chemoterapii s antracykliny v kombinaci s rituximabem (R-CHOP, R-hyperCVAD) nebo salvage režimy (R-ICE, R-DHAP), ev. v kombinaci s následnou vysokodávkovanou léčbou. Prognóza nemocných s RS je špatná. Léčebná odpověď se u konvenční léčby pohybuje mezi 15 a 40 %, z toho jen výjimečně je dosaženo kompletní remise. Medián přežití je 5–8 měsíců při použití konvenční chemoterapie. Nadějněji vypadají výsledky alogenních transplantací, soubory nemocných jsou však bohužel malé a selektované. Pokud se jedná o transformaci CLL do Hodgkinova lymfomu, je doporučováno podání konvenční chemoterapie (ABVD) s dobrými výsledky.

Podpořeno výzkumným záměrem MZO 00179906 a grantem IGA MZ ČR NR/9453

1313

Morfologie CLL ve vztahu k expresii ZAP-70 a chromozomovým abnormalitám

T. Balhárek, L. Plank, P. Szépe, J. Marcinek,
Z. Kviatkovská, M. Barthová, A. Žákovičová,
D. Ilenčíková

Ústav patologické anatomie a Konzultačné centrum bioptické diagnostiky ochorení krvotvorby Jesseniovej lekárskej fakulty UK a MFN Martin, Slovenská republika; Oddelenie onkologickej genetiky Národného onkologického ústavu Bratislava, Slovenská republika

Úvod: Morfologie CLL je klasickým, ale dnes málo zohľadňovaným prognostickým faktorom. Väčšina morfologických ukazovateľov si totiž v multivariantných analýzach nezachováva nezávislosť. Viaceré bioptické parametre sú však dobrými deskriptormi aktuálneho stavu ochorenia, vrátane jeho odpovede na terapiu. Okrem toho aj v bioptickom materiálu možno identifikovať zvýšený podiel prolymfocytov (Ply) a paraimunoblastov (Pib) súvisiaci so zvýšenou aktivitou alebo atypickou morfológiou.

Metodika: V štúdiu sme analyzovali vzťah morfológie CLL k expresii ZAP-70 a prítomnosti chromozómových aberácií (CHA): del11q, del13q, del17p a trizómia 12. V prípade korelácie s expresiou ZAP-70 bola morfológia CLL hodnotená v biopsiách KD (n = 32) alebo lymfatických uzlín – LU (n = 37), vo vztahu k CHA bola morfológia hodnotená len v biopsiách KD (n = 62). Expresia ZAP-70 bola vyšetřovaná imunohistochemicky v tkanivových rezoch KD alebo LU, pričom bola hodnotená ako silno pozitívna (2+), slabo pozitívna (1+) alebo negatívna. Chromozómové aberácie boli vyšetřované metódou FISH v lymfocytoch periférnej krvi po 72 hod kultivácii.

Výsledky: V ZAP-70 2+ prípadoch sme zaznamenali častejší výskyt difúznej infiltrácie KD než v ZAP-70 prípadoch

(71 % vs 56 %). V biopsiách KD u ZAP-70 2+ pacientov bol v porovnaní so ZAP-70 dokázaný signifikantne častejší výskyt infiltrátov so zvýšeným podielom Ply a Pib (57 % vs 22 %). Podobne zvýšený podiel menej zrelých elementov sme potvrdili aj v prípadoch s del17p, trizómiou 12 a del11q. Najvýznamnejší bol nález v prípadoch s del17p (n = 7), pretože väčšinu predterapeutických vzoriek KD tu charakterizovala difúzna infiltrácia KD so známami zvýšenej rastovej aktivity a konštantne zvýšeným podielom Ply a Pib. Paradoxne v biopsiách LU nebola dokázaná asociácia medzi silnou expresiou ZAP-70 a zvýšenou rastovou aktivitou. Korelácia nebola potvrdená ani medzi expresiou ZAP-70 a plazmocytoídnou diferenciáciou CLL.

Záver: Z výsledkov vyplýva, že morfológia infiltrátov KD reflektuje prítomnosť prognosticky negatívnych faktorov, ako je expresia ZAP-70 a del17p, ako aj del11q a trizómia 12. Prognostický význam morfológie CLL v biopsii LU ostáva nejednoznačný.

Podporené Grantom MZ SR č. 2005/12-MFN-04 a Grantom VEGA 1/4285/07.

1248

Plazmocytoídná diferenciácia B-CLL sa vyskytuje u pacientov s normálnym karyotypom aj s prognosticky významnými chromozómovými abnormalitami

L. Plank, T. Balhárek, D. Ilenčíková, P. Szépe,
A. Žákovičová, M. Čermák, M. Barthová, J. Marcinek,
Z. Kviatkovská

Ústav patologické anatomie a Konzultačné centrum bioptické diagnostiky ochorení krvotvorby Jesseniovej lekárskej fakulty UK a MFN Martin, Slovenská republika; Oddelenie onkologickej genetiky Národného onkologického ústavu Bratislava, Slovenská republika

Úvod: Možnou súčasťou bioptickej analýzy infiltrátov B-CLL je rozdelenie prípadov na B-CLL s a bez plazmocytoídnaj diferenciácie (Pcoid+ a Pcoid–), hoci biologický význam identifikácie Pcoid zatiaľ nie je známy. V práci sme sa pokúsili korelovať Pcoid potvrdenú v biopsiách morfológicky a imunohistochemicky s nálezom chromozómových abnormalít (CHA) typu del11q22–23, del13q14, del17p13 a trizómie 12.

Materiál a metodika: Súbor tvorilo 98 pacientov s hematologicky a biopticky verifikovanou B-CLL s profilom CD20+, CD23+ a CD5+, u ktorých boli vyšetřené CHA, pričom prítomnosť Pcoid bola hodnotená reevalváciou dvomi pozorovateľmi (LP a TB). CHA boli analyzované v lymfocytoch periférnej krvi po 72hodinovej kultivácii metódou FISH s použitím DNA sond (Vysis).

Výsledky: Pcoid+ bola dokázaná u 39 pacientov (40 %), u 59 pacientov (60 %) chýbala. U 27 pacientov (27,6 %)

bol zistený normálny karyotyp, z toho 15 (55,6 %) bolo Pcoid+ a 12 (44,4 %) Pcoid-. CHA boli zistené u 71 pacientov (72,4 % všetkých), z toho 24 (33,8 %) bolo Pcoid+ a 47 (66,2 %) Pcoid-. CHA považované za prognosticky negatívne (del11q, del17p, 12+, vrátane del13q v kombinácii) boli zistené u 40 pacientov (40,8 % z celkového počtu), z toho 16 (40 %) bolo Pcoid+ a 24 (60 %) Pcoid-. Prognosticky všeobecne pozitívne hodnotená izolovaná del13q bola zistená u 31 pacientov (31,6 % všetkých), len 8 z nich (25,8 %) malo Pcoid+ a 23 (74,2 %) prípadov tejto skupiny bolo Pcoid-.

Záver: Aj keď interpretácia výsledkov je limitovaná veľkosťou súboru, tak je zrejmé, že pacienti s B-CLL s normálnym karyotypom vykazujú prítomnosť alebo neprítomnosť Pcoid v približne rovnakom pomere. Naproti tomu v prípade B-CLL s CHA všeobecne a v podskupine pacientov s prognosticky nepriaznivými CHA je Pcoid+ menej častá a vyskytuje sa približne v 33–40 % prípadov. V podskupine pacientov s izolovanou del13q je podiel prípadov s Pcoid+ najnižší a tvorí približne 1 % všetkých. Ak by bolo možné považovať prítomnosť Pcoid+ za známku vyzrievania bunkovej populácie B-CLL, tak tendencia k tejto diferenciácii sa zdá byť nižšia u pacientov s CHA, vrátane CHA, ktoré sú považované za prognosticky priaznivé.

Práca je súčasťou riešenia Grantu MZ SR č. 2005/12-MFN-04 a VEGA č. 1/4285/07.

1177

Chemoimmunotherapy with fludarabine, cyclophosphamide and rituximab (FCR) for chronic lymphocytic leukemia

D. Lysák, V. Vozobulová, A. Jungová, T. Svoboda, S. Vokurka, P. Jindra, K. Steinerová, M. Karas, V. Koza
Hemato-onkologické oddelení FN Plzeň

Introduction: The combination of chemo- and immunotherapy is associated with the high CR rate and increased quality of remission in chronic lymphocytic leukemia (CLL). This improved response may translate into a prolonged survival.

Methods: We conducted a retrospective analysis of 52 pts (35 untreated, 17 relapsed) with CLL after completing FCR treatment. The median age was 60 years. 19 % patients had advanced disease (Rai III/IV). 48% pts had unfavorable cytogenetics (11q, 17p). The median time from diagnosis to treatment was 14 (1–86) months in initial therapy and 62 (8–99) months in relapsed group. Most of relapsed pts were pretreated with fludarabine (82%). The treatment consisted of a single dose of rituximab 375 mg/m² and three doses of fludarabine 30 mg/m² and cyclophosphamide 300 mg/m², repeated every 4 weeks.

The median of 4 cycles of FCR was administered. Response was evaluated according to the NCIWG criteria. Minimal residual disease was detected with a sensitivity of 10³.

Results: Overall (OR) and complete (CR) response rates were observed in 92 % and 65 % of pts, respectively. Pts receiving FCR as initial treatment had higher OR and CR compared to those treated for relapse (OR 97 % vs 82%, ns, CR 76 % vs 41 %, p = 0.0276). The CR rate did not significantly differ according to the cytogenetics risk. 15 responders (32%) achieved flow cytometric remission in bone marrow. At a median follow-up of 13 (4–41) months the 2-year OS and PFS were 69% and 38%. Previously untreated pts were found to have a better 2-year OS (93% vs 40%, p = 0.0105) and PFS (53% vs 0%, p = 0.0029) than pretreated pts. Responders who had no detectable disease on flow cytometry experienced prolonged remission (2-year PFS 100%, p = 0.0289). Dose modification was infrequent (only 7% pts), 18% pts required G-CSF support. The most common adverse events grade III–IV were neutropenia (18% pts), thrombocytopenia (18% pts) and infections (11% pts).

Conclusion: FCR is highly active as initial or salvage therapy in patients with CLL. This regimen produces a high CR rate (over 90% during initial treatment), flow cytometric remissions were achieved in a third of pts. There is a correlation between the response to the treatment and the PFS rate.

1252

Fludarabín v liečbe chronickej lymfatickej leukémie

M. Hrubíško, Z. Štefániková

Klinika hematológie a transfuziológie Lekárskej fakulty UK a FNŠP sv. Cyrila a Metoda Bratislava, Slovenská republika

Úvod: B-chronická lymfatická leukémia (CLL) patrí medzi lymfómy s variabilným priebehom, kde sa dĺžka prežívania pohybuje od 2–3 rokov až po viac ako 10 rokov. V čase, keď neexistoval účinný liek, používala sa alkylačná látka chlorambucil. Vzhľadom k paliatívne efektu tohto lieku sa terapia začínala, až keď to bolo nevyhnutné pre progresívnu leukocytózu a/alebo generalizovanú lymfadenopatiu. Táto vyčkávací stratégia „watch and wait“ by sa však dnes už nemala používať paušálne, keďže sú k dispozícii moderné lieky, ktoré vedú navodiť u signifikantnej časti chorých dlhodobú liečebnú odpoveď.

Súbor chorých: Liečili sme 20 pacientov, 10 mužov a 10 žien, medián veku 54 rokov (rozsah 37–75). 12 chorých patrilo na základe cytogenetického vyšetrenia do skupiny so štandardným rizikom, 7 malo vysoké riziko (u 1 choreho cytogenetické vyšetrenie nebolo k dispozícii). 7 malo

štádium ochorenia A podľa Binetovej klasifikácie, 4 pacienti boli v štádiu B a 9 v štádiu C.

Metódy: Pacientov s CLL sme liečili celkovo 29 cyklami chemoterapie na báze Fludarabínu (FA), u 12 chorých v primoterapii, ostatné cykly boli podané po predchádzajúcej chemoterapii väčšinou na báze alkylačných látok. FA sme podali 16krát sólo, 8krát v kombinácii FC (s cyklofosfamidom) a 5krát spolu s monoklonálnou protilátkou anti-CD20 (Rituximab).

Výsledky: Liečebnú odpoveď sme dosiahli po podaní 20 cyklov chemoterapie (11 kompletných a 9 parciálnych remisí), 1krát sme dosiahli stabilizáciu ochorenia a zastavenie progresie, u 8 pacientov sme liečebnú odpoveď nezaznamenali. Okrem jedného pacienta v štádiu B boli všetci „non-responderi“ v štádiu C. Priemerná dĺžka liečebnej odpovede bola 16,7 mesiacov (medián 14 mesiacov) pri dĺžke sledovania od 3 do 36 mesiacov.

Záver: Fludarabín je účinný liek v liečbe B-CLL. Jeho účinnosť je vyššia v primoterapii ako u predliečených chorých a v nižšom štádiu ochorenia. V dobe, keď sú k dispozícii moderné lieky, by sa mala vyčkávací stratégia prehodnotiť a liečiť chorých skôr, kým ochorenie prejde do najvyššieho štádia.

CML/MPO

1279

Test senzitivity leukemických buněk na inhibitory kináz *in vitro* a jeho význam při rozhodování o léčbě imatinibem a dasatinibem u nemocných s CML

R. Solná, J. Veselovská, Š. Rožmanová, E. Faber, M. Jarošová, M. Holzerová, K. Indrák, V. Divoký

Ústav biologie Lékařské fakulty UP Olomouc;

Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc

Léčba chronické myeloidní leukemie (CML) rezistentní na imatinib (IM) je obohacena o druhou generaci tyrozinkinázových inhibitorů (TKI), o dasatinib (DAS) a nilotinib. Rozhodnutí o změně terapie lze podpořit testem citlivosti leukemických buněk na jednotlivé TKI *in vitro*. V naší laboratoři jsme vyvinuli metodiku, která nám umožňuje sledovat míru účinnosti TKI na základě detekce inhibice fosforylace molekuly Crkl, což je specifický substrát Bcr-Abl tyrozinkinázy (TK), a detekce inhibice fosforylace Src kináz (SFK). Zvýšená aktivace SFK je asociovaná s progresí onemocnění, blastickou krizí a rezistencí na léčbu. Tato metoda spočívá v inkubaci izolovaných leukocytů nemocného v médiu s nebo bez přidavku IM nebo DAS, přípravě proteinových lyzátů a western blottingu s imunodetekcí. Tento test jsme použili při vyšetření souboru 60 nemocných s CML. Výsledky testu ko-

relovaly s klinickým průběhem onemocnění a s počtem BCR-ABL pozitivních buněk (FISH, Q-RT-PCR). Na několika vybraných kazuistikách ukážeme možnosti této metodiky. U některých klinicky rezistentních pacientů, jejichž leukemické buňky v tomto testu vykazovaly citlivost na IM, bylo dosaženo léčebné odpovědi zvýšením dávek IM. V případě, že byly leukemické buňky v *in vitro* testu rezistentní na IM, byla i léčba IM neúčinná. Jedná se např. o nemocné s mutací Y253H, E255K a T315I v TK doméně Bcr-Abl. Leukocyty nemocného s mutací E255K byly na rozdíl od leukocytů nemocného s mutací T315I citlivé na DAS *in vitro*, nemocný rovněž klinicky odpověděl na tuto léčbu. Závěrem představíme případ nemocného, u kterého došlo k vymizení BCR-ABL klonu v důsledku léčby IM. U tohoto nemocného přetrvávalo Ph-myeloproliferativní onemocnění asociované s aktivací SFK rezistentních na IM i DAS. Test senzitivity leukocytů na TKI *in vitro* je funkčním testem na buněčné úrovni. Lze jej využít vedle standardního cytogenetického vyšetření a mutační analýzy Abl kinázové domény, a přispět tak významnou měrou k rozhodování o léčbě.

Podpořeno MSM 6198959205.

1179

Kdy a jak analyzovat mutace v kinázové doméně BCR-ABL u pacientů s CML?

K. Machová, V. Zmeková, J. Rulcová, H. Klamová, Z. Zemanová, J. Moravcová

Ústav hematologie a krevní transfuze Praha; Centrum nádorové cytogenetiky Praha

Mutace v kinázové doméně BCR-ABL jsou významným mechanismem získané rezistence u pacientů s chronickou myeloidní leukemií (CML) léčených inhibitory tyrozिनových kináz (TKI). Zatím neexistují jednotné názory, kdy a jak pacienty na přítomnost BCR-ABL mutací monitorovat. Naším cílem je najít a určit kritéria definující indikátory pro analýzu mutací, relevantně referovat a interpretovat výsledky pro klinickou praxi. Naše pracoviště do současné doby analyzovalo mutace ze vzorků periferní krve u 73 CML pacientů, z nichž 53 bylo léčeno imatinibem (IM), 18 dasatinibem (DASA) a 2 nilotinibem (NILO). U 24/73 pacientů byly detekovány mutace a byla sledována jejich kinetika, z toho u 9 retrospektivně. Data získaná z rutinního monitorování hladiny transkriptu BCR-ABL, z cytogenetických analýz a vyšetřeních krevního obrazu porovnááme s kinetikou mutací. Zdá se, že prvním indikátorem pro analýzu mutací je zastavení poklesu hladiny BCR-ABL nad 0,1 %. Na základě tohoto indikátoru jsme analyzovali mutace u 12 pacientů v kompletní cytogenetické remisi (10 IM; 2 DASA). U 8/12 pacientů byl zaznamenán nárůst mutantního klonu během

mediánu 8 měsíců po zastavení poklesu hladiny BCR-ABL nad 0,1 %. Amplifikace mutantního klonu předcházela signifikantnímu nárůstu hladiny BCR-ABL a následujícímu cytogenetickému a hematologickému relapsu u 4/8 pacientů. U dalších 4/8 pacientů zatím nebyly zaznamenány změny v hladině BCR-ABL nebo jiné známky relapsu. Mutace zatím nebyla detekována u 4/12 pacientů. U 8 pacientů se suboptimální odpovědí na léčbu a s hladinou BCR-ABL neklesající pod 10 % byla detekována mutace, přičemž jeden pacient nevykazoval žádné známky relapsu, u 2 pacientů nárůst klonu s mutací předcházela signifikantnímu nárůstu hladiny BCR-ABL a následujícímu hematologickému relapsu a u 5 pacientů amplifikace mutantního klonu předcházela hematologickému relapsu bez zvýšení hladiny BCR-ABL. Nárůst mutantního klonu u pacientů se suboptimální odpovědí k léčbě se ukázal být dobrým markérem predikujícím relaps. Takové pacienty bude vhodné monitorovat na přítomnost mutací v pravidelných intervalech obdobně, jak je celosvětově doporučováno pro monitorování hladiny BCR-ABL.

Podpořeno grantem NR/8758-3, IGA MZ ČR.

1321

Hladiny imatinibu v plazmě korelují u nemocných s CML s molekulární odpovědí na léčbu

D. Friedecký, I. Skoumalová, M. Jarošová, T. Adam, Š. Rožmanová, P. Rohoň, J. Tomková, E. Faber, K. Indrák

Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc; Laboratoř dědičných metabolických poruch FN Olomouc

Úvod: Vyšetření hladin imatinibu v plazmě (HIP) je doporučováno u nemocných s CML selhání léčby. Navíc se ukazuje, že HIP korelují u nemocných s odpovědí na léčbu. Vyšetřování HIP u nemocných s CML jsme zavedli v roce 2007. Všichni nemocní podepsali informovaný souhlas.

Metody: K měření HIP byla použita technika – vysoce účinná kapilární elektroforéza. Imatinib (IM) a jeho desmetylovaný metabolit byly separovány v základním elektrolytu o složení 50 mmol/l kys. citronová titrovaná kys. γ -amino-n-máselnou kyselinou na pH 3,6 při napětí 15 kV v nepokryté křemenné kapiláře o délce 27 cm. Plazmy byly před analýzou deproteinovány methanolem. Mez detekce metody byla 10 nmol/l a recovery a nepřesnost byly lepší než 86,7 % a 4,68 %.

Výsledky: Byly srovnány HIP nemocných s CML s optimální (poměr BCR-ABL/ABL v Q-PCR menší než 0,06 %) a suboptimální (poměr BCR-ABL/ABL vyšší než 0,06 %) molekulární odpovědí. Celkem bylo vyšetřeno 115 vzorků od 76 nemocných. K analýze bylo vybráno 18 vzorků nemocných s velkou molekulární odpovědí a 17 vzorků nemocných se suboptimální odpovědí. Podmínkou bylo,

aby byl nemocný léčen dávkou 400 mg denně minimálně jeden rok, nebyla prokázána jiná příčina suboptimální odezvy a krev byla odebrána 24 ± 6 hodin po požití léku. Jiná medikace, délka trvání léčby, čas mezi požitím léku a jídla, hmotnost nebo komorbidita nemocného nebyly brány v úvahu. Výsledky měření HIP vykazovaly u nemocných velkou variabilitu. Přesto byly zjištěny statisticky významně vyšší HIP v optimální skupině: medián 2,93 (1,33–5,61) $\mu\text{mol/l}$ než v suboptimální skupině: medián 1,75 (1,04–3,41) $\mu\text{mol/l}$; $p < 0,001$, t-test. Nemocní s negativním výsledkem Q-PCR na BCR/ABL měli zjištěné HIP vyšší: medián 3,54 (1,60 až 5,61) $\mu\text{mol/l}$; $p < 0,007$, t-test.

Závěry: U nemocných s CML léčených IM jsou HIP asociovány s molekulární odpovědí na terapii. K určení přesného významu měření HIP pro rozhodování o léčbě nemocných s CML jsou nezbytné další studie.

Podpořeno granty MSM 6198959223 a MSM 6198959205.

1304

Monitorování cytogenetické a molekulární odpovědi u nemocných s chronickou myeloidní leukemií léčených imatinibem – výsledky jednoho centra

Š. Rožmanová, M. Jarošová, I. Marešová, I. Skoumalová, J. Zapletalová, M. Holzerová, E. Faber, K. Indrák

Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc; Ústav biofyziky Lékařské fakulty UP Olomouc

Úvod: Imatinib (IM) navozuje kompletní cytogenetickou odezvu (CCyR) u většiny pacientů s chronickou myeloidní leukemií (CML) v chronické fázi. Stupeň redukce leukemických buněk vznikající účinkem IM, hodnocený fluorescenční in situ hybridizací (FISH) a kvantitativní RT-PCR (RQ-PCR), úzce koreluje s dobou bez progresu onemocnění.

Cíl: Zhodnotit význam léčebné odpovědi v definovaném čase jako kritérium pro hodnocení celkové odpovědi u pacientů léčených IM.

Metody: U nemocných s CML léčených IM byla monitorována cytogenetická a molekulární odpověď. Cytogenetická odpověď byla hodnocena pomocí metod konvenční cytogenetiky a interfázní FISH. Molekulární odpověď byla sledována pomocí RQ-PCR za použití EAC protokolu. Velká molekulární odpověď (MMR) byla definována jako poměr BCR-ABL/ABL menší než 0,06 %.

Charakteristika souboru: Bylo analyzováno 96 pacientů s CML (59 mužů a 37 žen). Medián věku v době diagnózy byl 52 let (rozmezí 19–71). V 1. linii bylo IM léčeno 30 nemocných (31 %), 66 nemocných (69 %) bylo předléčeno interferonem alfa (INF α). 81 nemocných zahájilo léčbu IM v chronické fázi, 15 v akceleraci. Vstupní skóre podle Sokala bylo nízké u 43 %, intermediární u 38 % a vysoké u 19 % nemocných. Celková délka sledování byla 12–156 měsíců (medián 56).

Výsledky: Porovnání odpovědí na léčbu v nemocných (léčených v 1. linii a předléčených) ukázalo, že obě skupiny byly srovnatelné, co se týká věku, fáze CML, Sokalova nebo Hasfordova skóre, podílu CCyR a MMR a výskytu progresu choroby. Byly zjištěny významné rozdíly ve výskytu přídatných cytogenetických změn (1 vs 18; $p = 0,008$) a v intervalu od diagnózy do zahájení léčby IM (medián 1,1 vs 14,4 měsíců; $p < 0,001$). Celkem 43 (45 %) nemocných dosáhlo CCyR do doby 1 roku léčby. Tito pacienti v obou skupinách měli signifikantně vyšší pravděpodobnost následného dosažení MMR než ti nemocní, kteří během tohoto časového období CCyR nedosáhli ($p = 0,004$ a $0,0003$).

Závěr: Naše výsledky potvrzují, že dosažení CCyR během 1. roku léčby IM silně koreluje s následným dosažením MMR a celkovým přežitím. Proto by měl být tento údaj používán u nemocných s CML jako důležité měřítko hodnocení odezvy na IM.

Práce je podporována grantem MSM 6198959205.

1299

Expresní profil v patologickém klonu buněk polycythemia vera

E. Otáhalová, H. Bruchová, E. Nečas, J. T. Prchal

Ústav hematologie a krevní transfúze Praha; Ústav patologické fyziologie 1. lékařské fakulty UK Praha; Division of Hematology, University of Utah, School of Medicine, Salt Lake City, Utah, USA

Polycythemia vera (PV) patří mezi myeloproliferativní onemocnění způsobené klonální proliferací pluripotentní kmenové hematopoetické buňky. U více než 90 % pacientů s PV je detekována somatická bodová mutace v oblasti kódující tyrozinovou kinázu JAK2 (JAK2 V617F). Přítomnost JAK2 V617F mutace vede ke konstitutivní aktivaci JAK2 a následně k abnormálně zvýšené erytropoéze. Přesná úloha této mutace při vzniku PV a jiných myeloproliferativních onemocnění však zůstává neobjasněná. Naše hypotéza předpokládá, že JAK2 V617F mutace není primárním defektem v patologickém klonu PV buněk, ale konstitutivní aktivací JAK2 tyrozinové kinázy pouze přispívá k patogenezi PV charakterizované abnormálně zvýšenou erytropoézou. Proto se náš výzkum zaměřuje na rané erytroidní progenitory a jejich expresní profil jak během normální erytropoézy, tak i u pacientů s PV, a na vytipování dalších potenciálních genů významných v etiologii a patogenezi PV. Mononukleární buňky (MNC) izolované z periferní krve PV pacientů a zdravých dárců jsme pomocí 21denní in vitro kultury v trifázovém tekutém mediu diferencovali do erytroidní linie. Pomocí technologie Illumina jsme sledovali genovou expresi vzorků napříč kultivací vedoucí k vytipování kandidátních genů asociovaných s PV. BeadChip systém Illumina představující inovační technologii mikročipů pro analýzu DNA, RNA i proteinů. Pro

analýzu jsme použili mikročipy Human-Ref-8 v2 Expression BeadChips umožňují celogenomovou expresní analýzu (více než 22 000 sond) 8 vzorků současně na jednom mikročipu. Předpokládáme, že poznatky získané během řešení projektu povedou k lepšímu porozumění vzniku a průběhu PV a také ke zlepšení diagnostiky a léčby.

Podpora: 1P01CA108671-O1A2 (MPD) Consortium project no. 1; R01HL50077-11 (PI Prchal)

1208

Analýza mutácie JAK2 V617F v trepanobiopsických vzorkách kostnej drene morfoloicky a klinicky verifikovanej pravej polycytémie

T. Burjanivová, J. Marcinek, Z. Lasabová, P. Szépe, T. Balhárek, A. Vaňochová, L. Plank

Ústav patologickej anatómie a Konzultačné centrum bioptickej diagnostiky ochorení krvotvorby Jesseniovej lekárskej fakulty UK a MFN Martin, Slovenská republika; Ústav molekulevej biológie Jesseniovej lekárskej fakulty UK Martin, Slovenská republika

Úvod: Prítomnosť mutácie JAK2 V617F, resp. mutácií v exóne 12 génu JAK2, sa považuje za tzv. „veľké“ diagnostické kritérium pravej polycytémie (PV). Pre detekciu JAK2 mutácie sa najčastejšie používa DNA izolovaná z periférnej krvi, prípadne z punktátu kostnej drene. Použitie DNA izolovanej z parafínových blokov KD je značne limitované pre degradáciu DNA. Nie všetky pracoviská však majú možnosť vyšetrovania V617F mutácie z natívneho materiálu, a preto sme sa zamerali na detekciu uvedenej mutácie z fixovaného materiálu KD.

Metodika: Prítomnosť mutácie sme zisťovali u 68 pacientov, v ktorých morfoloický obraz čiastočne alebo úplne zodpovedal PV. Dotazníkovou formou sme požiadali ošetrovujúcich lekárov o ich záverečnú diagnózu, ktorú sme obdržali v 43 prípadoch, pričom u 33 pacientov bola potvrdená diagnóza PV a 10krát diagnóza iného myeloproliferatívneho ochorenia (MPO). Mutáciu V617F sme vyšetrovali v DNA izolovanej z parafínových blokov KD metódou alelovo-špecifickej multiplex PCR. V pozitívnych prípadoch sme pokračovali v reštrikčnej analýze s enzýmom BsaXI, čo umožnilo nielen potvrdiť prítomnosť mutácie, ale aj identifikovať jej homozygótnu, resp. heterozygótnu formu. U pacientov s klinicky i morfoloicky verifikovanou PV ($n = 3$) bez mutácie V617F sme vyšetrovali prítomnosť mutácie v exóne 12 pomocou alelovo-špecifickej PCR.

Výsledky: Celkove sme mutáciu JAK2 V617F zaznamenali u 61 pacientov (89,7 %, 32 heterozygótov, 29 homozygótov), 6 pacientov bolo negatívnych, 1 vzorka bola nehodnotiteľná. V skupine 33 prípadov klinicky i morfoloicky potvrdenej PV sme 30krát zaznamenali pozitivitu (90,9 %), 2krát negativitu a 1 vzorka bola nehodnotiteľná. Mutáciu v exóne 12 sme detekovali u 1 pacienta.

Záver: Výskyt mutácie JAK2 v našom súbore je porovnateľný s množstvom klinických štúdií využívajúcich natívny materiál, čo potvrdzuje, že napriek značnej degradácii DNA izolovanej z parafínových rezov sme schopní úspešne detekovať mutácie JAK2 génu. Vyšetrenie JAK2, resp. exónu 12, má byť realizované u všetkých pacientov s podozrením na PV. Ho-reuvedená metóda umožní výrazne skvalitniť rutinnú diagnostiku MPO a umožňuje i analýzu archívneho materiálu. *Podporené grantom ESF – Inkubátor doktorantov JLF UK.*

POSTERY

P1 – 1343

Prvé skúsenosti s aplikáciou Depocyte v profylaxii a liečbe leukémie CNS u dospelých pacientov s ALL

T. Guman, E. Tóthová, M. Fričová, N. Štecová, A. Kafková, M. Surová, I. Duřová, M. Hlebašková, E. Švorcová, V. Takáč, E. Antalová

Klinika hematológie a onkohematológie Lekárskej fakulty UPJŠ a FN L. Pasteura Košice, Slovenská republika; Klinika neurologie Lekárskej fakulty UPJŠ a FN L. Pasteura Košice, Slovenská republika

Neoplastická meningitída je v 4–15 % diagnostikovaná pri solídnych tumoroch (ako karcinomatózna meningitída). V 5–15 % pri leukémii a lymfómoch (ako lymfomatózna meningitída). Na Klinike hematológie a onkohematológie v Košiciach sme ako prvý na Slovensku aplikovali Depocyte u 21-ročného pacienta s relapsom T-ALL s tumorom mediastína s prejavmi lymfomatózneho meningitídy, neskôr u 2 pacientov s diagnózou de novo pre-B ALL (44-ročný muž) a T-lymfoblastový lymfóm (48-ročný muž) ako profylaxiu CNS liečených podľa protokolu GMALL (úvodná, konsolidačná, udržiavacia liečba). Hodnotíme a porovnávame diagnostiku (pred a po liečbe) – cerebrospinálnej tekutiny – likvoru (CSF), cytológie, výsledky NMR mozgu, klinický prejav, priebeh liečby a sprievodné komplikácie po aplikácii Depocyte.

P2 – 1331

Zhodnocení přínosu biologické terapie pro prognózu nemocných s mnohočetným myelomem – zkušenosti jednoho pracoviště

V. Ščudla, J. Minařík, M. Zemanová, T. Pika, E. Faber, K. Indrák, J. Bačovský, K. Srovnalík, K. Langová

III. interní klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc; Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc; Katedra biofyziky Lékařské fakulty UP Olomouc; Česká myelomová skupina

Úvod: Mnohočetný myelom (MM) je neobyčejně heterogenní, nevyléčitelné zhoubné onemocnění s individuálně variabilní prognózou.

Cíl studie: Zhodnocení praktického přínosu biologické terapie, tj. podání thalidomidu a bortezomibu v léčbě 2. a 3. linie při rezistenci MM na předchozí terapii.

Materiál a metody: Byly analyzovány 2 soubory MM léčené pouze konvenční chemoterapií (KCH), tj. soubor z let 1987–1995 (n = 78) a z let 1996–2007 (n = 294) i soubor 126 nemocných (z let 1996–2007) léčený HD terapií s transplantací autologních periferních krvetvorných buněk (HDT/ASCT, n = 126). V léčbě relapsu/progrese byla použita terapie thalidomidem s dexametazonem (TD) a většinou i s cyklofosfamidem (CTD), v případě rezistence i bortezomibem s dexametazonem (BD).

Výsledky: V souboru z let 1987–1995 léčeném pouze KCH bylo celkové přežití (OS) 41 měsíců. Nemocní souboru z let 1996–2007, nesplňující kritéria HDT/ASCT, léčení při rezistenci na KCH režimy TD/CTD, případně i BD (n = 61), měli medián OS 61 měsíců. V celém souboru nemocných zařazených do transplantačního programu, včetně nemocných zemřelých již v indukční/předtransplantační fázi (n = 126), byl medián OS 76 měsíců. V sestavě nemocných léčených v případě relapsu/progrese po HDT/ASCT režimy TD/CTD, případně BT (n = 49) byl medián OS 101 měsíců. Nemocní léčení dvojitou HD/ASCT a v případě relapsu/progrese režimy TD/CTD, případně BD (n = 32), měli kratší přežití nežli nemocní léčení režimy TD/CTD a BD (n = 80) již při 1. relapsu nebo progresi MM po 1. HDT/ASCT (OS 67 vs x měsíců).

Závěr: Z analýzy vyplynulo, že použití biologických působků, tj. thalidomidu a bortezomibu v léčbě relapsu/progrese MM, významně zlepšilo prognostický výhled a celkové přežívání nemocných léčených jak pouhou KCH, tak i HDT/ASCT.

VVZ 6198959205, IGA NR 9500

P3 – 1324

Histiocytóza z Langerhansových buněk a některé další histiocytární malignity

Z. Adam, J. Neubauer, R. Hájek, M. Krejčí, L. Pour

Interní hematoonkologická klinika Lékařské fakulty MU a FN Brno, pracoviště Bohunice

V průběhu 18 let bylo na Interní hematoonkologické klinice v Brně léčeno a sledováno 14 pacientů s prokázanou histiocytózou z Langerhansových buněk (LCH). Celkem 4 pacienti k nám byli předáni s LCH diagnostikovanou a léčenou v raném dětském věku a u 10 pacientů byla choroba diagnostikována až ve věku dospělém. U 3 ze 4 pacientů s diagnózou stanovenou v dětství došlo k recidivě nemoci, v 1 případě z nich k mnohočetným recidivám s následným neurodegenerativním poškozením CNS. Z 10 pacientů, u nichž byla nemoc diagnostikována v dospělosti,

měla u 4 velmi agresivní průběh, ve všech těchto případech šlo o primární kostní formu nemoci. U 1 z nich se po opakovaných kostních atakách přidružilo postižení plic. Celkem u 4 případů jsme se setkali s primárně mimokostním začátkem nemoci, 1krát v měkké části čelisti, 1krát v lymfatické uzlině, 1krát v dospělosti vzniklý diabetes insipidus a perianální infiltrace, 1krát čistě kožní postižení. U 1 pacienta byl diagnostikován a léčen sarkom z interdigtujících dendritických buněk. Cílem přednášky je upozornit možné projevy této extrémně vzácné nemoci, která svými kostními projevy může připomínat mnohočetný myelom, a sdělit zkušenosti s léčbou této nemoci v dospělosti.

P4 – 1323

Lenalidomid (Revlimid) v léčbě mnohočetného myelomu – naše první zkušenosti

E. Novotová, R. Neuwirtová, J. Straub, A. Jonášová, I. Špička

I. interní klinika 1. lékařské fakulty UK a VFN Praha

Prognóza pacientů s mnohočetným myelomem (MM) se v posledním desetiletí výrazně zlepšila zavedením nových léků, mezi něž patří inhibitor proteazomu – bortezomib – a tzv. imunomodulační léky („ImiDs“) – thalidomid a lenalidomid. Pro odlišný mechanismus účinku a toxicitu je lze využívat v různých kombinacích či sekvenčně. Zatímco s prvními 2 preparáty máme v rámci ČR relativně značné zkušenosti, lenalidomid byl pro klinické využití v léčbě MM (a MDS) schválen nejspíše až jeho použití brání i vysoká ekonomická náročnost. Klinické studie však prokázaly, že preparát je účinný i u pacientů refrakterních na různé předchozí způsoby terapie, včetně nových léků. Na našem pracovišti jsme léčili kombinací lenalidomidu a dexametazonu 2 nemocné v rámci 7., resp. 6. linie terapie. V prvním případě jsme pozorovali uspokojivý efekt léčby, který se projevil hlavně možností ukončit pravidelné terapeutické plazmaferézy a zlepšením klinického stavu. Pacientka po 3 cyklech léčby následně zemřela na komplikace alogenní TKD. V druhém případě došlo ke stabilizaci choroby, která v době zaslání abstraktu trvá déle než 3 měsíce. Závažným problémem v obou případech byly opakované odklady cyklů léčby z důvodu administrativních a prodlevy dodání léku.

P5 – 1315

Laboratorní hematologie (VŠ): virtuální mikroskopie v hematologii

J. Gumulec, L. Šáchová, P. Slezák, J. Zuchnická, C. Bodzásová, H. Plonková, M. Brejcha, D. Klodová, M. Wróbel, C. Bogoczová, M. Matuška, J. Dvořáčková, M. Radina, M. Kučerová, P. Klement

Ústav klinické hematologie a Hemato-onkologické a Transfuzní centrum FN Ostrava; Oddělení klinické hematologie Onkologického centra J. G. Mendela Nový Jičín; Klinika onkologická a Hemato-onkologické a Transfuzní centrum FN Ostrava; Ústav patologie FN Ostrava; McMaster University and Henderson Research Centre, Hamilton, Canada

Rostoucí nároky na přesnost a rychlost morfologické diagnostiky onemocnění krve a krvetvorných orgánů nás nutí stále více využívat potenciálu moderních technologií. Stále častěji je vyžadováno „druhé čtení“ nezávislým odborníkem. Jednou z technologií, která toto umožňuje, je telehematologie. Pro objektivní hodnocení nátěrů kostní dřeně nebo periferní krve však nestačí vybrat několik obrázků z omezeného počtu zorných polí. Nezbytné je prohlédnout celý nátěr nebo co možná největší hodnotitelnou část nátěrů. V současné době to vše umožňuje systém digitální virtuální mikroskopie. Jedině s využitím této technologie lze provádět adekvátní on-line konzultace nebo tzv. druhá čtení, jediné tak lze snadno archivovat vzácné nálezy, jediné tak lze vytvářet kvalitní on-line databáze. V přednášce prezentujeme naše první zkušenosti s touto progresivní technologií a podáváme návrh pro vytvoření sítě dobře kooperujících morfologických laboratorí, která přesnou a zároveň rychlou morfologickou diagnostiku zmiňovaných onemocnění umožní.

P6 – 1296

Laboratorní hematologie (VŠ): elektronická žádanka

P. Šigutová, V. Petříková

Ústav klinické biochemie a hematologie Lékařské fakulty UK a FN Plzeň

Rozšiřující se spektrum vyšetřovacích metod, zvyšující se množství biologického materiálu k laboratornímu vyšetření, nutnost zrychlení odbavení vzorku u příjmu, potřeba maximálního omezení chyb v preanalytické fázi vyšetření

(především vyloučení záměny vzorků) a zvýšení požadavků na rychlou a kvalitní laboratorní analýzu si v naší laboratoři vynutilo postupnou automatizaci příjmu materiálu. Po předchozích přípravných fázích, kdy byl zaveden nemocniční informační systém (NIS) v celé nemocnici a byl vytvořen modul centrálního příjmu v laboratorním informačním systému (LIS) v biochemické laboratoři a později také v hematologické laboratoři, se po propojení jednotlivých laboratorních databází vytvořily podmínky pro společný příjem vzorků a žádanek. V průběhu loňského roku jsme uvedli do zkušebního provozu elektronický příjem žádanek z NIS do LIS. Naše sdělení popisuje postupy realizace a zároveň se snaží o objektivní analýzu dosavadních zkušeností.

P7 – 1295

Expresia bcl-xl a glyceralddehyd-3-fosfát dehydrogenázy vo vzťahu k citlivosti leukemických myeloblastov na cytostatiká in vitro

J. Hatok, J. Jurečková, J. Chudej, I. Plameňová, P. Hollý, D. Dobrota, P. Račay

Ústav lekárskej biochémie Jesseniovej lekárskej fakulty UK Martin, Slovenská republika; Klinika hematológie a transfuziológie Jesseniovej lekárskej fakulty UK a MFN Martin, Slovenská republika

Jednou zo základných metabolických črt nádorových buniek je stimulácia glykolýzy na úkor mitochondriálnej oxidácie. Mitochondrie sa okrem účasti na oxidatívnom metabolizme významnou mierou podieľajú na iniciácii a rozvoji vnútornej apoptotickej dráhy. V súčasnosti sa predpokladá, že zmenený metabolický profil v neprospech mitochondrií je príčinou zníženej schopnosti nádorov podliehať mitochondriálnej apoptóze. V našich experimentoch sme pozorovali významnú variabilitu hladín mRNA antiapoptotickej bielkoviny bcl-xl ako aj glykolytickej bielkoviny glyceralddehyd-3-fosfát dehydrogenázy (gapdh) v leukemických myeloblastoch izolovaných z krvi pacientov s potvrdenou diagnózou akútnej myeloblastovej leukémie. Cieľom našej práce bolo teda zistiť, či má zmenená transkripcia génov glykolytických bielkovín vplyv na hladinu mRNA antiapoptotickej bielkoviny bcl-xl. Súčasne sme zisťovali, či má hladina mRNA oboch bielkovín vplyv na chemosenzitivitu leukemických myeloblastov stanovenú in vitro. Korelačná analýza ukázala, že medzi hladinou mRNA bcl-xl a hladinou mRNA gapdh neexistuje žiadny štatisticky významný vzťah. Po vykonaní MTT testu a stanovení citlivosti myeloblastov na vybrané cytostatiká sme zistili, že blasty s vysokou hladinou mRNA bcl-xl sú takmer 3krát menej citlivé na cytozín-arabinozid než blasty s nízkou hladinou mRNA bcl-xl ($LC_{50} 2,48 \pm 0,84$ mg/l vs $0,72 \pm 0,17$ mg/l, $p < 0,05$). U ostatných vyšetovaných

cytostatík (daunorubicín, mitoxantrón, etopozid a vinblastin) sme nepozorovali štatisticky významné rozdiely. V prípade gapdh sme nepozorovali štatisticky významné rozdiely v citlivosti medzi blastami s nízkou a vysokou hladinou mRNA gapdh u žiadneho vyšetovaného cytostatika. Podobne nemala vplyv na citlivosť leukemických blastov voči cytostatikám prítomnosť 2-deoxyglukózy, inhibítora glykolýzy. Naše výsledky naznačujú, že v prípade akútnej myeloblastovej leukémie je citlivosť buniek čiastočne modulovaná hladinou antiapoptotickej bielkoviny bcl-xl a nie je ovplyvnená metabolickým ich profilom.

Podporené grantom MŠ SR AV/1106/2004.

P8 – 1285

Proteomická analýza vlivu bortezomibu na myelomové buňky

J. Čumová, A. Potáčková, I. Kasalová, O. Šedo, H. Konečná, Z. Zdráhal, R. Hájek

Laboratoř experimentální hematologie a buněčné imunoterapie Oddělení klinické hematologie FN Brno, pracoviště Bohunice; Univerzitní výzkumné centrum – Česká myelomová skupina Lékařské fakulty MU Brno; Oddělení funkční genomiky a proteomiky Ústavu experimentální biologie Přírodovědecké fakulty MU Brno; Interní hematologická klinika Lékařské fakulty MU a FN Brno, pracoviště Bohunice

Úvod: Mnohočetný myelom (MM) je stále nevyléčitelné onemocnění charakterizované klonální expanzí maligních plazmatických buněk. Nové léky dále zlepšují prognózu nemocných. Bohužel i na tato léčiva je zpravidla 1/3 nemocných rezistentní. Cílem této práce bylo nalézt a charakterizovat proteinové v lidské myelomové linii ARH-77 indukované bortezomibem (Velcade), který působí u MM jako silný selektivní inhibitor na chymotrypsin-like aktivitu 20S $\beta 5$ -podjednotky proteazomu.

Materiál a metody: Buněčná myelomová linie ARH-77 byla kultivovaná po dobu 6–24 hod s přidávkem bortezomibu o celkové koncentraci 0, 5, 10, 15, 20 nM. K separaci proteinů byla využita dvourozměrná elektroforéza (2D-PAGE) a výsledné proteinové mapy byly podrobeny obrazové analýze umožňující objektivní zhodnocení exprese proteinů v buňce. Rozdílně exprimované proteiny byly identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie (MALDI-MS/MS, LC-MS/MS).

Výsledky: V průběhu časového působení bortezomibu na kultivované myelomové buňky docházelo ke zvýšené expresi cytoskeletárních proteinů (γ -aktin, β -aktin, tubulin- $\beta 2$), regulačního proteinu proteolýzy ubikvitinu (SKP1 izoformy b), TCTP1 proteinu, ANP32A proteinu, SDF2 like proteinu 1, peroxiredoxinu 1 a ko-chaperonu P23. Při působení 20 nM Velcade po 24hodinovém působení docházelo ke ztrátě exprese nukleofosminu, HP95, ribozo-

málního proteinu P0, jaderného ribonukleoproteinu K, glutathion reduktázy, FK506 – vazebného proteinu, protein disulfid izomerázy – related protein 5, transaldolázy 1, enolázy 1, glyoxylázy 1 a ubikvitin specifických peptidáz.

Závěr: V naší práci jsme ověřili, že je možné pomocí technik 2D-PAGE elektroforézy a hmotnostní spektrometrie sledovat proteinové změny vyvolané působením bortezo-mibu na myelomové buňky. V další práci budeme pomocí těchto technik analyzovat potencionální markery rezistence a citlivosti na myelomových buňkách nemocných léčených bortezo-mibem.

Práce vznikla za podpory grantů: MŠMT LC06027, MSM0021622434 a MSM0021622415.

P9 – 1283

Akutní promyelocytární leukemie a obtížnost stanovení z pohledu morfologie

D. Mikulenková

Ústav hematologie a krevní transfuze Praha

Akutní promyelocytární leukemie (APL) je onemocněním patřící z diagnostického hlediska do skupiny leukemií s rekurentními cytogenetickými abnormalitami. Pro toto onemocnění je u většiny případů typický morfologický nálezh v nátěru periferní krve (PK) a kostní dřeně (KD) charakterizovaný přítomností dysplastických promyelocytů (atypický nukleocytoplazmatický poměr, zrací asynchronie, atypická granularita nejčastěji ve smyslu hypergranularity či hrubé granularity zakrývající i jádro, přítomnost jednotlivých či spíše vícečetných Auerových tyčí). Vstupní cytologické vyšetření nátěru PK a KD by mělo iniciovat další nutná vyšetření ke stanovení správné diagnózy APL (vyšetření průtokovou cytometrií, molekulárně genetické vyšetření). V naší laboratoři je diagnostika APL založena na pečlivé morfologické analýze nátěru PK a KD v panoptickém barvení a je podpořena cytochemickým vyšetřením myeloperoxidázy a α -naftylchloroacetátsterázy. V našem příspěvku budou uvedeny 2 případy z loňského roku s odlišnou anamnézou i morfologií buněk.

P10 – 1281

Sticky platelet syndrome (SPS) and platelet glycoproteins

P. Kubisz, J. Musiał

Klinika hematologie a transfuziologie Jesseniovej lékařské fakulty a MFN Martin, Slovenská republika; Department of Medicine, Jagellonian University, Krakov, Poland

Background: The results of recent studies suggest sticky platelet syndrome (SPS) to be a common cause of arterial and venous thrombosis.

Patients and methods: We examined 451 patients with otherwise unexplained arterial or venous thrombosis. SPS evaluations were performed according to the method of Mammen. PACKS-4 aggregometer was used. Patients with SPS were tested for both the GPIIIa C98T and GPIa C807T polymorphisms. The polymerase chain reaction (PCR) was used for the detection of studied polymorphisms.

Results: SPS was detected in 93 (21.2 %) patients, 29 men and 64 women. Clinically SPS resulted as an arterial thrombosis in 58 patients (coronary thrombosis, cerebral ischemic attacks), 27 individuals passed venous thrombosis (DVT, PE) and 9 patients suffered from recurrent abortions. SPS was classified as a type I in 27 cases, 65 patients had type II and 1 patient was diagnosed as a type III, respectively. Ninety-one patients with SPS were tested for GPIIIa abnormality, 23 % of them showed an abnormality (20 % were heterozygotes for GPIIIa C98T, 3 % were homozygotes for this abnormality). GPIa C807T polymorphism was examined in 89 patients with SPS, 44 % showed an abnormality of the GPIa (30 % of them were heterozygotes and 14 % were homozygotes). Nevertheless, almost the same frequency of the platelet GP abnormalities was found also in the control group.

Conclusion: Because anticoagulant treatment (heparin, warfarin) will not alleviate the thrombotic tendency of SPS, but simple aspirin therapy (80–100 mg) almost always will correct the defect and protect the individual from the second thrombotic event, it is particularly important to define the presence of this defect and to find out its underlying cause. In our study we failed to find the close relationship between the studied platelet glycoprotein polymorphism and SPS phenotype.

The work was supported by grants VEGA 1/3381/06 and VEGA 1/0067/08.

P 11 – 1274

Výskyt chromozomálně integrovaného HHV6 u dětí léčených pro ALL a AML

P. Hubáček, K. Mužíková, A. Hrdličková, O. Cinek, K. Hynčicová, P. Sedláček, J. Starý

Klinika dětské hematologie a onkologie 2. lékařské fakulty UK a FN Motol Praha; Pediatrická klinika 2. lékařské fakulty UK a FN Motol Praha

Úvod: Chromozomální integrace 6. lidského herpesviru (CHI-HHV6) je jednou z nepříliš známých variant výskytu HHV6 v běžné populaci. Šíří se vertikálním přenosem virové DNA z rodiče na potomka, a proto je virová DNA přítomna ve všech buňkách organismu. Poměr lidské a virové DNA je u CHI-HHV6 1 : 1. Aktivní infekce s tvorbou nových virových partikulí zatím nebyla u CHI-HHV6 prokázána, a to ani in vitro, ani in vivo metodami. Z klinického

hlediska je proto tento stav pro pacienta nebezpečný pouze zbytečným použitím virostatik s jejich potenciálně závažnými nežádoucími účinky.

Metodika: V naší retrospektivní studii jsme testovali výskyt CHI-HHV6 na vzorcích DNA od celkem 339 pacientů léčených pro ALL či AML v jednotlivých hematologických centrech ČR v letech 1995–2007. Náhodně vybrané vzorky jednotlivých pacientů určených původně ke stanovení minimální reziduální nemoci u leukemií jsme otestovali na přítomnost HHV6 pomocí kvantitativní PCR a virovou nálož jsme normalizovali na 10 000 lidských genomických ekvivalentů. U vysoce pozitivních pacientů jsme testovali i další vzorky z průběhu terapie léčebnými protokoly a ze vzorků vlasů a nehtů. DNA byla izolována pomocí Qiagen DNA Blood Mini Kitů a Qiagen DNA Micro Kit.

Výsledky: Přítomnost HHV6 DNA jsme prokázali ve 107 vzorcích od 91 pacientů (26,8 %). Významně vysokou pozitivitu HHV6 (přibližně 10 000 normalizovaných kopií) jsme detekovali u 5 pacientů naší kohorty (1,5 %). Následnou analýzou jsme u 4 z těchto pacientů určili variantu A, jeden pacient měl variantu B. Přítomnost CHI-HHV6 jsme si ověřili také ve vzorcích bezkrevné tkáně (vlasy a nehty). U žádného z pacientů léčených pro ALL/AML nebyly pozorovány komplikace, které by mohl způsobovat HHV6. Ve 2 případech pacienti prodělali také alogenní HSCT bez závažných komplikací způsobeným HHV6 v potransplantačním období.

Závěr: Zjištěný výskyt CHI-HHV6 i převaha varianty A u našich pacientů je v souladu s dosud publikovanými pracemi. Vzhledem k možnému iatrogennímu poškození pacienta při podávání virostatik je třeba CHI-HHV6 v případech vysoké positivity vždy vzít v potaz a při potvrzení jeho přítomnosti léčbu ukončit.

Podpořeno VZ FNM 00064203 a MŠMT0021620813.

P12 – 1273

Přínos flowcytometrické analýzy mozkomíšního moku v diagnostice postižení CNS u pacientů s hematoonkologickým onemocněním

R. Urbanová, L. Kučerová, J. Mareš, J. Sklenářová, K. Indrák, Z. Pikalová, J. Zapletalová

Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc; Ústav patologie Lékařské fakulty UP a FN Olomouc; Neurologická klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc; Ústav lékařské biofyziky Lékařské fakulty UP Olomouc

Úvod: Diagnostika postižení CNS hematoonkologickým onemocněním je postavena na flowcytometrickém, cytologickém a biochemickém vyšetření likvoru, zobrazovací metody vzhledem k nespecifickým nálezům mají význam pomocný.

Metody a soubor: V letech 2003–2007 jsme vyšetřili celkem 257 vzorků likvoru u 164 pacientů s hematologickou malignitou. Jednalo se o vyšetření provedená u klinicky symptomatických pacientů, dále o vyšetření preventivní u pacientů asymptomatických s diagnózou akutní leukemie nebo rizikových pacientů s nonhodgkinským lymfomem (NHL).

Cíl: Podrobně jsme analyzovali soubor pacientů s pozitivním flowcytometrickým nálezem, vzájemně pak porovnali všechny metody vyšetření likvoru s výsledky zobrazovacích vyšetření.

Výsledky: U 21 pacientů (7krát akutní B-lymfoblastická a 2krát akutní T-lymfoblastická leukemie, 4krát akutní myeloidní leukemie, 4krát difúzní velkobuněčný B-NHL, 1krát periferní T-NHL, 1krát primární lymfom CNS, 1krát mantle cell lymfom, 1krát B-chronická lymfatická leukemie) jsme zaznamenali při 33 vyšetřeních pozitivní nález flowcytometricky, morfologicky nebo biochemicky. V 17 případech bylo vyšetření provedeno všemi metodami, ve 12 případech (71 %) jsme zaznamenali shodu pozitivivity ve vyšetření likvoru. U 2 pacientů ve 3 vyšetřeních byla citlivější metodou flowcytometrie, u jedné neurologicky symptomatické pacientky s difúzním velkobuněčným B-NHL v prvních 2 vyšetřeních byla citlivější metodou biochemie likvoru, až 3. vyšetření likvoru bylo pozitivní také flowcytometricky. Klinické příznaky postižení CNS byly přítomny u 13 pacientů (62 %). U 12 pacientů byla provedena zobrazovací vyšetření (MRI nebo CT mozku, míchy), 4krát byl nález negativní, u 8 pacientů nespecifickým pozitivní nález. Přežití pacientů (OS) s postižením CNS hematologickou malignitou je krátké, ze souboru 21 pacientů 19 pacientů zemřelo, medián OS je 15 měsíců od stanovení diagnózy hematologického onemocnění.

Závěr: Z našeho pozorování jednoznačně vyplývá nutnost opakovaného a kompletního vyšetření všech získaných vzorků likvoru, provedení zobrazovacích vyšetření, a to zejména důsledně u pacientů s klinickým podezřením na postižení CNS.

Podporováno MSM 6198959205.

P14 – 1256

Detekce cirkulujících endotelových buněk v periferní krvi metodou průtokové cytometrie

L. Kíderyová, H. Rychtrmcoová, R. Veselá, L. Uchytlová, R. Pytlík

I. interní klinika 1. lékařské fakulty UK a VFN Praha

Náš zájem je soustředěn na cirkulující zralé endotelové buňky (CEC) a cirkulující endotelové progenitory (CEP), jejichž obsah v periférii úzce souvisí s poruchami mikro-cirkulace a vaskularizací malignit. Flow-cytometrické sta-

novení CEC a CEP je komplikováno extrémní vzácností událostí (0,1–0,0001 %) a volbou vhodných markerů. Dosud nebyly stanoveny znaky odpovídající jednotlivým stupňům vývojové hierarchie endotelových prekursorů a zralých endotelových buněk. Minimalizovali jsme vlivy jednotlivých faktorů negativně ovlivňujících reprodukovatelnost výsledků měření extrémně vzácných událostí. Rušení nespecifickou vazbou přes Fc- γ receptory jsme omezili inkubací s FcR blocking reagent. Erytrocyty lyzujeme činidlem na bázi chloridu amonného. Dvousložková lyzační činidla nedoporučujeme z důvodu nižších výtěžků. Důležitou roli hraje výběr vhodného slepého kanálu, který obsahuje značenou protilátku proti znaku přítomnému na většině buněk zkoumaného souboru, nikoli však na hledaných vzácných buňkách. Upustili jsme od dříve preferovaného použití anti-CD45, kterou mohou některé populace endotelových buněk slabě exprimovat. Sestavili jsme koktail protilátek proti jednotlivým populacím krevních buněk (CD3, CD19, CD14, CD15). CEP byly stanovovány jako dvojité pozitivní populace CD34+/VEGFR2+ a CD34+/CD133+, CEC jako CD31+/CD146+, oboje negativní ve znacích běžných krevních populací. Zásadní je načtení alespoň 300 000 buněk. Měřili jsme na přístroji FACSCalibur s jedním laserem (argon 488 nm). PMT jsme nastavovali pomocí Fluorospheres 8 Peaks. Kompenzace jsme stanovili single anti-CD8 značenými krevními buňkami. Použití umělých s fluorochromem konjugovaných kompenzačních kuliček nedoporučujeme. Kuličky konjugované s tandemem jsou nestabilní. Vyvinuli jsme reprodukovatelnou metodiku gatingu.

Přesné a rychlé cytometrické stanovení cirkulujících endotelových buněk (CEC a CEP) představuje nepochybný potenciál v diagnostice a predikci mnoha systémových onemocnění, jako jsou nádorová onemocnění či vaskulitidy. Podpořeno: GAUK 33/2006/C/1. LF, IGA MZ ČR 8754/3, MSM 0021620808.

P15 – 1250

Comparison of two different methods of plasma cells separation from bone marrow of multiple myeloma patients

I. Burešová, R. Suská, D. Kyjovská, M. Rycová, J. Moravcová, L. Kovářová, R. Hájek

Univerzitní výzkumné centrum – Česká myelomová skupina
Lékařské fakulty MU Brno; Laboratoř experimentální hematologie a buněčné imunoterapie FN Brno, pracoviště Bohunice; Interní hematologická klinika Lékařské fakulty MU a FN Brno, pracoviště Bohunice

Introduction: The research of multiple myeloma (MM) is often limited by low infiltration of plasma cells (PCs). We compared two methods of purification – Magnetic Cell

Separation (MACS) and Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS).

Methods: PCs from bone marrows (BM) of 20 newly diagnosed multiple myeloma patients were purified. Each BM was carefully mixed and divided into two aliquots. The mononuclear fraction (MNC) was acquired from one aliquot by Histopaque density gradient centrifugation and CD 138+ PCs were purified by both MACS positive selection (MACS samples) and sorting on FACS Aria (FACS MNC samples). The other aliquot was erythrolysed by the solution with ammonium chlorite and sorted on FACS Aria (FACS lysis samples). The percentage of CD138+ cells (purity) was evaluated by morphology. We compared the methods both in all samples and in three groups of them according to the percentage of CD138+ cells assessed by FC immediately before purification: the first group with percentage under 5 % (group I), the second 5–10 % (group II) and the third over 10 % (group III). The differences between individual methods and individual groups were statistically evaluated (nonparametric Kruskal-Wallis ANOVA test and Mann-Whitney test).

Results: Medians of purities for all samples were 70.9 % (range 8.6–98.8 %) in MACS samples, 98.8 % (83.3–100 %) in FACS MNC samples and 96.4 % (50–100 %) in FACS lysis samples. The purities were significantly higher both in FACS lysis ($p = 0.044$) and FACS MNC samples ($p < 0.001$) in comparison with MACS samples. There was no significant difference in purities in sorted cells ($p = 0.119$). In individual groups however, significant differences were seen only in group I ($p = 0.005$ in FACS MNC and $p = 0.048$ in FACS lysis in comparison with MACS). In groups II and III no significant differences in purity were found.

Conclusion: FACS and MACS methods of purification of PCs from BM provided comparable purities in samples with the infiltration over 5 % of PCs; in samples with lower infiltration the purities were significantly higher in FACS than in MACS.

Supported by MSMT LC 06027.

P17 – 1243

Vliv S-nitrosoglutathionu na vlastnosti fibrinogenu

J. Štikarová, E. Schönfeldová, A. Kestlerová, P. Májek, K. Pimková, J. Suttner, J. E. Dyr
Ústav hematologie a krevní transfuze Praha

Úvod: Fibrinogen (Fbg) je glykoprotein o velikosti 340 kDa. Má zásadní úlohu v sekundární hemostáze, kdy po odštěpení fibrinopeptidů z molekuly fibrinogenu aktivovaným trombinem vzniká fibrin, který polymeruje a vytváří fibrinovou síť. Velmi důležitou roli hraje také v primární

hemostáze, kde se aktivované krevní destičky váží přes povrchový receptor GPIIb-IIIa na fibrinogen. Oxid dusnatý reaguje s thioley bílkovin, např. albuminu, za vzniku S-nitrosoderivátů s vazodilatačními účinky. Klíčovým nízkomolekulárním S-nitrosothiolem je S-nitrosoglutathion (GSNO), který výměnnou reakcí nitrosyluje volné SH skupiny bílkovin. GSNO má významnou roli v buněčné signalizaci, imunitní odpovědi organismu a je mediátorem odpovědi organismu na stres. V literatuře je uváděn vliv GSNO na některé vlastnosti Fbg i na chování destiček.

Metodika: V této práci byl sledován vliv GSNO na vlastnosti fibrinogenu. GSNO byl připraven reakcí GSH v prostředí HCl s NaNO₂. Kinetika vzniku fibrinové sítě působením trombinu na fibrinogen, modifikovaný i nativní, byla sledována pomocí zákalových křivek. Pomocí HPLC byla sledována kinetika odštěpování fibrinopeptidů trombinem. Dále byla sledována schopnost krevních destiček vázat se na modifikovaný a kontrolní fibrinogen během statických i dynamických podmínek. Ke sledování modifikace jednotlivých řetězců Fbg byla využita SDS-PAGE s následnou imunochemickou detekcí.

Výsledky: Bylo zjištěno, že GSNO ovlivňuje vlastnosti fibrinogenu. Na modifikovaný fibrinogen se krevní destičky adherují více než na nativní. Naopak přítomnost GSNO v roztoku výrazně tlumí adhezi krevních destiček na nativní fibrinogen. Uvedená data ukazují na možnost, že GSNO významně pozměňuje vlastnosti fibrinogenu, a tím jeho roli v primární hemostáze.

Tato práce vznikla za podpory grantu VZ ÚHK MZ 00002373601.

P18 – 1237

Platelet-endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1/CD31) is upregulated during growth of mantle cell lymphoma cell line JEKO-1 in immunodeficient mouse

J. Molinský, S. Leahomschi, M. Hůlová, T. Šimonová, R. Pytlík, M. Trněný, T. Soukup, J. Mokřý, E. Nečas, J. Živný, P. Klener

Ústav patologické fyziologie 1. lékařské fakulty UK Praha; I. interní klinika 1. lékařské fakulty UK a VFN Praha; Ústav histologie a embryologie Lékařské fakulty UK Hradec Králové

Background: The significance of angiogenesis is well established in solid tumors. Alternative mechanisms such as vasculogenic mimicry and vessel cooption were described to provide oxygen supply. The contribution of these processes and their molecular mechanisms in hematologic malignancies remains to be elucidated.

Aims: To analyse expression profile of angiogenesis-related genes in human mantle cell lymphoma cell line JEKO-1

growing in vivo in comparison to the JEKO-1 cell line cultured in vitro.

Methods: We injected 5 millions of JEKO-1 cells subcutaneously into sublethally irradiated NOD/LtSz-Rag1null mice (n = 4). Animals were killed when the tumors reached 2 cm in diameter and total RNA was isolated from the tumors. After reverse transcription, real time PCR analysis of gene expression was performed by using low density arrays (human angiogenesis panel). The results were normalized to GAPDH expression and expression of in vitro growing JEKO-1 cells was used as calibrator.

Results: The most upregulated gene in all JEKO-1 tumors compared to in vitro growing JEKO-1 cells was platelet-endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1; 25–40 – fold increase). Other upregulated genes included brain-specific angiogenesis inhibitor 1, fibulin 5, vascular endothelial growth factor receptor 1, angiogenin, connective tissue growth factor, hepatocyte growth factor and lymphangiogenic markers prospero-related homeobox 1 and CD44. Proangiogenic vascular endothelial growth factor (VEGF) and midkine were downregulated and expression of VEGFB didn't change. No expression of VEGFC, angiopoietin-1, angiopoietin-2 was detected as well as expression of receptors TIE-1, VEGFR-2, VEGFR-3 and fms-related tyrosine kinase 3.

Summary: Our results revealed significant changes in gene expression of angiogenesis-related genes in JEKO-1 mantle cell lymphoma cell line after xenotransplantation into immunodeficient mice. The results suggest that regulation of angiogenesis by lymphoma cells might represent an important factor impacting growth and propagation of mantle cell lymphomas.

Research support: IGAMZ 8317-4, MSM0021620806, MSM0021620808, LC 06044, 1M6837805001, and GAUK 50/2004/c.

P19 – 1233

Expres vybraných microRNA u hematopoetických buněk

M. Merkerová, H. Bruchová, M. Belíčková

Ústav hematologie a krevní transfuze Praha

Molekuly microRNA (miRNA), které jsou součástí RNA interferenčního procesu, hrají klíčové úlohy v mnoha buněčných procesech. Několik studií ukázalo také na existenci hematopoeticky-specifických miRNA, které jsou pravděpodobně nezbytné pro diferenciaci a správnou funkci různých typů krevních buněk. Na základě našich předchozích studií jsme vytipovali 13 miRNA, jejichž funkce by mohla být spjata s hematopoézou (miR-15b, miR-16, miR-24, miR-30c, miR-106b, miR-142-3p, miR-142-5p, miR-150, miR-155, miR-181, miR-223, miR-342, and

miR-451). Relativní hladinu exprese těchto miRNA jsme měřili metodou kvantitativního RT-PCR v reálném čase u frakcí hematopoetických buněk (retikulocyty, trombocyty, granulocyty, monocyty, T- a B-lymfocyty) separovaných z periferní krve 10 zdravých dárců. Každá z testovaných buněčných linií vykazovala odlišný expresní profil a u každé byly predominantně transkribované jiné miRNA. Např. u retikulocytů byla prokázána vysoká exprese genů pro miR-16 a miR-451; miR-223 měla vysokou hladinu transkriptu v trombocytech a granulocytech; miR-16, miR-142-3p a miR-150 v B-lymfocytech; miR-142-3p a miR-150 v T-lymfocytech a miR-223 v monocytech. Provedená klastrovací analýza prokázala, že jednotlivé vzorky buněk lze správně zařadit k danému buněčnému typu, a to pouze na základě hladin exprese testovaných miRNA. Klastrování nám také umožnilo vybrat miRNA s odlišnou/podobnou expresí u různých buněčných typů: specifický expresní profil odlišný od ostatních miRNA vykazovala miR-150, naopak podobnou hladinu transkriptu měly miRNA ve skupině skládající se z miR-15b, miR-16, miR30c a miR106b, dále obě formy miR-142 byly exprimovány podobně. Znalost míry exprese hematopoeticky-specifických miRNA v širokém spektru vývojových řad krevních buněk nám v budoucnu umožňuje zaměřit naši pozornost na konkrétní miRNA a např. pomocí „loss-/gain-of function“ experimentů pochopit funkci tohoto dosud ne plně prozkoumaného mechanismu regulace genové exprese.

Podpořeno grantem IGA MZ ČR: NR9236-3/2007.

P20 – 1231

Změny proteomu lidských krevních destiček při jejich aktivaci

P. Májek, A. Sobotková, K. Pimková, R. Balounová, J. Suttner, J. E. Dyr

Ústav hematologie a krevní transfuze Praha; VŠCHT Praha

Úvod: Aktivace krevních destiček je složitý proces, ve kterém se uplatňuje celá řada zpětných vazeb zesilujících či zeslabujících původní aktivační podnět. Jako regulační molekuly se uplatňují i reaktivní formy dusíku a kyslíku, které mohou reagovat s celou řadou bílkovin, jejichž modifikace lze sledovat různými proteomickými technikami. Kromě jiného dochází během procesu aktivace destiček k fosforylaci, k oxidaci a redukci cysteinových zbytků v bílkovinách. Cílem práce bylo pomocí elektroforetických technik nalézt některé z bílkovin modifikovaných v průběhu aktivace destiček různými agonisty a vypracovat vhodné metody pro izolaci subproteomu fosforylovaných bílkovin a subproteomu bílkovin s obsahem S-nitrosocysteinu.

Metodika: Promyté krevní destičky zdravých dárců byly aktivovány kolagenem, trombinem a kyselinou arachido-

novou. Aktivace krevních destiček byla sledována agregometricky. Destičkové bílkoviny proteomu byly rozděleny pomocí 2D-PAGE a modifikované bílkoviny byly detekovány pomocí imunoblotu. Modifikované bílkoviny z jednotlivých zón byly hydrolyzovány trypsinem. Vzniklé peptidy byly identifikovány hmotnostní spektrometrií na principu MALDI-TOF. Pro izolaci fosforylovaného subproteomu byla vypracována modifikace fosforamidové metody, jednak za použití alkylaminového derivátu porézních skleněných kuliček s kontrolovanou porositou (NH₂-GPG, Millipore), a dále za použití maleimidového derivátu NH₂-CPG který jsme připravili.

Výsledky: Zjistili jsme, že oba deriváty CPG zachycovaly fosforylovaný fibrinopeptid A jako modelový fosfopeptid. Rovněž celkový tryptický lyzát destiček byl na tomto materiálu obohacen o fosforylované peptidy.

Závěr: Zjistili jsme, že během aktivace kolagenem, trombinem a kyselinou arachidonovou dochází ke karboxylaci glykoproteinu IIb, gelsolinu a vinkulinu, který je během aktivace trombinem také fosforylován. Vinkulin spolu s dalšími bílkoviny cytoskeletu spolupracuje na změně konformace glykoproteinu IIb-IIIa na jeho aktivovanou formu. Na základě zjištěných výsledků předpokládáme, že nalezené modifikace těchto proteinů jsou signálem pro reorganizaci cytoskeletu během destičkové aktivace.

Tato práce byla podpořena grantem AVČR KAN200670701.

P21 – 1227

Vliv resveratrolu na agregaci a adhezi krevních destiček

A. Sobotková, J. Štikarová, P. Májek, B. Veselá, J. Suttner, J. E. Dyr

Ústav hematologie a krevní transfuze Praha

Úvod: Resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) je přírodní látka, která se vyskytuje v mnoha plodinách běžné denní konzumace. Hlavním zdrojem resveratrolu je hroznové víno a nezanedbatelné množství se nachází i v červeném víně. Mnoho studií demonstrovalo biologické vlastnosti resveratrolu, konkrétně protizánětlivý, antioxidační, protinádorový a antideštičkový efekt.

Metodika: V této práci byl sledován vliv různých koncentrací resveratrolu na destičkovou agregaci a statickou, resp. dynamickou adhezi. Krevní destičky byly izolovány z krve zdravých dárců, kteří minimálně 14 dní před odběrem neužívali žádné antitrombotické léky. V tyrodovém pufru promyté krevní destičky byly inkubovány s různými koncentracemi resveratrolu (0,075–0,6 mM, 30 min, 37 °C). Agregací odezva byla měřena turbidimetrickou metodou po aktivaci kolagenem, trombinem a kyselinou arachidonovou. Adheze krevních destiček za statických podmínek byla stanovena měřením aktivity kyselých fosfatázy.

Dynamická adheze byla sledována s využitím přístroje Cone and Plate(let) Analyzer.

Výsledky: Zjistili jsme, že se vzrůstající koncentrací resveratrolu dochází k inhibici agregace krevních destiček na minimum. Stejný průběh jsme naměřili i u statické a dynamické adheze.

Závěr: Naměřená data ukazují, že resveratrol je důležitou látkou zodpovědnou za redukci některých funkcí krevních destiček. Předpokládáme, že jeden z faktorů, který ovlivňuje inhibici agregace a adheze, je vliv resveratrolu na tvorbu hydroxylového radikálu, který hraje důležitou roli v aktivacích kaskádách jako tzv. „druhý posel“.

Tato práce vznikla za podpory grantu AVČR KAN200670701.

P22 – 1222

Fibrinogen Praha IV: vrozená dysfibrinogenemie s heterozygotní mutací α 16 Arg – His

Z. Reicheltová, R. Kotlín, P. Májek, J. Suttnar, T. Riedel, J. E. Dyr

Ústav hematologie a krevní transfuze Praha

Dysfibrinogenemie je onemocnění způsobené mutací v některém z genů kódujících jednotlivé řetězce fibrinogenu, což vede ke změně struktury a funkce fibrinogenu. Koagulační vyšetření byla provedena na koagulačním analyzátoru STA-R (Diagnostica Stago, Francie). Fibrinogen byl izolován vysrážením 25% síranem amonným. Řetězce fibrinogenu byly elektroforeticky rozděleny pomocí SDS-PAGE (7,5% gel). Polymerace fibrinu byla měřena turbidimetricky při 340 nm. Po rozpuštění klotu v 5M močovíně byla klotabilita stanovena spektrofotometricky při 280 nm. Odštěpování fibrinopeptidů iniciované trombinem bylo zastaveno kyselinou trichloroctovou v různých časových intervalech a následně byly fibrinopeptidy detekovány pomocí HPLC. Skenovací elektronová mikroskopie fibrinové sítě byla provedena pomocí elektronového mikroskopu Vega Plus TS 5135 (Tescan, ČR). DNA analýza byla provedena dideoxysekvenci metodou genetickým analyzátozem CEQ 8000 (Beckman Coulter, USA). Koagulační vyšetření 41leté pacientky odhalila prodloužený aPTT (49,7 s), trombinový čas (38,5 s) a mírně prodloužený protrombinový čas (16,9 s). Hladina fibrinogenu stanovená dle Clauss byla snížena (1,28 g/l), imunoturbidimetricky změřená hladina fibrinogenu byla ve fyziologických mezích (3,8 g/l). V elektroforetické pohyblivosti jednotlivých řetězců nebyly nalezeny žádné abnormality. Stanovená klotabilita byla 32,7%. Polymerace fibrinogenu byla snížena. Množství odštěpeného fibrinopeptidu B nebylo sníženo, zatímco množství odštěpeného fibrinopeptidu A bylo zhruba poloviční. Při genetickém vyšetření byla nalezena heterozygotní bodová mutace v α ; ře-

tězci 16 Arg > His (nejčastěji se vyskytující typ záměny). Tato mutace se nachází v místě, kde trombin odštěpuje fibrinopeptid A. Proto má tato záměna vliv na vznik fibrinu a na následný vznik fibrinové sítě. Odštěpování fibrinopeptidu A může i přes mutaci probíhat, ale výrazně pomaleji. U 23leté dcery pacientky byla nalezena stejná mutace. U 19leté dcery nebyla tato mutace nalezena. *Tato práce vznikla díky finanční podpoře MZ č. 2373601.*

P23 – 1220

Proteomická analýza solubilních proteinů důležitých u dětské leukemie

M. Kováč, V. Pelková, M. Vášková, D. Petráčková, J. Novotná

Klinika dětské hematologie a onkologie 2. lékařské fakulty UK a FN Motol Praha; CLIP (Childhood leukemia investigation Prague); Mikrobiologický ústav AV ČR Praha

Úvod: Leukemická buňka zásadně ovlivňuje pacienta, což vede ke známým klinickým a laboratorním projevům. Na druhou stranu jsou leukemické buňky samy závislé na hostiteli, takže u významné části pacientů s ALL buňky bezprostředně po převedení do podmínek in vitro podléhají apoptóze a nekróze. Konkrétní faktory zodpovědné za tyto interakce nejsou dosud objasněny.

Cílem tohoto začínajícího projektu je vyhledávání proteinů rozdílně zastoupených v kostní plazmě dětí při diagnóze ALL a kontrolní skupiny pomocí dvou proteomických technik 2D ELFO a proteinové array.

Metodika: Proteinový čip (proteinová array) funguje na principu enzymové imunanalýzy (ELISA) a stanovuje expresi více proteinů ve vzorku na jedné membráně. V 1. fázi projektu jsme pomocí proteinových čipů testovali expresi 23 a v další fázi expresi 79 proteinů. Dosud jsme vyšetřili 75 ALL vzorků a 35 vzorků bez infiltrace. V 1. fázi jsme chtěli zjistit globální změny, které nejsou ovlivněny rozdíly mezi pacienty, a proto každý vzorek vznikl smícháním 5 primárních vzorků kostní plazmy. V další části pokračujeme testováním jednotlivých vzorků. Separační metoda 2D ELFO, jejíž použití pro detekci proteinů v kostní plazmě optimalizujeme, nám umožní komplexní srovnání exprese solubilních proteinů v kostní plazmě.

Výsledky: Proteinovými čipy jsme dosud odhalili rozdílnou expresi 4 proteinů. V kostní plazmě dětí s ALL jsme pozorovali signifikantně zvýšenou expresi IL-15, MCP-1, NT-4 a sníženou expresi leptinu (v porovnání s kontrolní skupinou, $p < 0,05$). Další předběžná data jsme získali z proteinových čipů základních genotypových skupin dětské ALL (TEL/AML+, hyperdiploidní a bez fúzního genu). Depletovali jsme vysokomolekulární proteiny (albumin, imunoglobuliny apod.) z kostní plazmy, a tím učinili další potřebný krok v optimalizaci 2D ELFO.

Závěr: Bližší poznání mikroprostředí kostní dřeně na proteinové úrovni může přispět k poznání patogeneze onemocnění a molekul s případným terapeutickým potenciálem. *Práce byla podpořena VZMSMTMSM0021620813, IGA MZCR NR/9531-3, GAUK 7543/2007.*

P24 – 1219

Fibrin Networks as a Scaffold for Endothelial Cells

T. Riedel, E. Brynda, E. Filová, L. Bačáková, J. E. Dyr

Ústav hematologie a krevní transfuze Praha; Institut makromolekulární chemie AV ČR, v.v.i., Praha; Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i., Praha

Introduction: Immediately after the contact of a synthetic material with blood, plasma proteins adsorb onto its surface. The adsorption induces subsequent biological events, which can make troubles in the material applications. One of the most serious is the initiation of coagulation cascade. Of the numerous proteins present in plasma, fibrinogen seems to play key role in these events due to its relative abundance in plasma, and its ability to form fibrin clot and to promote platelet adhesion and activation. Fibrin networks serve as a temporary extracellular matrix and promote wound healing. Cells migrating to the site of fibrin network use fibrin clot as a specific support at which they can attach and proliferate. Subsequently fibrin clot is degraded and the cells produce new extracellular matrix. We developed a novel technique of fibrin network formation based on the catalytic effect of fibrin-bound thrombin and on the nature of thrombin inhibitors.

Methods: Three-dimensional surface fibrin networks were prepared on the substrate surface by catalytic action of fibrin-bound thrombin on an ambient fibrinogen solution without formation of a bulk fibrin gel in the solution. The gel morphology depended on the concentration of fibrinogen molecules in the initial adsorbed monolayer. Different combinations of thrombin inhibitors lead to various thicknesses and morphology of the fibrin gels. The average thickness of dried fibrin network produced by catalytic action of thrombin bound to adsorbed fibrinogen/fibrin monolayer on ambient fibrinogen solution containing ATIII and heparin was 13 nm. The average thickness of fibrin network produced by catalytic action of surface bound thrombin was 40 nm if the ambient fibrinogen solution contained only ATIII.

Results: Coating substrate with surface fibrin network supported growth of vascular endothelial cells on the surface. Potential application of the technique for coating inner surface of porous scaffolds without filling pores with a bulk fibrin gel was checked.

This work was supported by the Academy of Sciences of the Czech Republic under contract KAN200670701.

P25 – 1218

Identifikace mutací v ribozomálním proteinu L5 a ribozomálním proteinu L11 u pacientů s Diamondovou-Blackfanovou anémií

R. Čmejla, H. Handrková, K. Petrtylová, J. Čmejlová, D. Pospíšilová

Ústav hematologie a krevní transfuze Praha; FN Motol Praha; Lékařská fakulta UP a FN Olomouc

Diamondova-Blackfanova anémie (DBA) je vzácné vrozené onemocnění projevující se jako normochromní makrocytární anémie s normocelulární kostní dření se selektivním deficitem erytroidních prekurzorů. U 40 % pacientů bývají přítomné také nejrůznější fyzické anomálie. Hlavní příčinou DBA je velmi pravděpodobně nedostatečná translace, která je důsledkem mutací v proteinech účastnících se procesu translace. Doposud byly popsány mutace v genech pro ribozomální proteiny malé ribozomální podjednotky (RPS17, RPS19 a RPS24) a nejnověji i velké ribozomální podjednotky (RPL5, RPL11 a RPL35a). Zde popisujeme identifikaci mutací v RPL5 a RPL11 u pacientů z českého registru DBA. Heterozygotní mutace v genu pro RPL5 byly nalezeny u 3/26 pacientů (11,5 %) a jednalo se o 2 bodové mutace a 1 jednonukleotidovou inzerci. První bodová mutace se nachází v akceptorovém místě intronu 2 a narušuje správný sestřih mRNA. Druhá bodová mutace se nachází v exonu 8 v kodonu 285 a vede k záměně aminokyseliny alanin za valin. Inzerce nukleotidu T byla identifikována v exonu 3 a vede k posunu čtecího rámce. Ani jedna z těchto mutací však nebyla identifikována na mRNA úrovni, což naznačuje, že mutované mRNA jsou nestabilní a jsou rychle degradovány a buňky pacientů jsou tak haploinsuficientní v produkci RPL5. Heterozygotní mutace v genu pro RPL11 byly nalezeny u 2/26 pacientů (7,7 %) a jednalo se o 2 bodové mutace. První bodová mutace se nachází v exonu 2 v kodonu 20 a vede k záměně aminokyseliny leucin za histidin. Tato mutace byla detekována i na mRNA úrovni. Druhá bodová mutace nalezená v exonu 4 v kodonu 119 vede k vytvoření stop-kodonu. Expresé této mutované alely nebyla na mRNA úrovni potvrzena. Mutace v RPS19, RPL5 a RPL11 se vyskytují u téměř 50 % pacientů s DBA a jejich včasná identifikace tak může vést k rychlé diagnostice tohoto onemocnění a zahájení specifické léčby. Navíc je identifikace těchto nových mutací zásadní nejen pro pochopení patofyziologie tohoto onemocnění, ale procesu erytropoézy jako takové, kde, jak se zdá, bude biogeneze ribozomů a úroveň translace hrát významnou úlohu.

Podporováno VZ MZ ČR 00023736; GAUK 25792892807; MSM 6198959205 MŠ ČR.

P26 – 1230

Komplexní změny karyotypu u pacientů s mnohočetným myelomem (MM)**J. Tajtlová, Z. Zemanová, J. Březinová, L. Babická, L. Pavlišťová, I. Špička, E. Gregora, J. Čermák, R. Zounar, K. Michalová***Centrum nádorové cytogenetiky Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. lékařské fakulty UK a VFN Praha; Cytogenetická laboratoř Ústavu hematologie a krevní transfuze Praha; I. interní klinika 1. lékařské fakulty UK a VFN Praha; Oddělení klinické hematologie FN Královské Vinohrady Praha; Ústav hematologie a krevní transfuze Praha*

Úvod: U nemocných s MM byla popsána řada klonálních chromozomových aberací. Genetické změny vznikají v plazmocyttech a k jejich detekci se používá cílená molekulárně cytogenetická analýza separovaných nebo značených plazmatických buněk. Možnosti konvenčního cytogenetického vyšetření jsou u MM limitované. Vzhledem k často nízké infiltraci plazmocytů v kostní dřeni umožňuje tato metoda zjistit patologický nález pouze u 20–40 % nemocných. Setkáváme se s početnými i strukturními odchylkami a často se složitými komplexními aberacemi. Jejich nález při klasickém cytogenetickém vyšetření je obvykle spojen s pokročilými stadii a/nebo progresí onemocnění.

Metodika: V letech 2004–2007 jsme vyšetřili 183 pacientů s MM konvenční cytogenetickou analýzou a metodou I-FISH kombinovanou s imunofluorescenčním značením plazmatických buněk (clg-FISH) se zaměřením na detekci nejčastějších genetických aberací (tj. delece/monosomie chromozomu 13, přestaveb IgH genu, zisku chromozomového materiálu v oblasti 1q21 a delece genu p53). Při klasické cytogenetické analýze jsme u 25 ze 183 nemocných (13,6 %) prokázali přítomnost komplexních chromozomových změn. U 13 z těchto pacientů, u kterých byl k dispozici archivovaný materiál, jsme dále pokračovali v podrobné analýze komplexních karyotypů metodami mFISH/mBAND (MetaSystems™). Hledali jsme případné opakující se aberace a zjišťovali, které chromozomy a/nebo chromozomové oblasti častěji vstupují do komplexních přestaveb.

Výsledky: Ve studovaném souboru jsme nezjistili žádnou rekurentní chromozomovou aberaci. U 10 pacientů jsme potvrdili nenáhodnost přestaveb chromozomů 1, 6 a 14. Dále byly do strukturních aberací často zahrnuty i chromozomy 5, 7, 8, 11, 15, 16, 17 a 18 (7–9krát). V 11 případech byly komplexní karyotypy detekovány při úvodním cytogenetickém vyšetření, u 2 nemocných se objevily v důsledku klonálního vývoje při progresi onemocnění. Ve sledované skupině měli nemocní s komplexními aberacemi při diagnóze signifikantně kratší dobu přežití do události než pacienti s normálním karyotypem (16 vs 24 měsíců).

Podrobné výsledky clg-FISH a mFISH/mBAND analýz budou prezentovány na posteru.

Práce byla podpořena granty MSM 0021620808, MZO 00064165 a LC 535

P27 – 1201

Změny sérových hladin vybraných biologických ukazatelů po autologní transplantaci u nemocných s mnohočetným myelomem**T. Pika, J. Minařík, M. Budíková, M. Zemanová, J. Bačovský, V. Ščudla***III. interní klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc; Oddělení klinické biochemie FN Olomouc*

Úvod: Mnohočetný myelom (MM) je zhoubné hematologické onemocnění charakterizované proliferací a akumulací neoplastických plazmocytů, produkcí monoklonálního imunoglobulinu a orgánovým postižením. Některé méně obvyklé biochemické parametry se jeví slibné, jako možné budoucí ukazatele nejen maligní transformace monoklonální gamapatie nejistého významu v MM, ale také jako ukazatele pokročilosti, progresu a léčebné odezvy u MM.

Cíl: Cílem studie je srovnání sérových hladin 12 vybraných ukazatelů vyšetřených v době diagnózy nemoci a následně po vysocedávkované terapii s transplantací autologních kmenových buněk (ASCT).

Metody: Do studie bylo zařazeno 29 nemocných s MM, kteří byli léčeni indukčním režimem VAD s následnou ASCT. Léčebné odpovědi byly hodnoceny dle EBMT kritérií. CR a VGPR odpovědi byly u 15 (52 %), PR u 12 (42 %) a 2 nemocní měli stabilní onemocnění. Sledované parametry byly vyšetřeny v době diagnózy a následně 100 dní po ASCT. Pro stanovení hladin analyzovaných ukazatelů byly použity tyto metody: REA (TK), RIA (β -2-mikroglobulin – β 2m), ICTP, PINP, enzymoimunoeseje (sIL-6R, sVCAM, sICAM-1, sOPG) a kvantitativní enzymatické imunoeseje (sHGF, sVEGF, Syndecan-1/CD138 a sFas). Pro statistické vyhodnocení bylo použito Wilcoxonova testu.

Výsledky: V celé skupině nemocných (CR + VGPR + PR) byly po ASCT nalezeny statisticky nižší hladiny β 2m ($p = 0,0001$) a sHGF ($p = 0,0003$), rozdílly byly významnější ve skupině CR+VGPR (β 2m, $p = 0,001$, sHGF, $p = 0,005$) nežli ve skupině PR (β 2m, $p = 0,016$, sHGF, $p = 0,033$). V celé skupině (CR + VGPR + PR) byly po ASCT zjištěny vyšší hladiny sICAM-1 ($p = 0,026$), sVCAM ($p = 0,007$), ICTP ($p = 0,001$), PINP ($p = 0,001$) a sFas ($p = 0,00003$). Rozdílly byly významnější ve skupině CR + VGPR (sVCAM, $p = 0,005$, ICTP, $p = 0,002$, PINP, $p = 0,009$, sFas, $p = 0,001$) než ve skupině PR (PINP, $p = 0,028$, sFas, $p = 0,005$).

Souhrn: Vysocedávkovaná terapie s ASCT je spojena se změnou cytokinové sítě MM. Pokles β 2m po úspěšné léčbě byl dokumentován mnoha studiemi. Pokles sérových hladin sHGF po léčbě ukázal, že se tento parametr jeví jako

možný slibný ukazatel hodnocení léčebné odpovědi u MM. Po proběhlé ASCT byl zaznamenán vyšší kostní obrat. S podporou IGA MZ ČR NR/9500-3.

P28 – 1197

Cytogenetické vyšetření u pacientů s B-CLL metodou kultivace buněk se stimulací CpG oligonukleotidy

J. Sobotka, M. Brejcha, J. Indráková, V. Holubová, P. Petrová, A. Tovaryšová, B. Dřevojánková, M. Stoklasová, M. Kučerová, M. Radina

Onkologické centrum J. G. Mendela Nový Jičín

Chromozómové aberace jsou významným prognostickým faktorem u B-CLL. Klasické cytogenetické vyšetření z buněk periferní krve nebo kostní dřeně je málo výtěžné z důvodu nízké mitotické aktivity většiny CLL buněk, indukované mitózy jsou ve většině případů derivované z normálních hematopoetických buněk, jejich kvalita je špatná. Ani použití B-buněčných mitogenů (např. TPA, PWM) podstatně nezlepší cytogenetické vyšetření. Klonální chromozómové aberace jsou detekované jenom asi u 30–40 % pacientů, zatímco metodou I-FISH s použitím setu DNA sond na detekci známých prognostických aberací (13q-, 11q-, 17p-, +12, přestavba IgH genu) jsou chromozómové aberace detekované až u 80 % pacientů. Dicker et al (2006) použili pro cytogenetickou analýzu u pacientů s B-CLL stimulace B-buněk pomocí CpG oligonukleotidů a IL-2. Úspěšnost vyšetření (dostatek hodnotitelných mitóz dobré kvality) byla dosažena až u 95 % případů, chromozómové aberace byly identifikovány u 83 % pacientů. Cytogenetická analýza identifikovala skupinu pacientů s vyváženými a nevyváženými translokacemi a komplexními změnami s významnou korelací s nemutovaným IgVH a expresí CD38. Klasické cytogenetické vyšetření tak může definovat podskupinu pacientů s B-CLL s vysokým rizikem progresu onemocnění. Zavedli a použili jsme metodu kultivace buněk se stimulací CpG oligonukleotidy a IL-2 (Dicker et al 2006). Provedli jsme klasickou cytogenetickou analýzu u neselektované skupiny 60 pacientů s B-CLL. Prezentujeme úspěšnost cytogenetického vyšetření s ohledem na počet a kvalitu získaných metafází, záchyt chromozómových aberací a jejich porovnání s výsledky I-FISH analýzy, pacienty jsme rozdělili do skupin podle chromozómových aberací detekovaných cytogenetickou analýzou a I-FISH, uvádíme příklady zajímavých cytogenetických nálezů. Metoda kultivace buněk se stimulací CpG oligonukleotidy u pacientů s B-CLL zvyšuje výtěžnost klasického cytogenetického vyšetření. U většiny kultivací bylo získáno více hodnotitelných mitóz, lepší kvality. Detekce aberací pomocí FISH na získaných mitózách potvrzují, že část mitóz je derivovaná z patologických B-buněk, a podstatně se tak zvyšuje záchyt chromozómových aberací.

P29 – 1192

Rezistence na kyselinu acetylsalicylovou u hemodialyzovaných pacientů

M. Šimkovič, J. Malý, I. Fátorová, S. Dusilová Sulková
Oddělení klinické hematologie II. interní kliniky Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové; Klinika gerontologická a metabolická Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové

Úvod: U nemocných v pravidelném dialyzačním programu existuje vysoké riziko vzniku kardiovaskulárních chorob. Kyselina acetylsalicylová je nejčastěji používaným lékem v primární i sekundární prevenci těchto onemocnění. Velmi diskutovaným problémem je rezistence na kyselinu acetylsalicylovou (ASA), kdy pravidelné podávání ASA nevede k zabránění produkce tromboxanu A2 trombocyty. Cílem naší práce bylo posouzení destičkových funkcí u pacientů v pravidelném dialyzačním programu, kteří užívali ASA.

Metodika: Vyšetřili jsme 49 pacientů (věkový medián 72 let, rozmezí 37–86 let, 25 mužů) v pravidelném dialyzačním programu, kteří užívali dlouhodobě kyselinu acetylsalicylovou (100 mg denně). Bylo použito vyšetření analyzátozem Dade Behring PFA-100 (Marburg, Německo), který umožňuje vyšetřit primární hemostázu z nesrážlivé krve. Dále jsme sledovali antiagregační léčbu ASA pomocí agregační odpovědi na přidání kationického propylgalátu sodného (CPG). Odběr krve ke stanovení destičkových funkcí byl proveden před zahájením hemodialýzy.

Výsledky: Prevalence rezistence na kyselinu acetylsalicylovou při dávce 100 mg byla přítomna po CPG u 18,4 % a při použití PFA-100 u 18,4 % pacientů.

Závěr: O výskytu rezistence na kyselinu acetylsalicylovou v populaci hemodialyzovaných máme velmi málo poznatků. Přestože jsme měli možnost vyšetřit pouze malý soubor nemocných, zdá se, že je rezistence na ASA stejně častá jako u nedialyzovaných s kardiovaskulárními chorobami.

Práce vznikla za podpory Výzkumného záměru FNHK MZO 00179906, Lékařské fakulty v Hradci Králové a firmy Roche.

P30 – 1187

Prekurzorový T-lymfoblastický lymfom u nemocné po úspěšné léčbě akutní promyelocytární leukemie

T. Szotkowski, J. Hubáček, A. Hluší, T. Papajík, Z. Pikalová, L. Kučerová, M. Budíková, E. Buriánková, N. Klusová, R. Szotkowská, E. Faber, K. Indrák
Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc; Ústav patologie Lékařské fakulty UP a FN Olomouc; Klinika nukleární medicíny Lékařské fakulty UP a FN Olomouc

Cíl: Popis vzácného a závažného pozdního nežádoucího účinku chemoterapie u nemocné úspěšně léčené pro akutní promyelocytární leukemii.

Úvod: Akutní promyelocytární leukemie (APL) je relativně vzácný subtyp akutní myeloidní leukemie. Po zařazení all-transretinové kyseliny (ATRA) do léčby se stala nejlépe léčitelným typem akutní leukemie dospělých. I přes vysokou účinnost tohoto léku je nutné jej kombinovat s chemoterapií, protože bez ní choroba prakticky u všech nemocných relabuje. Podání chemoterapie je však téměř nevyhnutelně spojeno s mnoha komplikacemi, mezi které patří i sekundární malignity. T-lymfoblastický lymfom (T-LBL) je vzácné onemocnění, patřící do skupiny vysoce agresivních lymfomů.

Popis případu: Autoři popisují případ 25leté ženy léčené pro APL v roce 2002, u které byl o pět let později diagnostikován prekurzorový T-LBL.

Závěr: U nemocných v dlouhodobé molekulárně-genetické remisi APL bylo popsáno několik případů sekundární akutní lymfoblastické leukemie, zatím zřejmě žádný případ T-LBL. Výskyt sekundárních malignit je diskutováním tématem nejen u nemocných po léčbě APL. U nich však může být více patrný díky efektivní léčbě APL a dlouhodobému přežití nemocných. Lépe cílená a podle prognostických faktorů na míru „ušitá“ léčba dovolující redukci či úplné vynechání cytostatik by znamenala další pokrok v péči o naše nemocné.

P31 – 1184

Amplifikácia MLL génu u pacienta s akútnou myeloidnou leukémiou (AML)

S. Izáková, J. Březinová, Z. Zemanová, L. Babická, J. Maaloufová, K. Michalová

Ústav hematologie a krevní transfúze Praha; Centrum nádorové cytogenetiky Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. lékařské fakulty UK a VFN Praha

Chromozómové aberácie zahŕňajúce oblasť 11q23, kde je lokalizovaný gén MLL, sa vyskytujú u chorých s akútnymi leukémiami lymfatickej aj myeloidnej rady, myelodysplastického syndrómu a maligných lymfómov. Nález chromozómových prestavieb zahŕňajúcich MLL gén je vždy spájaný s veľmi zlou prognózou a je považovaný za dôležitý prognostický faktor. MLL gén môže vstupovať do rôznych štruktúrnych prestavieb. Najčastejšie sa jedná o translokácie s rôznymi partnerskými chromozómami, môže dochádzať aj k deléciám. Genové amplifikácie sa u hematologických malignít vyskytujú vzácnejšie (u AML jen asi u 1 % chorých), sú častým nálezom prevažne u solidných nádorov. Pravdepodobne hrajú významnú úlohu pri progresii a v pokročilých štádiách ochorenia. Vyšetřili sme kostnú dreň (KD) 28ročného pacienta s AML podtypom M2. išlo o prvozáchyt s leukopéniou a rozvíjajúcou sa diseminovanou intravaskulárnou koagulopatiou. Hodnoty WBC v periférnom KO pri prijme dosahovali $0,73 \times 10^9/l$.

Diferenciálny rozpočet potvrdil 24 % blastov. Pri morfológickom vyšetření náterov KD nález odpovedal diagnóze AML M2 podľa FAB (AML s multilineárnou dyspláziou podľa WHO). Klasickou cytogenetickou analýzou sme dokázali hypodiploidiu (33–45, XY) a komplexné zmeny karyotypu s atypickým veľkým marker chromozómom. Chromozómové aberácie boli overené pomocou I-FISH (Abbott Vysis) a mFISH/mBAND (MetaSystems). Metódou I-FISH sme dokázali amplifikáciu MLL génu v 84 % interfáznych jadier, deléciu oblasti 5q31 v 88,5 % interfáznych jadier a monozómiu chromozómu 7 v 8 % interfáznych jadier. Výsledky mFISH potvrdili prítomnosť viacerých bunečných klonov s derivovaným chromozómom 11, sprevádzaným deléciou chromozómu 5, monozómiou chromozómov 12, 18, trizómiou chromozómu 21 a ďalšími komplexnými prestavbami, do ktorých boli zahrnuté chromozómy 1, 3, 17. Metódou mBAND sme bližšie určili amplifikované oblasti krátkych a dlhých ramien na derivovanom chromozóme 11. Podrobné výsledky molekulárnej cytogenetickej analýzy budeme prezentovať na posteru. Doba prežitia u tohto pacienta s vysoko rizikovou AML bola necelé dva mesiace od stanovenia diagnózy.

Práca bola podporená granty IGA MZČR NR9227-3, LC535, MZO 00064165 a MSM 0021620808.

P32 – 1173

Využití přístroje CliniMACS pro separaci monocytoidních buněk pro klinické aplikace

P. Vidláková, D. Očadlíková, D. Kyjovská, I. Burešová, J. Smejkalová, J. Štěrba, J. Michálek

Oddělení klinické hematologie – LEHABI FN Brno, pracoviště FDN JGM; Univerzitní centrum buněčné imunoterapie MU Brno; Klinika dětské onkologie Lékařské fakulty MU a FN Brno, pracoviště FDN JGM; I. dětská interní klinika Lékařské fakulty MU a FN Brno, pracoviště FDN JGM

Imunomagnetická separace (Magnetic antibody cell separation – MACS) je známá a často využívaná metoda pro separaci mnoha typů krevních buněk ze smíšené populace jak pro výzkumné účely, tak pro klinické aplikace. Terčové buňky jsou separovány účinkem magnetického pole po označení paramagnetickými kuličkami. CliniMACS je přístroj určený pro separaci lidských buněk z heterogenních populací krevních buněk pro klinické využití, např. pro následnou přípravu protinádorové vakcíny na bázi dendritických buněk kultivovaných in vitro z jejich CD14-pozitivních monocytárních prekurzorů. Jedná se o uzavřený a sterilní systém. Na našem pracovišti jsme zahájili používání přístroje CliniMACS v lednu roku 2008 za účelem separace monocytoidních CD14+ buněk z leukaferického produktu pro následnou kultivaci dendritických buněk a přípravu protinádorové vakcíny pro onkologické

pacienty. Principem metody je tzv. pozitivní separace CD14⁺ terčových buněk. Tyto buňky jsou označeny paramagnetickou kuličkou a zadrženy na koloně přístroje umístěné v magnetickém poli. Po odstranění účinků magnetického pole jsou označené buňky vymyty pufrem a dále kultivovány v médiu pro dendritické buňky. Provedli jsme první experimenty separace monocytoidních buněk z periferní krve pro optimalizaci přístroje. Poté jsme úspěšně provedli separaci z leukaferetického produktu, kdy z $8,52 \times 10^9$ leukocytů ve vstupním leukaferetickém produktu obsahujícím $0,68 \times 10^9$ monocytoidních buněk, bylo získáno 469×10^6 čistých CD14⁺ buněk. Došlo tedy k obohacení z původních 8,8 % před separací na 99,7 % CD14⁺ buněk po separaci. Další experimenty prokázaly obdobné výsledky při obohacení CD14⁺ frakce po imunomagnetické separaci. Separované CD14⁺ buňky ve vysoké čistotě jsou díky uzavřenému systému přístroje ClinMACS bez rizika možné kontaminace využitelné pro následné laboratorní a klinické aplikace.

Tato práce byla podpořena grantem MSMT LC 06027.

P33 – 1171

Aberantní CEACAM6 ovlivňuje integrin-ligand vazebné interakce na leukemických buňkách

V. Kanderová, O. Hrušák, T. Kalina

Klinika dětské hematologie a onkologie 2. lékařské fakulty UK a FN Motol Praha; CLIP – Cytometrie Praha

Úvod: CEACAM6, GPI-kotvená molekula z rodiny karci-noembryonálního antigenu (CEA), je časným znakem nádorové transformace GIT. V rámci hematopoetického systému je exprimována na granulocytech, kde se účastní homo/heterotypické adheze a Ca²⁺ mediované signalizace. Překvapivým jevem je však její exprese na buňkách B-prekurzorové ALL. Pozitivně koreluje s chromozomální přestavbou BCR-ABL a s hyperdiploidií a negativně s chromozomální přestavbou TEL-AML1.

Cílem naší studie je sledovat signalizaci mediovanou CEACAM6 na leukemických buňkách, zjistit její funkční přínos a možné zapojení v procesu leukemogeneze či rezistence k chemoterapii. Používáme model protilátkou mediovaneho prokřížení molekul CEACAM6 a kokultivaci leukemických blastů na podpůrné vrstvě stromálních buněk, která in vitro nahrazuje mikroprostředí kostní dřeně. Pomocí průtokové cytometrie kvantifikujeme povrchovou expresi integrinů, změny jejich afinity a avidity, fosforylační změny vybraných intracelulárních kináz a apoptózu a viabilitu CEACAM6⁺ leukemických blastů.

Výsledky: Prokřížení molekul CEACAM6 zvyšuje povrchovou expresi $\beta 1$ (CD49e) a $\beta 2$ (CD11a, CD11b, CD11c) integrinů (o 4 % a o 20, 25, 40 % resp., n = 5, p < 0,05).

Současně se zvyšuje i jejich afinita (vazba k ligandům VCAM-1 a ICAM-1 (o 47 %, resp 26 %, n = 3, p < 0,05) a k fibronektinu. Dále dochází ke zvýšení fosforylace důležité antiapoptotické intracelulární kinázy p44/42 MAPK (Erk1/2) – o 37 %, n = 5, p < 0,05. Prokřížení molekul CEACAM6 vyvolává apoptózu leukemických blastů. Pokud však blasty vystavíme vlivu imatinib mesylátu (specifického inhibitoru fúzního proteinu BCR-ABL) a kultivujeme je na stromatu, CEACAM6-mediovaná signalizace podpoří přežívání blastů (n = 3, p < 0,05), pravděpodobně zvýšením afinity vazby $\beta 1$ -integrin-ligand (VCAM-1 a fibronektin).

Závěry: Naše data ukazují, že je aberantní molekula CEACAM6 funkčně zapojena do komunikace ALL blastů s okolním mikroprostředím. Prokřížení molekul CEACAM6 zvyšuje povrchovou expresi a afinitu integrinů a aktivuje intracelulární signální molekulu p44/42 MAPK. Všemi těmito antiapoptotickými signály tak může CEACAM6 přispívat k malignímu chování ALL blastů.

Podpořeno granty GAUK 7539/2007, VZMŠMT 0021620813, GAČR 301/06/P162.

P34 – 1156

Mutace Runx1 a jejich předpokládaný vliv na funkci tohoto transkripčního faktoru u myelodysplastického syndromu a akutních leukemií

O. Fuchs, D. Provozníková, A. Kostečka, K. Benešová

Ústav hematologie a krevní transfuze Praha

Transkripční faktor Runx1 (dříve označovaný také AML1, CBFA2 a PEBP2 α B) je nezbytný pro hematopoézu a je v některých případech mutován u myelodysplastického syndromu (MDS) a akutních leukemií (především akutní myeloidní leukemie – AML). Důležitou oblastí tohoto transkripčního faktoru je konzervativní box runt, kterým se váže k DNA a který hraje i úlohu v protein-protein interakcích. Nejen homozygotní, ale i heterozygotní delece v boxu runt vede k trombocytopenii u myšího modelu i bez dalších faktorů důležitých pro vznik MDS (Putz G et al. Oncogene 2006; 25: 929–939). Runx1 dále obsahuje 2 transaktivační oblasti, které regulují transkripci cílových genů (geny pro GM-CSF, IL3, M-CSFR, G-CSFR, receptory T-lymfoidních buněk, Flt3, p21CIP1/WAF1, Bcl-2, STAT3, PU.1, c-myb, c-fos, myeloperoxidázu, granzym B a další). Izolovali jsme mononukleární buňky z kostní dřeně pacientů s AML (33 vzorků pacientů), MDS (76), CML (10) a ALL (1, původně označený jako susp. MDS). Sekvenovali jsme exony genu Runx1, jejichž PCR produkty jsme získali z genomové DNA z těchto vzorků za použití intro-

nových prumerů. Detekovali jsme 5 mutací heterozygotní povahy, z nichž 3 (všichni pacienti s MDS) zasáhly oblast runt [G138fsX147, I87fsX91, T151_R177del u varianty proteinu p48, GenBank databáze No. NM(NP)_001001890.1] a další dvě mutace (H2152fsX227 a Q256fsX284 u varianty proteinu p48) v oblasti transaktivačních oblastí (pacient s AML a pacient s ALL). První 3 mutace v boxu runt vedou ke ztrátě funkce transkripčního faktoru u mutovaného Runx1. Zatímco p48 varianta Runx1 má anti-apoptotické účinky (Gattenloehner S et al. Blood 2007; 110: 2027–2033), poslední 2 mutace také vedou ke ztrátě aktivity p48 Runx1 v diferenciaci na granulocyty, k podpoře proliferace i přes ztrátu antiapoptotického účinku p48 Runx1. Žádná z námi nalezených mutací genu Runx1 nebyla zatím podle nám dostupných informací popsána.

Práce byla podpořena grantem NR/9045-3 od IGA MZ ČR.

P35 – 1320

Nezvyklý případ podkožní panikulitidy podobného T-lymfomu

M. Matuška, J. Mayer, I. Vášová, F. Fakan, T. Waloschek, P. Mrázková, A. Ligová, D. Feld

Hemato-onkologické a transfúzní centrum FN Ostrava; Interní hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty MU a FN Brno, pracoviště Bohunice; Šiklův Patologicko-anatomický ústav Lékařské fakulty UK a FN Plzeň; Ústav patologie FN Ostrava; Onkologická klinika FN Ostrava

Podkožní panikulitidy podobný T-lymfom (SPTCL) je vzácně se vyskytující nonhodgkinský T-lymfom. Není dosud známo, jak ovlivňuje biologické chování nádoru přítomnost ko-exprese antigenu CD56. Nádory s částečnou nebo kompletní CD56+ vykazují často agresivní chování a mají špatnou prognózu. Invazivní formy mají špatnou prognózu a pouze 27 % pacientů přežívá 12 měsíců po ukončení léčby. Stále diskutovanou otázkou je proto zvolení optimálního léčebného postupu.

Popis případu: Prezentujeme kazuistiku 35letého pacienta s invazivní formou SPTCL. Dle CT vyšetření byla prokázána infiltrace hrotu pravé plíce, postižení pravého nadklíčku s expanzí 50 × 30 × 25 mm dislokující v. subclavia, infiltraci tukové tkáně v oblasti krku před kývačem a pravé axily. V pravé pleurální dutině byl objemný výpotek zabírající 1/2 hemitoraxu. Imunohistochemicky byla prokázána částečná pozitivita NK asociovaného antigenu CD56. Vzhledem k rychlé progresi nemoci byl pacient léčen intenzifikovaným režimem MegaCHOP/ESHAP/BEAM s ASCT. V den +200 po ASCT je pacient v přetrvávající kompletní remisi dle kontrolního PET/CT.

P36 – 1317

Kvalita života pohledem lékaře – preventivní modul pro studenty medicíny

N. Špatenková, K. Ivanová, V. Kajaba, J. Králová

Katedra sociologie Filozofické fakulty UP Olomouc; Ústav sociálního lékařství Lékařské fakulty UP Olomouc; Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc

Úvod: Kvalita života se stala jedním z nejfrekventovanějších pojmů současné medicíny. Uvažujeme o ní ovšem především ve vztahu k pacientovi. Nicméně fakt, že kvalita života je důležitým aspektem pro samotné lékaře, je zcela opomíjen. Lékařská profese klade vysoké nároky na absolventy medicíny nejen v prvních letech praxe. Mezi oblasti – okruhy problémů, které významně zasahují do kvality života lékařů a lékařek, patří:

- nedostatek odborných praktických znalostí a dovedností a dovedností psychosociálních, identifikovaných u absolventů všeobecného lékařství,
- jejich ztížená integrace na trhu práce a následné fungování v pracovním prostředí,
- silný tlak společnosti na lékaře – lékařskou profesi staví s ohledem na míru prestiže na první místo, zároveň neodpouští případná selhání a pochybení,
- nedostatečné sladění profesního a rodinného života, pracovní rytmus, rigidita v hierarchii, vysoká očekávání pacientů, agresivní chování ze strany veřejnosti/pacienta, traumatické zážitky, vztahy s kolegy atd.,
- konfrontace se situacemi na hraně života a smrti a rozhodnutí, která mohou zásadním způsobem měnit život pacienta i jeho rodiny.

Modul „Jak prožít kvalitní život v roli lékaře/ky?“ je založený především na osobní prožitkové zkušenosti, ale zároveň vychází a je úzce propojen s relevantními teoretickými poznatky a příslušnými vědomostmi, a to zejména z oblasti sociologie a sociální psychologie. Cílovou skupinou modulu jsou posluchači 4.–5. ročníku všeobecného lékařství LF UP v Olomouci.

Závěr: Cílem tohoto ojedinělého projektu, resp. modulu, je uvědomit si, že kvalita života by měla být relevantním cílem každého lékaře/ky, a to nejen ve vztahu k jejich pacientům, ale i ve vztahu k sobě. Účastníkům modulu budou objasněny základní aspekty kvality života lékaře, které jim poskytnou teoretický kontext pro pochopení možných problémů a překážek, s nimiž se mohou v roli lékaře/ky setkat. Anticipace určité situace totiž eliminuje možné stresové dopady náročných životních situací, s nimiž se mohou účastníci kurzu posléze v životě lékaře/ky setkat („jestliže vím, co mě čeká a možná nemine, je to pro mě srozumitelnější a méně ohrožující“). Modul je součástí kurikula LF UP (volitelný předmět C) a projektu

OP RLZ: Systém psychosociální prevence pro studenty všeobecného lékařství, CZ.04.1.03/3.2.15.2/0353.

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem ČR.

P37 – 1314

Febrilní neutropenie: projekt soustředěné komplexní péče v regionu Moravskoslezského kraje

J. Gumulec, P. Klement, V. Farbiaková, M. Kořistka, Z. Čermáková, Š. Blahutová, I. Krajsová, D. Janek, H. Plonková, C. Bodzásová, J. Zuchnická, A. Němcová, P. Slezák, E. Bogoczová, M. Wróbel, M. Brejcha, A. Ligová, M. Matuška, D. Klodová

Ústav klinické hematologie a Hemato-onkologické a transfúzní centrum FN Ostrava; Hemato-onkologické a transfúzní centrum FN Ostrava; McMaster University and Henderson Research Centre, Hamilton, Canada; Hematologické a transfúzní oddělení NsP Třinec-Sosna; Krevní centrum a Hemato-onkologické a transfúzní centrum FN Ostrava; Hematologické a transfúzní oddělení NsP Opava; Hematologické a transfúzní oddělení Podhorské nemocnice Bruntál; Hematologické a transfúzní oddělení NsP Karviná-Ráj; Oddělení klinické hematologie Onkologického centra J. G. Mendela Nový Jičín; Klinika onkologická a Hemato-onkologické a transfúzní centrum FN Ostrava

Febrilní neutropenie (FN) je život ohrožující stav navozený nejčastěji předchozí protinádorovou chemoterapií. Rozhodnutí o adekvátní léčbě musí být rychlé – např. empirická antibiotická léčba by podle uznávaných doporučení měla být zahájena do hodiny od rozvoje horečky. Centralizace péče o pacienty s potenciálem vzniku FN, vynucená nákladností a/nebo složitostí komplexní péče o pacienty s nádorovým onemocněním, představuje významné nároky na organizaci. Důraz musí být kladen na dokonalou kooperaci centra se všemi typy pracovišť. V prezentaci představujeme projekt soustředěné, komplexní, multidisciplinární a multicentrické péče o pacienty s rizikem rozvoje a/nebo s již rozvinutou FN. Jeho hlavní rysy jsou následující:

- velmi dobře dostupné a názorné edukační materiály pro odbornou veřejnost (od sester domácí péče po vyskolený personál specializovaného pracoviště),
- kvalitní edukační materiály pro laickou veřejnost,
- jednoduchá stratifikace míry rizika FN,
- koordinovaná a standardizovaná péče v domácím prostředí a/nebo v síti zdravotnických zařízení podle rizikovitosti FN,
- kontinuální spolupráce členů pracovní skupiny pro FN.

P38 – 1310

Progresivní multifokální leukoencefalopatie – vzácná komplikace po podání chemoterapie a rituximabu u nemocného s lymfomem

M. Hrudková, D. Belada, L. Smolej, M. Vališ, H. Hornychová, M. Abuhajar, J. Malý

Oddělení klinické hematologie II. interní kliniky Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové; Neurologická klinika Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové; Fingerlandův ústav patologie Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové; Radiologická klinika Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové

Je popsán případ 69letého muže léčeného od června roku 2000 pro CLL chlorambucilem s dosažením nPR. V červenci roku 2003 došlo k progresi choroby, histologické vyšetření krční uzliny prokázalo infiltraci folikulárním lymfomem (FL). Bylo podáno 6 cyklů CHOP s dosažením PR a 4 dávky rituximabu jako konsolidační terapie – i přes mírnou regresi trvá PR. Následně byl podáván interferon α po jeden rok jako udržovací terapie. V červnu roku 2005 pro druhou progresi onemocnění byl pacient léčen 4 dávkami rituximabu v monoterapii. Restagingové vyšetření prokázalo stabilní chorobu, na přání nemocného nebylo v další léčbě pokračováno. Pro třetí progresi onemocnění byly od května roku 2006 podány 4 cykly FCR p.o. s dosažením nejisté kompletní remise. O 8 týdnů později byl pacient přeložen na II. interní kliniku FN Hradec Králové pro rozvoj pravostranné hemiparézy a organického psychosyndromu. MRI vyšetření mozku odhalilo mnohočetná ložiska v bílé hmotě v obou frontálních lalocích a bylo vysloveno podezření na progresivní multifokální leukoencefalopatii (PML). Elektronmikroskopické vyšetření likvoru prokázalo přítomnost JC viru, původce PML (elektronmikroskopický záchyt JC viru též v krvi a moči). I přes virostatickou léčbu klinický stav pacienta dále progredoval do obrazu kvadruplegie a následně komatózního stavu, další komplikací byl rozvoj septického šoku. Po 3 týdnech hospitalizace pacient zemřel pod obrazem multiorganového selhání. V sekčním nálezu prokázalo imunohistochemické a PCR vyšetření bílé hmoty mozku přítomnost JC viru, terminální příčinou smrti byla mykotická pneumonie. PML je vzácné demyelinizační onemocnění CNS vyvolané oportunní infekcí JC virem typické pro imunokompromitované pacienty. I když je PML raritním onemocněním, je třeba na něj vždy myslet při rapidně se rozvíjející neurologické symptomatologii s obrazem demyelinizace CNS na MRI vyšetření. Diagnostický je průkaz JC viru v likvoru, ev. mikroskopicky v biopsované tkáni CNS. Léčba je bohužel svízelná, kazuisticky jsou popisovány regrese po podání cidofoviru. V našem případě se jed-

nalo o závažnou komplikaci u výrazně předlčeného nemocného s deficitem jak v buněčné, tak i v protilátkové imunitě.

Podpořeno výzkumným záměrem MZ č. 00179906.

P 39 – 1282

Imatinib mesylate and aging: Preliminary evaluation of efficacy and toxicity of two CML groups

E. Tóthová, A. Kafková, M. Surová, M. Fričová, N. Štecová

Klinika hematologie a onkohematologie Lékařské fakulty UPJŠ a FN L. Pasteura Košice, Slovenská republika

Background: The age is included and acts as poor prognostic factor in the staging systems most employed (Sokal and Euro). Older patients have been generally excluded from most of the trials employing interferon, due to its toxic effects. Only few studies investigated the effect of imatinib in older chronic myeloid leukemia patients CML.

Aim: To investigate the effects of age on response and compliance to imatinib.

Methods: We analysed of 59 patients who have treated with imatinib for chronic phase CML after treatment with interferon had failed. At enrollment 12/59 (20 %) were > 60 years (median age 64, range 62–74) and 47/59 (80 %) < 60 years (median age 37, range 21–58). Sokal risk distribution was different between the 2 groups: low Sokal risk cases were 14 % in older group vs 56 % younger group ($p = 0.01$). Timing of response evolution: hematologic, continuously; cytogenetic 6 and 12 months; molecular, at 3, 6 and 12 months.

Results: At 6 months, both groups achieved a 94 % complete hematologic response (CHR) rate. At 12 months, the complete cytogenetic response (CcyR) rate were older/younger 39%/58 % ($p = 0.002$). The major cytogenetic response (MCyR) achieved 6/12 (50 %) patients in older group and 33/47 (70 %) patients in younger group ($p = 0.003$). The probabilities of progression – free survival and overall survival were the same. Moreover, among complete cytogenetic responders, no differences were found in the level of molecular response between the 2 age groups. As might be expected, older patients experienced more adverse events, both hematologic and non-hematologic.

Conclusions: The observation period is still short, but our data confirm the results of other authors in patients treated in late chronic phase after failure of interferon treatment: fewer responses but the same long-term outcome for older patients.

P40 – 1278

Nové možnosti využití monitorace mutace JAK2 V617F po alogenní transplantaci periferních kmenových buněk: kazuistika

M. Pecůchová, B. Katrincsáková, L. Raida, M. Jarošová, K. Indrák

Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty UK a FN Olomouc

V roce 2005 byla objevena úloha získané mutace cytoplazmatické Janus tyrozin kinázy 2 (JAK2) V617F v etiopatogenezi myeloproliferativních onemocnění (MPD). Její přítomnost byla prokázána u drtivé většiny pacientů s diagnózou polycytemia vera (PV, asi 95 %) a asi u 50 % pacientů s diagnózou idiopatické myelofibrózy či esenciální trombocytémie. Dnes je vyšetření této mutace součástí diagnostiky chronických MPD. Intenzivní výzkum významu její kvantifikace je součástí studií hodnotících klinické chování a prognózu MPD. Předkládáme případ mladého muže (rok narození 1978), u něhož byla v březnu roku 2000 stanovena diagnóza PV. Retrospektivní analýzou byl u tohoto pacienta prokázán v době diagnózy pomocí metodik PCR heterozygotní výskyt mutace JAK2 V617F s dominantním zastoupením mutantní alely. Pacient podstoupil v březnu roku 2005 alogenní příbuzenskou transplantaci periferních kmenových buněk (PKB) od HLA-identické sestry po přípravném režimu Fludara + Busulfan + ATG. Transplantační léčba byla indikována vzhledem k věku pacienta, pozvolnému nárůstu sleziny a riziku další akcelerace s přechodem do myelofibrózy. Den +29 se objevily první známky akutní kožní GvHD, která dosáhla II. stupně dle Glucksberga, byla zvládnuta kortikoterapií. Den +34 prokázalo vyšetření chimérizmu v plné krvi metodou FISH 97 % dárcovských buněk. Prokázané vymizení positivity JAK2 V617F plně koreluje s FISH potvrzeným dosažením dárcovské chiméry. Toto sdělení si klade za cíl přispět k diskusi o významu monitorace výše zmíněné mutace při sledování minimální reziduální choroby (MRD).

Podporováno grantem IGA NR/7799-3 a výzkumným záměrem MSM6198959205.

P41 – 1277

Cirkulující endotelové prekuzory u pacientů léčených alogenní transplantací

L. Kideryová, R. Veselá, M. Hnátková, L. Uchytlová, H. Rychtrmocová, K. Benešová, R. Pytlík

I. interní klinika 1. lékařské fakulty UK a VFN Praha; Ústav hematologie a krevní transfuze Praha

Cirkulující endotelové prekuzory (CEP) jsou původem dřevňové buňky přítomné v periferní krvi, které se mohou podílet jak na fyziologické, tak na patologické tvorbě cévního řečiště. V předchozích pracích [např. Kideryová

et al *Haematologica/Hematol J* 2006; 91 (Suppl 1): 328] jsme prokázali, že pacienti s poškozením malých cév v důsledku vaskulitidy mají snížený počet CEP. Protože k poškození mikrocirkulace dochází též po alogenní transplantaci, studovali jsme počty CEP u alogenně transplantovaných pacientů. Počty cirkulujících endotelových prekurzorů byly stanoveny kultivační metodou CFU-Hill a metodou průtokové cytometrie celkem u 17 alogenně transplantovaných pacientů. Jako kontrolní soubory sloužilo 17 dosud neléčených pacientů s hematologickými nádory a 36 zdravých dobrovolníků. Věkové mediány alogenně transplantovaných pacientů, dosud neléčených pacientů a zdravých dobrovolníků byly 45, 51 a 54 let ($p = ns$). Stejně tak se nelišily počty leukocytů v uvedených populacích. Mezi zdravými dobrovolníky bylo více žen než v kontrolních populacích ($p = 0,006$), avšak počty CFU/ml periferní krve nebyly závislé na pohlaví. Alogenně transplantovaní pacienti před zahájením přípravného režimu i nově diagnostikovaní pacienti měli signifikantně méně CFU-Hill/ml krve než zdravé kontroly (mediány 1,2, 3,5 a 29 CFU-Hill/ml, $p < 0,0001$ v Kruskallově-Wallisově testu). Mezi alogenně transplantovanými a nově diagnostikovanými pacienty statisticky významný rozdíl nebyl zjištěn. V dalším sledování u alogenně transplantovaných pacientů (den +21 až den +378 po transplantaci) většinou došlo k dalšímu poklesu CFU-Hill, i když tento pokles byl na hranici statistické významnosti. Počty CEP zjišťované průtokovou cytometrií nekorelovaly s kultivačním stanovením, což je v souladu s dříve publikovanými pracemi. Snížení počtu CEP u alogenně transplantovaných pacientů patrně nesouvisí jen s prodělanou léčbou, ale i se samotným nádorovým onemocněním. Dlouhodobě snížené množství endotelových progenitorů může souviset s vyšším rizikem kardiovaskulárních onemocnění, popisovaným u pacientů léčených alogenní transplantací. *Podpořeno IGA MZ ČR 8754/3, GAUK 33/2006/C/1. LF, MSM 0021620808.*

P42 – 1271

Identifikácia genetických aberácií u pacientov s DLBCL

D. Ilenčíková, P. Nováková, K. Hlinková,

A. Vranovský, V. Ballová, M. Ladická, L. Plank

Oddelenie onkologickej genetiky Národného onkologického ústavu Bratislava, Slovenská republika; Klinika hematológie a transfuziológie Národného onkologického ústavu Bratislava, Slovenská republika; Ústav patologickej anatómie Jesseniovej lekárskej fakulty UK a MFN Martin, Slovenská republika

Úvod: Klinicko-patologická heterogenita DLBCL vykazuje heterogenitu v molekulárnej patogenéze tohto ochorenia. Klasické molekulárne štúdie identifikovali najmenej 3 rôzne genotypy DLBCL. Prvý typ zodpovedá za pri-

bližne 40 % a je asociovaný s prestavbou BCL6 génu. Druhý genetický typ DLBCL vykazuje jednu z niekoľkých molekulárnych porúch génov BCL2 a BCL6 spojených s aktiváciou protoonkogénov REL, MUC1, BCL8 a C-MYC. Tretí typ je daný „transformačnou dráhou“, ktorá zahŕňa transformáciu už existujúceho folikulárneho lymfómu s prestavbou génu BCL2. Aberácie týchto génov sú považované za primárne chromozómové aberácie. Medzi sekundárne chromozómové aberácie patrí predovšetkým delécia génu p53, p16. Sem patria tie aberácie, ktoré predstavujú nadbytočný alebo chýbajúci genetický materiál v genóme. Oni sú často príčinou histologickej transformácie nízkomaligného na vysokomaligny a skrátenej doby prežívania. Vyšetrenie klonálnej prestavby IgH sa vyšetruje kombinovanou aplikáciou IGH (VH-JH a DH-JH) a IGK oblastí.

Materiál a metódy: V rokoch 2006–2007 bolo na oddelení vyšetrených 140 pacientov s DLBCL. Materiálom bol parafrínový blok uzliny u 29/140 (20,71 %), čerstvé tkanivo uzliny v 2/140 (1,43 %) a PK/KD u 130/140 (92,85 %). Metódou konvenčnej a molekulovej cytogenetiky (iFISH) sme vyšetřili 140 vzoriek kostnej drene a periférnej krvi pacientov s DLBCL. Metódou FISH sme vyšetřili aberácie génov BCL6, IgH a p53. Metódou molekulovo-genetickej diagnostiky sme vo vzorke kostnej drene sledovali prítomnosť buniek s translokáciou bcl2/IgH. Metódou iFISH sme u 29 pacientov retrospektívne vyšetřili tumorové tkanivo z parafrínového bločku.

Výsledky: V súbore 140 pacientov sme mohli genetickými metódami zachytiť genetické aberácie u 39 pacientov (27,86 %) v tkanive KD a PK a 23/26 pacientov (88 %) v tumorovom tkanive. Primárne chromozómové aberácie sme identifikovali u 4 pacientov metódami konvenčnej cytogenetiky KD a PK, metódou FISH u 17 pacientov a metódou molekulovej diagnostiky 4 pacientov. Sekundárne zmeny sme mohli vyšetřiť u 15 pacientov konvenčnou cytogenetikou. U 7 pacientov sme potvrdili prítomnosť translokácie Bcl2/IgH, čo poukazuje na vývoj DLBCL z folikulového lymfómu. U 23 pacientov sme metódou FISH z fixovaného tumorového tkaniva uzliny zistili prítomnosť chromozómových aberácií. Najfrekvencovanejšou aberáciou bola zmena génu IgH a BCL6. Sledovali sme klinicko-patologické a genetické korelácie nálezov. *Projekt bol podporený MZ SR 2005/ 01-NOU-16.*

P43 – 1268

Práce špecializované sestry hemaferetického strediska s novým adsorberem Lipocollect

B. Strnadová

Oddelení klinické hematologie II. interní kliniky Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové

Úvod: Nová medicínská technika přináší s sebou lepší léčebné výsledky, ale je náročná na přesné a bezpečné pro-

vedení. Extrakorporální eliminační metodiky patří mezi nejsložitější mezi hemaferézami; jsou užívány k selektivnímu odstranění LDL-cholesterolu u pacientů s homozygotní nebo těžkou heterozygotní hypercholesterolemií, kteří neodpovídají adekvátně na kombinovaná „standardní“ léčebná opatření (dieta, změna životního stylu, medikamentózní terapie). Popisujeme vlastní zkušenosti s obsluhou prvního typu adsorbéru na vícečetné použití, obsahujícího pouze uměle vyrobené (neživočíšné) substance.

Materiál a metodika: Extrakorporální eliminaci lipoproteinů provádíme metodou imunoadsorpce – plazma se oddělí separátorem Cobe-Spectra a je čerpána do adsorpčně-desorpčního automatu Adasorb, kde jsou adsorpční kolony, které jímají LDL-cholesterol. Dosud jsme pracovali s typy, kde sorbenty byly animálního původu. To nese s sebou jisté nebezpečí přenosu zvířecích infekcí anebo alergických reakcí. Kolona Lipocollect obsahuje jako první pouze syntetické substance, neimunizují a vylučují některé další vedlejší reakce. Po prvé lze vše při výrobě sterilizovat teplem. Adsorbér Lipocollect obsahuje polotekutou hmotu – mikrokuličky křemičitého gelu, které jsou porézní, mají otvory; v mikrootvorech je vázána kyselina polykarbonová. Negativní náboj reverzibilně váže částice LDL-cholesterolu a VLDL-cholesterolu. Po zaplnění se kolony promývají a opět používají.

Výsledky: U pacienta s homozygotní familiární hypercholesterolemií, kde je extrakorporální eliminace život zachraňujícím výkonem, bylo provedeno 25 procedur s uvedeným adsorbérem. LDL-cholesterol klesá o $72,6 \pm 5$ % původní hladiny. Léčebné procedury probíhaly bez vedlejších příhod, pacient je dobře toleroval a nebyly zjištěny klinicky významnější nebo nebezpečné změny základních biochemických parametrů. Z hlediska obsluhy je kolona lehce zařaditelná do soustavy primárního a sekundárního přístroje podobně, jak provádíme dosud. Uvolnění reverzibilní vazby LDL-cholesterolu z kolony je dokonce jednodušší, provádí se pouhým jednomolárním NaCl a nemusí se používat tři různé roztoky.

Závěr: Adsorbér Lipocollect byl použit poprvé v ČR. Je účinný, bezpečný a z hlediska obsluhy je výhodnější než dříve používané adsorbéry. I když již bylo provedeno 26 výkonů, bude přesnější hodnocení možné až podle dalších výsledků.

Podporováno výzkumným projektem MZ MZO 00179906.

P44 – 1261

Srovnání selektivní deplece aloreaktivních T-lymfocytů u pacientů s leukemií a mnohočetným myelomem

E. Matějková, I. Burešová, J. Mužíková, D. Kyjovská, J. Smejkalová, R. Hájek, J. Michálek

Univerzitní centrum buněčné imunoterapie MU Brno; Univerzitní výzkumné centrum – Česká myelomová skupina MU Brno

Úvod: Reakce štěpu proti hostiteli (graft-versus-host disease – GVHD) je stále nejčastější a nejzávažnější komplikací po alogenní transplantaci kmenových buněk. Hlavní roli ve vzniku GVHD hrají aloreaktivní klony T-lymfocytů dárce, které mohou následně způsobit poškození tkání pacienta. Selektivní deplece je velmi účinnou strategií k odstranění těchto nebezpečných dárcovských T-lymfocytů a zároveň je při tomto postupu zachován žádoucí protinádorový potenciál štěpu.

Metodika: V primární smíšené lymfocytární reakci (mixed lymphocyte reaction – MLR) byly použity ozářené neleukemické/nenádorové buňky pacienta jako antigenní stimulátor. Vzniklá populace aloreaktivních T-lymfocytů byla selektivně depletována pomocí anti-CD25 imunotoxinu (IT). Zbýlé T-lymfocyty nevykazovaly reaktivitu proti buňkám pacienta (příjemce štěpu) a byly následně stimulovány leukemickými/nádorovými buňkami od stejného pacienta. Takto aktivované buňky byly imunomagneticky separovány na základě produkce INF γ .

Výsledky: V našich experimentech bylo provedeno 20 MLR (10 s diagnózou akutní myeloidní leukemie, 3 s akutní lymfoblastickou leukemií a 7 s mnohočetným myelomem). Selektivní deplece aloreaktivních T-lymfocytů pomocí anti-CD25 IT dosáhla vždy velmi vysoké účinnosti (99,2–100 %, medián 99,7 %). Graft-versus-leukemia/myelom (GVL/GVM) efekt dárcovských T-lymfocytů byl dobře zachován, 1,1 až 9,6 % (medián 7,46 %), dárcovských T-lymfocytů bylo GVL/GVM reaktivních, zatímco graft-versus-host (GVH) reaktivita dárcovských buněk byla zanedbatelná (0–0,23 %, medián 0,14 %) i po opakovaných restimulacích ozářenými nenádorovými buňkami pacienta.

Závěr: Lze konstatovat, že je možné velmi účinně selektivně depletovat aloreaktivní T-lymfocyty dárce pomocí anti-CD25 IT. V případě diagnózy leukemie i mnohočetného myelomu byla u depletovaných buněk zachována relativně vysoká reaktivita proti leukemii/myelomu.

Podporováno grantem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy NPV11 2B06058.

P45 – 1255

Imunomodulace v managementu SIRS komplikujícího léčbu HCL**D. Starostka, L. Novosadová, P. Mikula***Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov*

U pancytopenické 41leté pacientky s anamnézou bronchiálního astmatu a atopického ekzému byla analýzou kostní dřeně prokázána HCL. Léčbu standardně dávkovaným 2-chlorodeoxyadenozinem za antiinfekční, antitrombotické a TLS-profylaxe s podporou G-CSF a erythropoetinem komplikovaly protražované febrilní epizody charakteru SIRS doprovázené artralgiemi a intermitentním urtikariálním exantémem, rekurující 11 týdnů po aplikaci 2-CDA, provázené výraznou elevací FW a CRP a lehkou hepatopatií. Prokalcitonin byl opakovaně normální, široce zaměřené analýzy (mikrobiologie, sérologie, imunologie, PCR, grafické metody) neprokázaly jednoznačnou infekční příčinu stavu ani autoimunitní proces. FCM lymfocytů PK detekovala těžký buněčný imunodeficit (T-lymfodeplece a deplece NK-buněk). Komplexní širokospektrá empirická antiinfekční terapie byla inefektivní, rapidní pokles horečky a CRP nastal vlivem kortikosteroidů (opakované bolusy metylprednisolonu 125–250 mg/den následované prednisonem maximálně 80 mg/den po 3 měsíce). Imunomodulace zahrnovala dále IVIG (dvě 30gramové dávky) a nakonec transfer faktor (8 dávek humánního transfer faktoru – deeskalační 5týdenní režim). 3,5 měsíce po terapii byla nemocná asymptomatická s normalizací hemogramu, počtu T-lymfocytů, NK-buněk a hladin imunoglobulinů. Kompletní remise HCL byla dokumentována za 6 měsíců po léčbě 2-CDA. Protražovaný SIRS po standardní léčbě HCL v terénu imunoalterace u nemocné s polyvalentní alergií byl zvládnut imunomodulační léčbou se zásadním podílem účinku transfer faktoru.

P46 – 1240

Genetické vyšetrenia T-lymfómov u detí**K. Hlinková, D. Ilenčíková, B. Piačková, M. Čermák, M. Štuková***Oddelenie onkologickej genetiky Národného onkologického ústavu Bratislava, Slovenská republika*

Úvod: T-lymfómy u detí sú pomerne vzácne, tvoria približne 12 % non-Hodgkinových lymfómov (NHL). NHL predstavujú heterogénnu skupinu ochorení, ktoré sa líšia ako klinickými príznakmi, tak i odpoveďou na rôzne typy terapie. Genetické vyšetrenia T-lymfómov u detí môžu prispieť k upresneniu diagnózy ochorenia, poskytnúť informácie o progresii ochorenia a zároveň môžu byť nápomocné tam, kde je morfológická diagnóza nejednoznačná. K detekcií chromozomálnych aberácií u detí s T-lymfómami

využívame okrem metód konvenčnej cytogenetiky i metódy FISH analýzy a molekulárno-genetické metódy.

Materiál a metódy: Na našom pracovisku sme retrospektívne vyšetrili 26 pacientov diagnostikovaných v rokoch 1999–2008, u ktorých sme sledovali najčastejšie chromozomálne aberácie. Molekulárno-genetickým vyšetrením sme na základe heteroduplex analýzy sledovali prestavbu génov pre T-bunkové receptory (TCR $\alpha\delta$ -14q11, TCR β -7q34 a TCR γ -7p15). Ako vyšetrovací materiál sme použili DNA izolovanú z kostnej drene, resp. periférnej krvi. FISH analýzou sme detekovali chromozomálne aberácie prostredníctvom troch typov sond: sil/tal [del(1)(p32,p32), TLX3 (t(5,14)(q35,q32)] a TCR sonda α/δ [t(1,14)(p32,q11)]. U všetkých pacientov sme sledovali deléciu nádorového supresorového génu p16 (9p21) a amplifikáciu génu ABL (9q34). Vyšetrovacím materiálom FISH analýzy bol fixovaný tumor uzliny, pričom v niektorých prípadoch sme použili natívny tumor uzliny. V priebehu liečby sme na základe pozitívneho nálezu sledovali prítomnosť pozitívneho klonu vo vzorke kostnej drene resp. periférnej krvi. Tým sme mohli u niektorých pacientov monitorovať ochorenie a zistiť odpoveď na liečbu.

Záver: V našom príspevku uvidíme koreláciu výsledkov jednotlivých vyšetrovacích metód v závislosti od typu vyšetrovacieho materiálu a zhodnotíme prognostický význam zistených chromozomálnych aberácií.

P47 – 1235

Potreby nemocných akútnej leukemii a možnosti psychoterapie**Z. Hrstka***Katedra verejného zdravotníctví Fakulty vojenského zdravotníctví a Klinika onkologie a radioterapie Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové*

V súčasnej dobe se psychologická pomoc pacientům s akutní leukemií začíná dostávat do systému poskytování komplexní péče o pacienta jako nezbytná součást léčebného postupu. Východiskem se stalo poznání, že tito pacienti po určitém čase, bez ohledu na množství oficiálních informací a na validitu informací neoficiálních, poskládají mozaiku svých znalostí o nemoci a dospějí k pravdě o své situaci. Velmi často se stává, že znají i rigorózní název nemoci. Právem se tedy ptají, co bude dál, jakou kvalitou, jaké trvání a smysl bude mít jejich další život s nemocí. Jestliže vezmeme v úvahu potřeby nemocných tak, jak je vidí sami pacienti, pak by psychologická pomoc a konkrétní psychoterapie měla kontinuálně zajistit lidský rozhovor, emoční podporu a poradenskou službu v nejširším slova smyslu. Domnívám se, že to jsou základní předpoklady, od kterých se odvíjí reálná žádoucí změna postojů k vlastní nemoci cestou osobního a osobnostního

zrání. Psychologická a psychoterapeutická pomoc pacientům s akutní leukemií vytváří především dostatečně příznivé prostředí pro vyjádření pocitů, obav, starostí a nadějí nemocných. Při chápání potřeb pacientů dodává psychoterapie odvalu a sílu a projeví víru v tom, že se podaří i v tak složité situaci najít individuálně přijatelné řešení. Pacient nesmí být v léčbě pouze pasivní figurkou, která se nechá léčit, ale musí být aktivním spolupracovníkem a partnerem lékaře. Lze předpokládat, že psychologická pomoc se bude měnit, utvářet a vyvíjet úměrně s růstem zkušeností zdravotnického personálu – týmu poskytujícího komplexní péči, chtějícímu také poskytnout určitý psychický komfort. Potřeby nemocných jsou známy někdy v obrysech, jindy detailně. V každém případě však jak pacienti, tak ošetřující tým začnou plně spolupracovat až tehdy, splní-li se základní předpoklad lékařsko-terapeutického vztahu: naučí se vzájemně otevřeně hovořit o tak závažných věcech, jako je nemoc, bolest, umírání, případně smrt. Příspěvek pojednává o základních postulatech akceptace potřeb pacientů s akutní leukemií a možnostech využití psychologické pomoci i psychoterapie.

P48 – 1229

Chromozomové změny 2p u chronické lymfocytární leukemie

M. Holzerová, H. Urbánková, R. Plachý, L. Kučerová, Z. Pikalová, T. Papajík, K. Indrák, M. Jarošová

Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty UK a FN Olomouc

Úvod: Chronická lymfocytární leukemie je nejčastější leukemií dospělého věku. Výsledky molekulárně genetických a imunofenotypizačních sledování nemocných s CLL prokázaly prognostický význam mutačního stavu IgVH a exprese CD 38, stejně jako chromozomových abnormalit potvrzených pomocí molekulární cytogenetiky. Kromě chromozomových změn se známým prognostickým významem, jako jsou delece 6q, 11q, 13q a 17p detekovaných rutinním molekulárně cytogenetickým vyšetřením, nalézáme u nemocných s CLL i další chromozomové aberace. V současné době není jasné, zda další aberace, které nejsou detekovány standardním vyšetřením pomocí FISH, mají vliv na prognózu a vývoj onemocnění.

Metodika: Provedli jsme klinické a laboratorní vyšetření 7 nemocných s CLL (muži) s prokázaným zmnožením 2p. Předpokládáme, že zmnožení genetického materiálu krátkých ramen chromozomu 2 může vést k aktivaci proto-onkogenů lokalizovaných ve sledované oblasti. Zaměřili jsme se na sledování změn v počtu kopií genů ALK, N-MYC, REL, BCL11a, jejichž role v leukemogenezi je známá,

a imunohistochemické ověření hladiny proteinů sledovaných genů.

Výsledky: Zmnožení 2p23~p11 bylo prokázáno pomocí komparativní genomové hybridizace (CGH), případně 1Mb arrayCGH. K detailnímu mapování zmnožených oblastí byla provedena interfázní FISH s komerčně dostupnými sondami (Abbott-Vysis) a sondami připravenými z BAC klonů v naší laboratoři. U všech nemocných byl prokázán nemutovaný status IgVH a provedena imunohistochemická analýza hladiny proteinů sledovaných genů.

Závěr: Práce shrnuje molekulárně cytogenetická, molekulárně genetická a klinická data u 7 vybraných nemocných s CLL v závislosti na genetických změnách 2p.

Práce je podporována grantem MSM 6198959205 a NR 9484-3.

P49 – 1225

Souvislost mezi intracelulárním obsahem léčiva a buněčnou rezistencí nádorové linie exprimující P-glykoprotein

P. Krumpochová, I. Frydrych, P. Doležel, P. Mlejnek

Ústav lékařské biologie Lékařské fakulty UP Olomouc

P-glykoprotein (ABCB1) patří do rozsáhlé rodiny tzv. ABC membránových proteinů (ATP binding cassette), které jsou zodpovědné za transport látek přes buněčnou membránu. Tento proces vyžaduje energii ve formě ATP. ABC proteiny mají významný podíl na vzniku mnohočetné lékové rezistence nádorových buněk. P-glykoprotein (P-gp) je jedním z členů ABC rodiny membránových transportérů, který bývá primárně spojován se vznikem rezistence u nádorových buněk. Aktivně snižuje intracelulární obsah širokého spektra látek, a to i proti koncentračnímu spádu, čímž navozuje rezistenci. V naší laboratoři jsme se pokusili nalézt kvantitativní vztah mezi změnou intracelulárního obsahu léčiva a reverzí rezistence po aplikaci inhibitoru P-gp. Experimenty byly prováděny s buněčnou linií K562/Dox, která má zvýšenou expresi genu *mdr1*. Jako modelové léčivo jsme použili daunorubicin, jehož intracelulární obsah jsme stanovovali metodou průtokové cytometrie. Naše výsledky ukazují, že nárůst intracelulárního obsahu daunorubicinu v buňce po aplikaci cyklosporinu A (CsA), známého inhibitoru P-gp, lze jen částečně vysvětlit reverzí rezistence buněk vystavených kombinovanému účinku daunorubicinu a CsA.

Projekt je podporován granty Ministerstva zdravotnictví ČR, grant NR9482-3 a částečně grantem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy, výzkumný záměr 6198959216.

P50 – 1217

Zvýšená exprese mRNA pro angiopoietin-2 u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií a nemutovaným IgVH**F. Vrbacký, L. Smolej, V. Vrobllová, S. Peková, K. Šarounová, M. Pecka, J. Malý***Oddělení klinické hematologie II. interní kliniky Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové; Ústav klinické imunologie a alergologie Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové; Oddělení klinické biochemie, hematologie a imunologie Nemocnice Na Homolce Praha*

Výzkumy posledních let ukazují, že na patogenezi chronické lymfocytární leukémie (CLL) se významně podílí angiogeneze. Jedním z důležitých cytokinů účastnících se tohoto procesu je i angiopoietin-2 (Ang-2), jehož zvýšená aktivita byla pozorována u některých hematologických malignit. Údajů týkajících se Ang-2 u CLL je však velmi málo. V naší laboratoři jsme proto zavedli metodu kvantifikace mRNA pro Ang-2 pomocí kvantitativní PCR v reálném čase a následně stanovili množství transkriptu pro Ang-2 v separovaných mononukleárních buňkách 24 neléčených pacientů s CLL. Pro normalizaci rozdílů v koncentraci templátu mezi jednotlivými vzorky byl použit transkript kontrolního genu Abl1. Expresí ZAP-70 a CD38 byla analyzována průtokovou cytometrií. Mutační stav IgVH byl stanoven z cDNA standardní metodou využívající databázi IgBLAST. U 10 pacientů byla zjištěna zvýšená koncentrace mRNA pro Ang-2 (poměr Ang-2/Abl1 > 5*10⁻³). U ostatních 14 pacientů bylo množství transkriptu pro Ang-2 nízké či nedetekovatelné (poměr Ang-2/Abl1 < 5*10⁻³ nebo Cp pro Ang-2 > 35). Statistickým vyhodnocením získaných dat byla zjištěna signifikantní závislost mezi zvýšenou expresí transkriptu pro Ang-2 a nemutovaným IgVH (n = 21, p = 0,012). Závislost mezi množstvím mRNA pro Ang-2 a expresí CD38 (p = 0,057) a ZAP-70 (p = 0,410), stadiem dle Raije (0 nebo I-II; p = 0,069) či průběhem onemocnění (stabilní nebo progresivní; p = 0,39) se prokázat nepodařilo. Naše pilotní studie ukazuje, že zvýšená exprese Ang-2 v mononukleárních buňkách pacientů s CLL je asociovaná s mutačním stavem IgVH a může tedy hrát roli v rozvoji tohoto onemocnění. Potvrzení výsledků však bude vyžadovat další studium této problematiky a analýzu většího počtu pacientů. Tento výzkum byl realizován s podporou výzkumného záměru ministerstva zdravotnictví č. MZO 00179906.

P51 – 1216

Stanovení a význam mutace V617F genu JAK2 u myeloproliferativních chorob**A. Novosadová, B. Katrincáková, J. Kadlecová, M. Koláčková, M. Divoká, J. Indráková, M. Jarošová**
Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc

Myeloproliferativní onemocnění představují velice heterogenní skupinu chorob myeloidní řady krvetvorných buněk.

Diferenciální diagnostika se standardně opírá zejména o detekci 2 molekulárních změn: fúzního genu BCR-ABL a mutace V617F v genu pro tyrosinkinázu JAK2. BCR-ABL charakterizuje především chronickou myeloidní leukémií, JAK2 mutace se naopak vyskytuje u všech tzv. BCR-ABL/Ph1 negativních myeloproliferativních chorob, především u pacientů s diagnózou pravá polycytemie, esenciální trombocytémie či idiopatická myelofibróza. Na úrovni diferenciální diagnostiky přítomnost JAK2 mutace potvrzuje klonální charakter myeloproliferace, čímž nesporně přispívá k diferenciaci pravé polycytemie od jiných, neklonálních poruch myeloidní řady. Nepřítomnost této mutace však diagnózu klonálního myeloproliferativního onemocnění nevylučuje. Detekcí JAK2 mutace se na Hemato-onkologické klinice Olomouc zabýváme od roku 2005. Standardně tuto mutaci, společně s fúzním genem BCR-ABL, vyšetřujeme v době stanovení diagnózy u všech pacientů s myeloproliferativním onemocněním. Cílem našeho sdělení je představit postup monitorování výskytu JAK2 mutace v naší laboratoři a shrnout přínos tohoto screeningu pro klinickou praxi. Při vyšetření vycházíme z periferní krve nebo kostní dřeně, ze které izolujeme DNA. Při samotné detekci JAK2 mutace využíváme alelově specifickou PCR, která nám umožňuje selektovat pacienty s přítomnou mutací. V letech 2005–2008 jsme v naší laboratoři vyšetřili celkem 350 pacientů na přítomnost JAK2 mutace. Incidence mutace a neustále se rozrůstající soubor vyšetřených pacientů poukazují na významnost detekce JAK2 mutace u myeloproliferativních chorob.

Práce je podporována grantem: MSM 6198959205.

P52 – 1209

Morfologická a genetická analýza pacientov s klinicky verifikovanou pravou polycytémiou**J. Marcinek, T. Burjanivová, T. Balhárek, P. Szépe, Z. Lasabová, L. Plank***Ústav patologickej anatómie a Konzultačné centrum hematopatológie Jesseniovej lekárskej fakulty UK Martin, Slovenská republika; Ústav molekulárnej biológie Jesseniovej lekárskej fakulty UK Martin, Slovenská republika*

Úvod: Pravá polycytémia (PV) sa vyznačuje prítomnosťou genetickej mutácie JAK2 (V617F) tyrozínovej kinázy, ktorú však nachádzame aj pri iných Ph1-myeloproliferatívnych ochoreniach (MPO). Pre odlišenie iných typov MPO je preto potrebné bioptické vyšetrenie kostnej drene (KD). V práci sa zameriavame na hodnotenie mutácie JAK2 a klasických, resp. netypických morfologických črt pacientov s klinicky verifikovanou PV.

Metodika: Genetickú analýzu sme realizovali u 37 pacientov, u ktorých dotazníkmi oslovení ošetrojúci lekári diagnostikovali PV, pričom v 35 prípadoch kvalita bioptickej

vzorky KD umožnila i semikvantitativní morfologickou analýzu (19krát KD odobratá v čase diagnostiky PV, 14krát po dlouhodobém sledování resp. terapie, 2krát tieto informace neboli známe) s použitím štandardného panelu farbení KD. Mutácia JAK2 bola vyšetřovaná z DNA izolovanej z parafínových blokov pomocou alelovo-špecifickéj PCR.

Výsledky: Morfológia KD 24krát zodpovedala diagnóze PV, 3krát sme zvažovali okrem PV i možnosť primárnej myelofibrózy (PMF), resp. 1krát diagnózu esenciálnej trombocytémie (ET), 3krát morfológia KD zodpovedala diagnóze CIMF a 7krát bližšie neklasifikovateľnému MPO. Pre PV typickú hypercelularitu KD sme pozorovali u 27 pacientov, trilineárnu proliferáciu u 32 pacientov, často bez prítomnosti Fe pigmentu (28krát). V časti prípadov malá časť megakaryocytov (mgk) vykazovala morfológiu typickú pre ET (19krát), resp. PMF (11krát), 11krát boli prítomné i tesné zhluky mgk. Dysplázie mgk boli prítomné v 33 prípadoch (24krát $\leq 10\%$ všetkých mgk). 9krát sme identifikovali normálne množstvo fibrózy v KD, 17krát ľahkú, prevažne fokálnu retikulínovú fibrózu. Vo väčšine prípadov s atypickou morfológiou sa jednalo o dlhodobé sledovanie/terapiu ochorenia. Mutáciu JAK2 (V617F) sme identifikovali u 33 pacientov, 3 prípady boli negatívne a 1krát kvalita DNA neumožnila analýzu.

Záver: Klasický morfológický obraz PV býva často narušený atypickými morfológickými črtami (dysplázie a tesné zhluky mgk, retikulínová fibróza), ktoré sú najčastejšie dôsledkom dlhodobého sledovania resp. terapie pacienta a môžu viesť k chybnéj diagnóze PMF. Prítomnosť mutácie JAK2 potvrdzuje diagnózu MPO a jej neprítomnosť sponchyňuje, avšak nevyklučuje možnosť PV.

Podpora projektu ESF – Inkubátor doktorandov na JLF UK

P53 – 1195

Kvantifikace transkriptů BCR-ABL v ČR – mezilaboratorní porovnání

J. Rulcová, J. Moravcová

Ústav hematologie a krevní transfuze Praha

Úvod: Molekulární monitorování množství transkriptů BCR-ABL pomocí real-time RT-PCR je důležitým nástrojem při sledování stavu pacientů s chronickou myeloidní leukémií. Bylo prokázáno, že zvyšování hladiny transkriptů naznačuje progresi choroby, snížení naopak úspěšnou léčbu. Použití různých metod nebo způsobů provedení (od izolace RNA až po použitý kontrolní gen) může vést k rozdílným výsledkům u jednotlivých laboratoří. Protože doposud nebyla dokončena mezinárodní standardizace metody, je pro klinickou praxi velmi vhodné porovnat výsledky kvantifikace BCR-ABL alespoň v rámci laboratoří jedné země.

Metodika: V roce 2007 jsme provedli porovnání výsledků kvantifikace BCR-ABL v 7 laboratořích ČR (Brno, Hradec Králové, Olomouc, Plzeň, Praha: Homolka, Motol, ÚHK). Pro porovnání jsme připravili vzorky z lyzátů buněk linie K562, které byly ředěny lyzátem celkových leukocytů normálního dárce – ředění 1krát, 10krát, ... 106krát, tedy s poklesem hladiny transkriptů BCR-ABL v rozsahu 6 řádů. Vzorky stabilizované lyzačním puřem GITC (107 buněk/ml) byly poštou rozeslány jednotlivým laboratořím. Ve všech laboratořích probíhala kvantifikace BCR-ABL metodou real-time RT-PCR. Používané kontrolní geny: 4krát ABL, 2krát B2M a 1krát G6PDH; přístroje pro real-time PCR: 4krát Light Cycler, 2krát RotorGene, 1krát ABI Prism; standardy: 5krát komerční (4krát Ipsogen, 1krát Roche), 2krát vlastní plazmidy. Hodnotili jsme citlivost metody a lineritu měření, hladinu transkriptů kontrolního a BCR-ABL genu. Stanovili jsme orientační přepočtové koeficienty vzhledem k NRL ÚHK Praha, jejíž metoda je analyticky i klinicky validovaná a akreditovaná ČIA.

Výsledky: Výsledky opět potvrdily nelinearitu metody používající kontrolní gen ABL při hodnotách vyšších než 10% BCR-ABL. Proto je možno orientační přepočtové koeficienty používat pouze v oblasti společné linearitě metod, tj. do 10% BCR-ABL. Přepočtové koeficienty u laboratoří používajících primery, sondy a standardy doporučené EAC (Ipsogen) jsou v lineární oblasti blízké 1. Proto doporučujeme všem laboratořím, aby tyto produkty používaly. Porovnávání a standardizace tak budou jednodušší.

P54 – 1190

Terapie systémového přetížení železem kombinací chelatačních léků u pacienta s myelodysplastickým syndromem a vrozenou hemochromatózou: kazuistika

J. Vondráková, K. Indrák, M. Vránová, J. Procházková, L. Kučerová

Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc; Oddělení klinické hematologie Městské nemocnice Ostrava-Fifejdy; Ústav patologie Lékařské fakulty UP a FN Olomouc

Přetížení železem (Fe), ať již vzniklé na podkladě primární poruchy, jako je vrozená hemochromatóza, či způsobené sekundárně např. u polytransfundovaných nemocných, vede k závažnému poškození orgánů až životohrožujícím stavům. Hledají se proto cesty, jak tomuto problému předjít a nadbytečné železo z organismu eliminovat. U vrozené hemochromatózy se provádějí venepunkce, u polytransfundovaných nemocných je podávána chelatační terapie většinou v monoterapii. Předmětem sdělení je popis případu pacienta s multifaktoriální poruchou metabolismu železa při vrozené hemochromatóze typu 1 s heterozygocí H63D genu HFE a současně s myelodysplas-

tickým syndromem typu RARS, IPSS 0, low risk se známami systémového přetížení železem vedoucího k orgánové toxicitě (kardiopatie, hepatopatie, diabetes mellitus, arthropatie). Anémie nedovolila odstraňovat nadbytečné Fe venepunkcemi, proto byla zahájena chelatační léčba deferiprone v dávce 40 mg/kg/den (tj. 6 tbl. Ferriproxu denně) při vstupním Hb 88 g/l a feritinu 1 273 µg/l, zároveň byl podáván rekombinantní erythropoetin v dávce 30 000 j. týdně. Trvající anemizace a nutnost intermitentní substituce transfuzemi (hodnoty Hb 70–80 g/l) vedla k další zátěži nadměrným Fe, a proto indikujeme kombinovanou chelatační terapii s využitím terapeutického potenciálu rozdílných preparátů a za podmínek zachování uspokojivé kvality života pacienta. Ponecháváme per os deferiprone 40 mg/kg/den jen 5 dní v týdnu a zbývající 2 dny aplikujeme pomocí infuzoru v kontinuální infuzi deferoxamine (Desferal) v dávce 28 mg/kg/den. Léčba je pacientem dobře tolerována, bez výraznějších nežádoucích účinků, probíhá plně v ambulantním režimu. Dosahujeme požadovaného terapeutického efektu, který verifikujeme monitorací hladiny feritinu (pokles na 348 µg/l), zároveň dochází i k regresi hepatopatie a snižuje se spotřeba dávek inzulinu. Z uvedeného příkladu komplikovaného pacienta s těžkým systémovým přetížením Fe lze usuzovat, že kombinovaná chelatační léčba může být prospěšná zejména tehdy, kdy dosud obvyklá monoterapie selhává.

P55 – 1188

Výsledky studie QOL-A2004: Kvalita života onkologických pacientů po autologní transplantaci periferních krvetvorných buněk

V. Kajaba, P. Řehořová, M. Zítková, E. Bystřická, V. Pavlicová, J. Študlová, H. Poláčková

Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc; I. interní klinika 1. lékařské fakulty UK a VFN Praha; Interní hematoonkologická klinika Lékařské fakulty MU a FN Brno, pracoviště Bohunice; Hemato-onkologické oddělení FN Plzeň; II. interní klinika Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové

Úvod: Hodnocení kvality života ve vztahu ke zdraví (HR-QOL) se dostává do podvědomí v medicíně od 90. let 20. století. V oblasti klinického hodnocení je sledování kvality života ve vztahu ke zdraví nedílnou součástí studií. Zejména v prvním roce po převodu autologních krvetvorných buněk některé závěry studií ukazují nepříznivý dopad na kvalitu života nemocných. Od roku 2004 probíhá na klinice prospektivní hodnocení kvality života vztažené ke zdraví (Health-related Quality of Life – HR-QOL) u nemocných s plánovanou autologní transplantací krvetvorných buněk. V roce 2005 se do projektu zapojila další transplantáčnící centra v ČR a studie probíhá jako multicentrická současně na pracovištích ve FN Olomouc,

FN Brno-Bohunice, VFN Praha, FN Hradec Králové a FN Plzeň.

Výsledky: Pacienti nastupující na transplantační jednotku hodnotí svou kvalitu života téměř shodně jako zdravá populace. K zásadnímu poklesu kvality života dochází při hodnocení 10 dní po TKB (čas T1). Ve 2/3 parametrů došlo ke zhoršení sledovaných oblastí kvality života. Ke změně dochází také v případě laboratorních parametrů – medián hladiny hemoglobinu klesá v čase T1 na 93 g/l, medián hladiny trombocytů na $22 \times 10^9/l$ a medián hladiny leukocytů na $0,5 \times 10^9/l$. Uvedený pokles laboratorních parametrů nebyl ve většině případů statisticky významný ve vztahu k sledovaným parametrům kvality života – výjimkou je vztah hladiny Hb a subjektivně vnímanou dušností a únavou pacienta.

Diskuse: Včasně indikovaná transplantace zvyšuje šanci na uzdravení či prodlužuje život bez známek onemocnění. V některých případech je transplantace jedinou kurativní možností, kterou můžeme pacientovi nabídnout. Na druhé straně zde máme kvalitní paliativní péči, která sehrává svou nezastupitelnou roli v případě selhání kurativních možností. V obou případech je sledování a hodnocení kvality života důležitou součástí ve vztahu pacienta, rodiny, blízkých a ošetřujícího týmu. Na některé otázky nám studie odpověděla – kvalita života se v čase po ASCT rychle vrací na úroveň zdravé populace, naopak některé další otázky stojí před námi – vybrané ukazatele je vhodné validovat s delším časovým odstupem – optimálně 3–5 let po ASCT už jenom proto, že např. sociální oblast či finanční nezávislost vyžadují podrobnější údaje s delším časovým obdobím sledování. Vhodné se jeví položení dalších otázek – nástup do zaměstnání, trvání „nemocenské“, přiznání částečného/plného invalidního důchodu.

P56 – 1169

Souvislost polymorfizmů genu MAdCAM-1 se vznikem komplikací po alogenní transplantaci kmenových krvetvorných buněk

Z. Ambrůzová, A. Štáhelová, K. Indrák, M. Petřek, L. Raida, E. Faber, F. Mrázek

Ústav imunologie Lékařské fakulty UP a FN Olomouc; Hemato-onkologická klinika Lékařské fakulty UP a FN Olomouc

Úvod: MAdCAM-1 (Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1) je adhezivní molekula endoteliálních buněk, která se váže s integriny na povrchu leukocytů (např. LPAM-1). Významně se tak uplatňuje při směřování T-lymfocytů dárce do slizničních tkání příjemce při rozvoji reakce štetu proti hostiteli (GVHD) po alogenní transplantaci kmenových krvetvorných buněk (TKB). Variabilita struktury a exprese molekuly MAdCAM-1 podmíněná genovými

polymorfizmy může proto ovlivňovat výskyt a závažnost komplikací po TKB.

Cíl: Zhodnotit, zda vybrané jednonukleotidové polymorfizmy (SNP) genu pro MAdCAM-1 jsou asociovány s rozvojem akutní či chronické GVHD a zda ovlivňují přežívání po TKB.

Pacienti a metody: Tři vybrané běžné polymorfizmy genu MAdCAM-1 (rs758502 C/T, rs2302217 A/G, rs3745925 G/T) byly vyšetřeny metodou PCR-SSP u 87 pacientů a jejich příbuzných (n = 70) nebo nepříbuzných (n = 13) HLA-identických dárců kmenových krvetvorných buněk.

Výsledky: Rozložení genotypů všech vyšetřovaných polymorfizmů bylo v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou. Statistická analýza odhalila častější výskyt chronické GVHD u MAdCAM-1 AA (rs2302217) homozygotních pacientů než u příjemců s ostatními genotypy – 68,7 % proti 38,3 %; $p = 0,03$ ($p_{\text{corr}} = \text{NS}$). Při analýze přežívání jsme zjistili, že pacienti s genotypem MAdCAM-1 GG (rs3745925) měli nižší kumulativní úmrtnost spojenou s transplantací (TRM) než jedinci s jinými genotypy ($p = 0,06$). Ve vyšetřovaném souboru nebyly nalezeny žádné asociace mezi variantami genu MAdCAM-1 a rozvojem akutní GVHD nebo celkovým přežíváním po TKB.

Závěr: Výsledky této studie naznačují, že polymorfizmy genu MAdCAM-1 mohou souviset s rizikem rozvoje chronické GVHD a ovlivňovat úmrtnost na komplikace TKB. Získaná pilotní data je nezbytné zhodnotit na větším souboru pacientů.

Tato práce byla podpořena Výzkumným záměrem MSM 6198959205 a grantem IGA MZ ČR NR 9099.

P57 – 1168

Choice of endothelial marker is crucial for quantification of bone marrow microvessel density in chronic lymphocytic leukemia

L. Smolej, P. Kašparová, D. Belada, O. Široký, P. Žák
Oddělení klinické hematologie II. interní kliniky Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové; Fingerlandův ústav patologie, Lékařská fakulta UK a FN Hradec Králové

Introduction: Angiogenesis is a potential prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia (CLL). However, results of studies assessing bone marrow neovascularization in CLL are controversial, in part due to different antibodies used for immunohistochemical identification of endothelial cells and different methods of assessing microvessel density (MVD). Moreover, there are insufficient data regarding relationship of marrow angiogenesis to prognostic markers in CLL.

Methods: Therefore, we analyzed MVD in bone marrow biopsies from untreated patients with CLL using immu-

nohistochemical staining of endothelial cells with monoclonal antibodies against CD34 (n = 22) and von Willebrand factor (vWF, n = 17) as well as 17 age- and sex-matched controls. MVD was quantified using „hot spot“ method. Furthermore, CLL cohort was subdivided according to clinical course (stable vs progressive), Rai stage (0 vs I–IV), pattern of marrow infiltration (non-diffuse vs diffuse), genetic abnormalities (favourable vs unfavourable), and IgVH mutation status (mutated vs unmutated).

Results: MVD was significantly elevated in CLL vs controls using either antibody (CD34, mean \pm standard deviation [SD], 75.6 ± 50.6 , 95% confidence interval of mean [CI], 53.2 – 98.1 vessels/mm² vs 47.4 ± 21.8 , 95% CI 36.2 – 58.6 vessels/mm², $p = 0.039$; vWF, 21.3 ± 16.5 vessels/mm², 95% CI 13.1 – 29.5 vs 11.5 ± 8.5 , 95% CI 6.8 – 16.2 vessels/mm², $p = 0.017$). However, no significant MVD differences were detected between CLL subgroups with regard to any of abovementioned prognostic factors. Interestingly, there was a significant difference between MVD counts according to antibody used: MVD was higher using CD34 vs vWF in CLL as well as control group ($p < 0.0001$ for both).

Conclusions: This study supports the hypothesis that microvessel density is significantly elevated in CLL. However, we did not observe significant MVD differences between CLL subgroups with regard to classical or modern prognostic factors. Importantly, staining with anti-CD34 resulted in significantly higher MVD counts than with anti-vWF antibody. Larger studies using unified and standardized method for neovascularization are needed to allow direct comparison of results between different centers and elucidate the real clinical significance of bone marrow angiogenesis in CLL.

Supported by research project MZO 00179906 from Ministry of Health, Czech Republic.

P58 – 1167

Plazmatické koncentrace solubilního endoglinu mají prognostický význam u nemocných s chronickou lymfocytární leukemií

L. Smolej, C. Andrýs, D. Belada, M. Hrudková, P. Žák, J. Krejssek, J. Malý

Ústav klinické imunologie a alergologie Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové; Oddělení klinické hematologie II. interní kliniky Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové

Angiogeneze je v současnosti intenzivně zkoumána u řady hematologických malignit včetně chronické lymfocytární leukemie (CLL). Endoglin (CD105) je součástí komplexu receptorů pro transformující růstový faktor β (TGF- β) a je nepostradatelný pro novotvorbu cév. Solubilní forma endoglinu (sCD105) byla zjištěna ve zvýšených koncen-

tracích v krvi u nemocných se solidními nádory a některými hematologickými malignitami. Cílem naší studie bylo zjistit eventuální prognostický význam solubilního endoglinu u CLL. Měřili jsme sCD105 v plazmě periferní krve metodou ELISA u 79 nemocných s neléčenou CLL a 69 zdravých dobrovolníků. Zjistili jsme významně zvýšené koncentrace sCD105 u nemocných s CLL vůči kontrolám (průměr \pm standardní odchylka: $6,8 \pm 2,1$ vs $4,6 \pm 1,5$ ng/ml, 95% interval spolehlivosti průměru $6,4-7,3$ vs $4,2-4,9$ ng/ml, $p < 0,0001$). Nemocní s progresivní chorobou měli vyšší koncentrace sCD105 v porovnání s pacienty s indolentním průběhem ($p = 0,0016$). Byly prokázány významné rozdíly v koncentracích sCD105 v souvislosti s klinickým stadiem dle Raie ve smyslu vzestupu endoglinu od časných přes intermediární k pokročilým stadiím ($p = 0,009$ a $p = 0,04$). Přežití do progresu bylo významně kratší u nemocných s CLL, kteří měli hodnotu sCD105 vyšší než průměr (medián 15 měsíců vs nedosažen, $p = 0,0045$). Naše výsledky naznačují, že endoglin by mohl hrát významnou roli v patogenezi a progresi CLL a jeho hodnocení by mohlo přispět ke zlepšení poznání angiogenních procesů u CLL a individuální prognostické stratifikaci.
Podpořeno výzkumným záměrem MZO 00179906 Ministerstva zdravotnictví ČR.

P59 – 1166

Contribution of hemapheresis to the improvement of microcirculatory disorders

M. Bláha, R. Malý

Oddělení klinické hematologie II. interní kliniky Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové; I. interní klinika Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové

Introduction: Rheologic parameters play an important role in good microcirculatory functions. The single rheopheresis treatment simultaneously eliminates an exactly defined spectrum of high-molecular weight rheologically relevant plasma proteins [i.e. α 2-macroglobulin, fibrinogen, LDL-cholesterol, lipoprotein(a), von Willebrand factor (vWF), immunoglobulin M (IgM), fibronectin, and putatively multimeric vitronectin]. This results in the immediate pulsed reduction of plasma viscosity as well whole blood viscosity, which with a series of treatments can lead to sustained microcirculatory recovery, and change significantly the natural course of a chronic disease. We summarise our experience.

Methods and patients: In the prospective trial presented here, 28 patients were treated – severe familiar hypercholesterolemia (FH): 4 pts; non-healing lesions caused by severe ischemic diabetic foot syndrome (IDFS): 5 pts; age related macular degeneration (AMD): 13 pts; acute sensorineural hearing loss (ASHL): 3 pts; thyroid orbital

endocrinopathy (TAO): 3 pts. Our own modification of rheopheresis was used: Plasma, free from cellular elements is obtained by blood cell separator (Cobe-Spectra, Denver, USA) in high-speed centrifugation. Then it is run through the „second stage“ – a rheofilter (Evaflux 4A, Kuraray). Basic amount of processed plasma (calculated by Cobe computer) is 1.5 of body volume. Haematological, biochemical and haemorheological parameters were measured before and after procedures and after the finishing of therapeutic series (AMD 8 procedures, IDFS 10, ASHL 3, TAO 10).

Results: Rheological procedures were very effective and resulted in significant decreases of pathologically effective substances: α 2-macroglobulin 56.79 %, fibrinogen 63.50 %, IgM 60.49 %, LDL-cholesterol 70.27 %, apolipoprotein B 69.88 %, lipoprotein(a) 62.90 %. It resulted in blood and plasma viscosity decrease (10.88/15.43 %). Diabetic foot ulcers were healed in 3 of 5 pts. No progression from dry to wet form of AMD has been observed during 2 years. 6.60 % of side effects were observed; they were not severe, transient and easily controlled.

Conclusion: Hemorheopheresis appears to be a suitable method of adjunct therapy for diseases involving severe disturbance of microcirculation, especially when previous therapeutic options were not sufficiently effective or invasive procedures cannot be applied.

Supported by the research task of IGA MH CZ NR/9118-3.

P60 – 1164

Safety precautions against infection transmission during stem cell transplantation

M. Bláha, V. Štěpánová, P. Žák, M. Blažek, L. Jebavý, E. Štěpánová, P. Měříčka, S. Filip, R. Zimová, I. Fátorová, J. Malý

Oddělení klinické hematologie II. interní kliniky Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové; Ústav mikrobiologie Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové; Tkáčová ústředna Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové; Klinika onkologie Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové; Státní ústav pro kontrolu léčiv Praha

Introduction: The problem of safety assurance for cell and tissue transplantation is very urgent. The problem is very broad generally and includes several specific issues, such as setting the criteria for donor screening and testing, examination of the collected and processed tissues, producing standard operating procedures, establishing a system for tracking the tissue from donor to the recipient, developing a system for monitoring physical parameters during low temperature preservation, quality control of solutions, medical devices and chemicals used, continuous training of the staff and regular testing of quality of the environment. In our work, attention is fo-

cused only on particular issue: danger of infection transmission by infusion of cryopreserved PBPC (peripheral blood progenitor cells) to the patients.

Materials and methods: 85 persons were examined – 75 patients with lymphoma, multiple myeloma and leukemia before autologous transplantation and 10 healthy donors for allogeneic transplantation were examined for serological markers of viral hepatitis A (VHA), B (VHB), C (VHC), human immunodeficiency virus (HIV), HTLV (human T-cell leukemia virus), herpesviruses (HSV), cytomegalovirus (CMV), varicella-zoster virus (VZV), Epstein-Barr virus (EBV), toxoplasmosis and syphilis by enzyme immunoassays from 2005 to 2006. In indicated cases polymerase chain reaction (PCR) and further serological examinations and follow-up confirmed the positive serological results and monitored the clinical course of infection.

Results: No signs of active infection were found in 5 donors (50 %) and 60 patients (80 %), no serological positivity of HIV or HTLV, no recent VHA infection. HBsAg was negative in all patients, 2 patients had VHB in their history. Rare anti-HCV reactivity (2 patients) was never confirmed positive. Both markers of HSV active infection (10 patients and 3 donors) and VZV (9 patients and 2 donors) were common. We must admit the possible cross reactivity in the IgM antibody response to herpetic viruses in patients with the serological markers of multiple infection. CMV IgM was detected in 3 patients. Toxoplasmosis IgM reactivity in 2 cases was not confirmed positive and was concluded as nonspecific.

Conclusions: Clinically unsuspected, viral infections (also in healthy donors) are common and justify the palette of tests despite of high demands and costs.

Supported by the research task MH CZ MZO 00179906.

P61 – 1151

Psychological and psychosocial intervention in oncological and haematooncological patients treated with haematopoietic stem cell transplantation – its importance and position in anti-tumorous therapy in view of the haematologist and the oncologist

L. Slováček, B. Slováčková, Z. Hrstka, V. Pavlík, J. Petera, S. Filip

Klinika onkologie a radioterapie Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové; Psychiatrická klinika Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové; Katedra vojenské hygieny Fakulty vojenského zdravotnictví UO Hradec Králové

Background: We present a problem of psychological and psychosocial intervention in oncological and haematooncological patients, its importance and attitude in global anti-tumorous therapy.

Aims: We can claim that psychological and psychosocial intervention have its own firm and indispensable post in complex care about oncological or haematooncological patient. Its importance is focused mainly to personal profile of oncological patients, social support and applied psychotherapy in these specific cohort of patients. Both types of interaction help clinical oncologist or haematologist to perceive changes in state of health of patients in wider view.

Conclusions: These are the informations that enrich our knowledge of patients urges and so can help to improve the medical care. They also enable to reveal the mechanisms that modify rise and course of disease. Mainly abroad there are very good experiences with so called “Quality of Life Team”. These teams are personally composed of the physician – oncologist or haematooncologist, nurses with a specialization to oncology educated in problematics of quality of life of oncological patients, clinical psychologist, psychotherapist, social staff member and data manager. Reason to make such a special team is that care about patient and his family is prepares the background to which the patient can return after the anti-tumorous therapy and which influences his adaptation.

P62 – 1150

Psychosocial, health and demographic characteristics of quality of life of oncological and haematooncological patients treated with haematopoietic stem cell transplantation

L. Slováček, B. Slováčková, Z. Hrstka, V. Pavlík, J. Petera, S. Filip

Klinika onkologie a radioterapie Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové; Psychiatrická klinika Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové; Katedra vojenské hygieny Fakulty vojenského zdravotnictví UO Hradec Králové

Background: Quality of life (QOL) is defined as “a patient’s subjective evaluation of his life situation”. Definition of is based on Maslow’s theory of needs (the need to sleep, to eat, to drink etc).

Aims: QOL term contains the information on an individual’s physical, psychological, social and spiritual condition.

Methods: QOL evaluation is carried out by means of generic and specific questionnaires. Generic QOL questionnaires generally evaluate a patient’s overall condition regardless his disease. Specific QOL questionnaires are designed for the evaluation of a patient’s overall condition in a particular type of disease. Modules are often used with these specific QOL questionnaires. These modules are focused on specific symptoms and complaints in a particular type of disease. The areas investigated in QOL questionnaires usually include: patient’s physical

functions, patient's psychological functions, patient's social functions, including his financial situation, his integration into the society, spiritual aspects (interests, hobbies), symptoms which are specific for a particular disease.

Conclusions: It is common in the clinical practice to evaluate a patient's health condition and the success of the therapy based only on one type of markers, the most often by means of somatic, laboratory or detecting markers. The trend in modern clinical medicine is to evaluate a patient's health condition in a more complex way, using other aspects. The QOL means more dimensional evaluation of a number of life aspects. Different aspects can be affected in a different way in a different phase of the disease and its therapy. That is why this information enriches our knowledge concerning patient's needs and it can significantly contribute to the medical treatment improvement. It can also help us to reveal the mechanisms which modify the origin and the course of disease. There is a very good experience abroad with "Quality of Life Team" which consists of a treating physician (an oncologist), nurses who are educated in the problem of the QOL for patients, a clinical psychologist, a psychotherapist, a social worker and also a data manager. The reason why to establish these special teams is that by providing care to the patient and support to his family a good surrounding for the patient after HSCT can be created after his return home. This good surrounding can help the patient to adopt well.

P63 – 1149

Nízkomolekulové heparíny a nádorové ochorenie

J. Chudej, I. Plameňová, J. Hudeček, J. Staško, P. Chudý, P. Bánovčín, P. Kubisz

Klinika hematológie a transfuziológie Jesseniovej lekárskej fakulty UK a MFN Martin, Slovenská republika; II. interná klinika Jesseniovej lekárskej fakulty UK a MFN Martin, Slovenská republika

Zmeny v hemostáze sprevádzajúce malígne ochorenia sú známe viac ako 100 rokov. Je známe, že riziko týchto komplikácií je vyššie u pacientov s aktívnym zhubným ochorením a pri generalizovaných formách. Trombóza je najčastejšou komplikáciou a po infekcii 2. najdôležitejšou príčinou smrti pri prítomnosti nádorového ochorenia. U pacientov s nádormi sa klinické prejavy tromboembolizmu zisťujú v 26 %, avšak pitevné nálezy poukazujú na incidenciu až 50 %. Pacienti s idiopatickou venóznou trombózou majú 3–19-násobne vyššiu pravdepodobnosť súčasného diagnostikovania nádoru. Poruchy hemostázy sa často vyskytujú asymptomaticky. Častejšie sú trombofilné než hypokoagulačné stavy. Riziko tromboembolic-

kých komplikácií môžu pritom zvyšovať aj ďalšie predisponujúce faktory: imobilita, operačný zákrok, chemoterapia, infekcie, hormonálna liečba, použitie centrálnych venózných katétrov. Riziko trombózy je spojené najmä s liečbou vysokodávkovanými kortikoidmi, cisplatinou, mitomycínom C, talidomidom, ale aj s hormonálnou liečbou tamoxifénom. Častý je aj paradoxný výskyt krvácajúcich a trombotických komplikácií súčasne alebo s časovým odstupom u toho istého pacienta. Súčasný výskyt trombózy pri malígnych ochoreniach, známy ako Trosseauov syndróm, môže byť ich včasným príznakom. Keďže výskyt týchto komplikácií je u pacientov s nádormi skutočne vyšší, malo by to ovplyvniť aj liečebné postupy. Objavili sa práce poukazujúce na účinnosť nízkomolekulového heparínu (LWMH) v prevencii a liečbe venózneho tromboembolizmu (VTE) vzniknutého v súvislosti s malígnym nádorovým ochorením. Štúdia CLOT dokázala, že dalteparín je u pacientov s malignitou a súčasne prítomným VTE efektívnejší ako perorálna antikoagulačná liečba. Štúdia FAMOUS naznačila, že dlhodobé užívanie dalteparínu v porovnaní s placebom zlepšilo prežívanie pacientov s pokročilými solídnymi tumormi. Táto skutočnosť je spôsobená tým, že LWMH majú antineoplastické účinky, vrátane priamych antitumoróznych, imunomodulačných vlastností a pôsobia tiež proti angiogénze. Pre onkologických pacientov sú zvlášť výhodné známe prednosti LWMH: minimum laboratórných testov, menej kontrol, výhodnejšia aplikácia, možnosť ambulantnej liečby. Tieto skutočnosti sú dôležité, nakoľko minimalizujú nutnosť hospitalizácie a výrazne zlepšujú kvalitu života onkologického pacienta.

P64 – 1263

Trombofilné stavy

B. Machová, Ľ. Babinská

Klinika hematológie a transfuziológie Jesseniovej lekárskej fakulty UK a MFN Martin, Slovenská republika

Trombofilné stavy môžeme charakterizovať ako chorobné stavy prejavujúce sa tromboembolickými príhodami v mladších vekových skupinách a v neobvyklých lokalizáciách. Ide o sklon k zvýšenej zrážanlivosti krvi na podklade vrodenej alebo získanej poruchy hemostatickej rovnováhy, pri ktorej vzniká prevaha prokoagulačných faktorov nad antikoagulačnými. Vrodené trombofilné stavy charakterizuje prítomnosť niekoľkých druhov mutácií v génoch ovplyvňujúcich zrážanlivosť krvi, v dôsledku čoho je vysoké riziko rozvoja tromboembolickej choroby a následnej hlbokožilovej trombózy. Získané trombofilné stavy sú dané životnými situáciami súčasných ľudí. Stretávame sa s nimi napr. pri zhubných nádorových ochoreniach, v pooperačnom období, v priebehu tehotenstva, pri hormonálnej liečbe a hormonálnej antikoncepcii. Liečba

trombofilních stavov spočívá především v prevenci a intenzivní antikoagulační léčbě.

P65 – 1236

Ošetřování tracheostomické kanyly u pacienta s Burkittovým lymfomem hypofaryngu: kazuistika

V. Dvořáková, K. Medová, J. Šmídová

I. interní klinika 1. lékařské fakulty UK a VFN Praha

U pacientů s agresivním Burkittovým lymfomem, který infiltruje krční uzliny a rychle se zvětšuje nebo prorůstá do dýchacích cest, může lymfomová masa způsobit útlak dýchacích cest. Obvykle je zavedena v úvodu tracheostomie na zajištění jejich průchodnosti. Nedílnou součástí úspěšné léčby kromě chemoimunoterapie je pravidelné ošetřování tracheostomické kanyly. U 75letého pacienta byl v srpnu roku 2007 diagnostikován Burkittův lymfom s rozsáhlým tumorem krku 10 × 6 × 6 cm, který infiltroval hypofarynx a způsoboval i útlak jícnu. Subjektivně pacient udával dechové a polykací obtíže. Kovová tracheostomická kanyla č. 11 byla zavedena 10. 8. 2007 a 6. 9. 2007 byla zahájena chemoimunoterapie, která s pauzami aplikována do března roku 2008. Součástí ošetřování tracheostomické kanyly byla pravidelná kontrola kanyly. Kanyla byla vyměňována 1krát denně, vnitřek kanyly byl vyměňován a čištěn speciálním kartáčkem podle potřeby. Poté byla kovová kanyla včetně zavaděče dezinfikována (Sekusept pulv.) a poté sterilizována v horkovzdušném sterilizátoru. Pravidelně byl odsáván sekret z dýchacích cest při hromadění hlenu a podávána expektorancia a mukolytika (ambroxol hydrochlorid a acetylcystein). Několikrát denně byla provedena hygiena okolí stomatu tracheostomické kanyly a kůže, aby nedocházelo k maceraci. Okolí stomatu bylo vždy omyto sterilní apyrogenní Aquou pro injekce a následně ošetřeno indifferenčním ochranným krémem (Menalind professional). Ve spolupráci s rehabilitačními pracovníky a rodinnými příslušníky byla zajišťována dechová rehabilitace a pohybová aktivita pacienta. Při postupném zmenšování lymfomu s ústupem útlaku dýchacích cest a jícnu byla 3. 12. 2007 vyměněna kovová kanyla za umělohmotnou kanylu Portex Blue Line Ultra (15 mm connector; 8,0 mm ID). Vnitřek umělohmotné kanyly byl čištěn opakovaně v průběhu dne podle potřeby (jako u výše popsané kovové kanyly). Umělohmotná kanyla byla vyměňována 1krát měsíčně. 1. 2. 2008 bylo otorinolaryngologickým vyšetřením potvrzeno vymizení stenózy trachey a tracheostomická kanyla byla úplně odstraněna s postupným uzávěrem otvoru po tracheotomii. Stoma bylo překryto sterilním mulovým tamponem s denní výměnou. U pacienta došlo ke zlepšení fonace. Při dodržení stanoveného postupu při

ošetřování tracheostomie je možné snížit výskyt komplikací v průběhu léčby a přispět k obnovení kvality života, srovnatelnou s obdobím před onemocněním.

P66 – 1232

Ošetřování otevřené rány po excizi tumoru hrudní stěny u pacienta léčeného pro Hodgkinův lymfom: kazuistika

I. Řehořová, H. Poláčková

I. interní klinika 1. lékařské fakulty UK a VFN Praha

U 19letého nemocného byly 27. 2. 2007 pro předpokládaný absces hrudní stěny parasternálně vlevo chirurgicky odstraněny nekrotické hmoty, které byly histologicky nehodnotitelné. Pro generalizovanou lymfadenopatii s nočními poty, váhovým úbytkem nad 10 %, subfebriliemi a svěděním kůže byl pacient přijat na I. interní kliniku VFN Praha. Dne 2. 3. 2007 byl z exstirpované lymfatické uzliny z pravé axily zjištěn Hodgkinův lymfom. Od března roku 2007 do srpna roku 2007 pacient absolvoval 8 cyklů agresivní chemoterapie (BEACOPP eskalovaný) pod antibiotickým krytím (ciprofloxacin a klindamycin) a následně do října roku 2007 byla aplikována radioterapie na reziduální nádor. Po ukončení léčby je pacient v remisi, bez známek onemocnění. Od začátku chemoterapie byla otevřená rána na hrudníku o průměru 5 cm (objem 7 ml) s nádorovými nekrózami, fibrinovým povlakem a hnisavou sekrecí ošetřována ve spolupráci s chirurgickou klinikou a s Centrem pro hojení ran VFN. Výplachy rány se prováděly Prontosanem (0,1 % Undecylenamidopropyl Betaine; 0,1 % Polyaminopropyl Biguanide), Silvercel (Hydro-Alginate, vlákna obohacená ionty stříbra). Výplachy rány i převazy prováděny denně. Po 6 týdnech léčby došlo k ústupu hnisavé sekrece s přetrváváním fibrinových povlaků. Péče o ránu byla změněna: výplachy rány Prontosanem, Nu-gel (Hydrogel s alginátem) a sterilní krytí Surgipad (absorpční obvaz ke krytí secernujících ran). Přejídně při mírném zvětšení velikosti rány byl aplikován proužek Aquacelu Ag (Hydrofiber – krytí se stříbrem) a sterilní krytí s převazy po 3 dnech. V případě objevení se povlaků v ráně byl použit proplach Prontosanem, Nu-gelem a aplikovány proužky Actisorbu se sterilním krytím. Při trvajícím povlaku chronického kožního defektu byl po 3 měsících výše uvedené lokální léčby aplikován Hyiodine (Hyaluronan-Jodid-Jód) a nadále Prontosan a sterilní krytí. Po ukončení chemoterapie nadále trvá otevřený objemný defekt (6 ml), který ale již bez přítomnosti nekrotických a nádorových hmot, bez povlaku a sekrece. Lokálně aplikován výplach Prontosanem, Silvercel a sterilní krytí. Důležitou součástí úspěšné celkové a lokální léčby byla edukace pacienta a rodiny, která dále pokračovala v domácí ošetrovatelské péči o ránu pacienta. Pozornost byla vě-

nována i péčí o pokožku z důvodu fixace sekundárního krytí. Okolí defektu se ošetřovalo Betadine (Lodopovidonum 100 mg v 1 ml vodného roztoku, ředěno 1 : 100). V lednu roku 2008 byla u nemocného úspěšně provedena plastika reziduálního kožního defektu na hrudní stěně.

P67 – 1211

Nové možnosti ošetřování mukozitidy dutiny ústní u pacientů po transplantaci krvetvorných buněk

J. Škardová, K. Kabátová-Maxová, S. Vokurka

Hematologicko-onkologické oddělení FN Plzeň

Úvod: Mukozitida dutiny ústní (MDÚ) po chemoterapii a transplantaci krvetvorných buněk představuje významný ošetrovatelský problém. Lokální péče o dutinu ústní s pravidelnými výplachy vhodnými roztoky je standardní součástí ošetřování pacienta postiženého MDÚ. Pacientovi umožňujeme volit např. roztoky Skinsept, Florsalmin, Tantum, fyziologický roztok s mezokainem nebo balenou vodu s ohledem na přání a snášenlivost roztoků u pacienta. Gelclair je vodou ředitelný gel vytvářející na sliznici lehce vazký film, kryjící slizniční defekty. Efektem má být i několikahodinový pocit úlevy od bolesti a následně i zlepšení perorálního příjmu.

Cíl: Ověření efektu a tolerance Gelclairu u pacientů s defekty sliznic dutiny ústní při MDÚ.

Metodika: Prospektivní nesponzorované sledování se souhlasem pacienta, hodnocení tíže MDÚ dle WHO, délka a četnost užívání gelu, hodnocení gelu pacientem dle VAS (1 = výborné, 3 = uspokojivé, 5 = nesnesitelné), vliv na perorální příjem, úleva od bolesti a trvání účinku Gelclairu.

Soubor: Pacienti s MDÚ s přítomností defektů sliznic (stadium 2–4 dle WHO kritérií) po alogenní transplantaci krvetvorných buněk.

Výsledky: V období leden–březen roku 2008 bylo sledováno prvních 7 pacientů. Maximální stupeň MDÚ: 2 (71 %), 3 (29 %), 4 (0 %). Průměr dní užívání gelu: 7,8 (5–13) dní. Průměr užití za den: 2,7krát (2–3krát) denně. Průměr hodnocení pacientem: 3 (2–5). Příjem stravy po gelu: lepší (33 %), nezměněn (66 %), horší (0 %). Úleva od bolesti po gelu: velmi dobrá (0 %), dobrá (17 %), uspokojivá (17 %), slabá (66 %), žádná (0 %). Trvání účinku gelu: až 3 hod (83 %), až 5 hod (17 %).

Závěr: První výsledky dokládají předpokládaný krátkodobý a také částečný analgetický efekt, s rozdílnou oblíbeností přípravku ze strany pacientů a bez zřetelně nežádoucích doprovodných účinků.

Diskuse: Gelclair rozšiřuje možnosti doposud zavedené ošetrovatelské péče u pacientů s MDÚ. Pacientům může být individuálně nabízen s ohledem na jejich přání a s vědomím, že částečně může přispívat ke zmírnění obtíží při

MDÚ. Naše dosavadní sledování zatím neukazují na zvýšení rizika infekcí v dutině ústní během užívání Gelclairu.

SDĚLENÍ PŘIJATÁ POUZE K PUBLIKACI

1290

Adaptace na nemoc, obranné mechanismy a jejich selhání

A. Škrobánková

Oddělení klinické psychologie FN Olomouc

Diagnóza maligního onemocnění je vždy výrazným zásahem do života člověka. Nemoc má velký dopad na jeho sebepojetí, na to, jak se vidí, chápe a hodnotí. V relativně krátkém čase se musí nemocný vyrovnat se spoustou věcí, mezi něž patří např. změna osobní identity, změna role, kterou zaujímá v běžném životě, očekávání do budoucna. Na všechno toto musí nějakým způsobem reagovat. Podařeba psychické reakce na nemoc je dána zejména osobností nemocného a fyzickými projevy somatického onemocnění. Z dalších činitelů jsou to pak věk, životní zkušenosti, vzdělání, informovanost, očekávání, sociální zázemí. Mezi nejčastěji se objevující emoční reakce pak patří deprese, anxieta, popření a regrese. Každá z nich může ve zvládnutí závažného onemocnění pomoci, ale ve své maladaptivní formě také uškodit. V krajních případech mohou být diagnostikovány poruchy přizpůsobení, ev. závažná psychiatrická onemocnění.

1189

Is it important to perform liver biopsy after allogeneic transplantation?

A. Zavřelová, M. Cermanová, P. Žák, V. Tyčová

Oddělení klinické hematologie II. interní kliniky Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové; Fingerlandův ústav patologie, Lékařská fakulta UK a FN Hradec Králové

Purpose: To evaluate how often was liver impairment caused due to graft versus host disease after allogeneic transplantation.

Methods: From year 2004 to 2007 we performed liver biopsy in 17 patients (pts) because of the liver impairment after allogeneic stem cell transplantation. The biopsy was performed in each patient every time, we could not state the diagnosis from blood tests for sure. We confirmed GVHD etiology just in 11 pts (65%). 4 pts was diagnosed with toxic liver impairment, probably due to wide range of medication. 1 patient was diagnosed with sinusoidal obstructive syndrome and in 1 case we proved EBV affection in combination with autoimmune hepatitis. There was no liver failure or progression of liver function

test in 6 pts, which we did not treat as GVHD according to the biopsy finding. As for liver function testing (bil, ALT, AST, ALP, GMT) we did not find any important difference in this two cohort of pts. Pts with GVHD and other had nearly similar laboratory results in the time of biopsy. It was interesting, that in histology examination we proved severe liver hemosiderosis in 8 pts (47%) and moderate liver hemosiderosis in 5 pts (29%). In 6 pts we were also able to evaluate iron storage in liver tissue, it was increased in each case, in some cases there was very severe iron overload (range 2,860–11,310 $\mu\text{g/g}$ with median 5,134 $\mu\text{g/g}$). It correlated with serum ferritin level, which was in range from 1,930–23,123 mmol/kg with median 6,256 mmol/kg. There was no complication after

liver biopsy. In most cases we performed classical transparietal biopsy. When transjugular biopsy was performed, there was often no bile duct in the specimen of liver, and as this is really important for right diagnosis, we had to do rebiopsy in some cases.

Conclusion: We conclude, that after allogeneic transplantation is really important to do the liver biopsy and not to treat pts with immunosuppression without histological confirmation. It is also very important to evaluate the liver storage of iron, because most patients is heavy overload.

The study was supported by Research project of the Ministry of Health of the Czech republic (MZO 00179906).

Rejstřík autorů

Abuhajar M	P77	Burešová I	P12, P67, P74, P80	Filková H	P12	Hrstka Z	P81, P88
Adam T	P60	Buriánková E	P10, P33, P34, P73	Filová E	P71	Hrstková H	P18
Adam Z	P12, P20, P21, P22, P23, P62	Burjanivová T	P61, P83	Foltánková V	P14, P40	Hrubiško M	P58
Aerts E	P36	Bystřická E	P37, P45, P85	Formánková R	P17, P31	Hrudková M	P43, P56, P77, P86
Al-Sahmani M	P22	Calabková L	P26	Fraňková H	P20	Hrušák O	P17, P18, P19, P74
Ambrůzová Z	P29, P85	Cermanová M	P91	Fričová M	P62, P78	Hubáček J	P19, P42, P73
Andrýs C	P86	Cinek O	P65	Friedecký B	P12	Hubáček P	P65
Antalová E	P62	Cmunt E	P51	Friedecký D	P60	Hudeček J	P89
Babická L	P51, P72, P74	Cukrová V	P16	Froňková E	P19	Hůlová M	P68
Babinská I	P89	Čejková S	P50	Frydrych I	P82	Hynčicová K	P65
Bačáková L	P71	Čermák J	P17, P72	Fuchs O	P75	Chalupníková P	P47
Bačovský J	P10, P11, P20, P24, P62, P72	Čermák M	P35, P50, P57, P81	Gajdoš P	P18	Charlier C	P13
Balcárková J	P11, P55	Čermáková Z	P77	George M	P13	Chudej J	P64, P89
Balhárek T	P57, P61, P83	Černá Z	P18	Gisslinger H	P5	Chudý P	P89
Ballová V	P79	Červená J	P45	Gregora E	P20, P44, P72	Chvojková I	P38
Balounová R	P69	Čmejla R	P27, P71	Grosch L	P53	Ilenčíková D	P34, P35, P50, P57, P79, P81
Bánovčin P	P89	Čmejlová J	P27, P71	Grosová L	P51	Indrák K	P11, P19, P24, P29, P33, P34, P40, P41, P42, P43, P59, P60, P62, P66, P73, P78, P82, P84, P85
Bárta T	P25	Čumová J	P64	Guman T	P62	Indráková J	P54, P55, P73, P83
Barthová M	P57	Čuřík N	P15	Gumulec J	P20, P63, P77	Ivanová K	P76
Bartoníčková A	P46	De Paepe P	P35	Habanec B	P56	Izáková S	P74
Bartoš M	P40	De Wolf-Peeters C	P35	Haber J	P7	Jabali Y	P18
Bartůňková J	P16	Dembická D	P18	Hájek R	P12, P20, P21, P22, P23, P40, P62, P64, P67, P80	Jäger R	P5
Bašová P	P15	Dendis M	P40	Hak J	P18	Janek D	P77
Belada D	P43, P45, P56, P77, P86	Divišová D	P44	Handrková H	P71	Janků L	P46
Beličková M	P16, P68	Divoká M	P19, P83	Hanzlíková J	P11, P55	Janoušek S	P53
Bělohávek O	P33	Divoký V	P26, P59	Hatok J	P64	Jarošová M	P11, P13, P19, P35, P41, P49, P55, P59, P60, P78, P82, P83
Benešová K	P75, P78	Dobrota D	P64	Hausdorf P	P20	Jebavý L	P87
Beranová K	P12	Dobrovolná M	P30, P31	Havlíková K	P20	Jenčo I	P35
Berg T	P5	Dolejšová L	P45	Havranová M	P48	Ježáková J	P47, P48
Berková A	P51	Doležalová D	P25	Heindorfer A	P20	Jindra P	P29, P30, P31, P32, P42, P58
Bláha M	P87	Doležel P	P82	Heinzová V	P20	Jirásková I	P26
Blahutová Š	P77	Doubek M	P50	Heřman M	P10	Jonášová A	P16, P63
Blažek B	P18	Doubavská L	P24	Hezova R	P14	Jordanová B	P56
Blažek M	P87	Drahokoupilová E	P33	Hlebašková M	P62	Jungová A	P58
Blažková P	P56	Dřevojánková B	P73	Hlinková K	P35, P79, P81	Juráňová J	P48, P54
Bodzášová C	P63, P77	Duřová I	P62	Hlinková Z	P38	Jurečková J	P64
Bogoczová C	P63	Dušek L	P9, P19, P43	Hluší A	P8, P42, P73	Jursová H	P46
Bogoczová E	P77	Dvořáčková J	P63	Hnátková M	P78	Juřeníková P	P46
Bramborová R	P45	Dvořák P	P25	Holánek M	P22	Kabátová-Maxová K	P45, P91
Brejcha M	P20, P63, P73, P77	Dvořáková V	P90	Holíková M	P20	Kabíčková E	P33
Bruchová H	P6, P61, P68	Dyr JE	P26, P69, P70, P71	Hollý P	P64	Kadlecová J	P83
Brychtová Y	P50	Džubasová M	P50	Holubcová Z	P25	Kafková A	P62, P78
Brynda E	P71	Ehrmann J	P14	Holubová V	P73	Kajaba V	P42, P76, P85
Březinová J	P51, P72, P74	Faber E	P24, P29, P43, P59, P60, P62, P73, P85	Holzerová M	P11, P19, P49, P55, P59, P60, P82	Kalina T	P19, P75
Břízová H	P41	Fakan F	P76	Hončíková M	P48		
Bubanská E	P35	Farbiaková V	P77	Horáková L	P9		
Budíková M	P72, P73	Fátorová I	P73, P87	Hornychová H	P77		
Budková J	P44	Feltl D	P76	Housková J	P17		
Buřková-Karasová L	P45	Fenclová M	P20	Hrbek J	P10		
Buhl AM	P50	Filip S	P87, P88	Hrdličková A	P65		
Bulíková A	P9			Hroteková Z	P39		
Burda P	P15						

Kalinová M	P17	Krčová V	P8	Marinov I	P9, P51	Olcaydu D	P5
Kalousek I	P26	Krejčí M	P12, P20, P21, P22, P23, P62	Marková J	P48	Oltová A	P12, P55, P56
Kalvodová L	P46	Krejsek J	P86	Matějková E	P14, P40, P80	Opichalová E	P48
Kamínek M	P53	Krenacs L	P35	Matuška M	P63, P76, P77	Ostřanský J	P53
Kanderová V	P75	Krésová K	P23	Mayer J	P23, P40, P50, P53, P76	Otáhalová E	P61
Kantorová B	P49	Kropáčková J	P11, P55	Medová K	P90	Otáhalová P	P26
Kapatai G	P14	Krpatová J	P45	Mejstříková E	P17, P18, P19, P31	Ouvínová H	P48
Karas M	P30, P31, P32, P42, P58	Krumpochová P	P82	Meluzín J	P53	Paličková P	P9
Karban J	P16, P51	Křivanová A	P12, P21, P22, P23	Mendelová D	P18	Panovský R	P53
Kasalová I	P64	Kubáčková K	P20	Merkerová M	P6, P68	Papajík T	P8, P33, P34, P41, P42, P43, P49, P55, P73, P82
Kašparová P	P86	Kubisz P	P65, P89	Měřička P	P87	Pauerová J	P9
Katrincská B	P13, P19, P78, P83	Kubová Z	P33, P34, P42, P43	Mešková M	P55	Pavlicová V	P37, P38, P45, P85
Keslová P	P31	Kučerová L	P34, P42, P43, P66, P73, P82, P84	Miřudová E	P46	Pavliček J	P49, P55
Kessler P	P20	Kučerová M	P63, P73	Mihál V	P18	Pavlík T	P9, P42, P43
Kestlerová A	P26	Kučerová P	P56	Mihók L	P50	Pavlík V	P88
Kibitzová P	P37, P45	Kuglík P	P12	Michálek J	P14, P39, P40, P74, P80	Pavlišťová L	P51, P72
Kideryová L	P66, P78	Kupková L	P30	Michalová K	P17, P51, P72, P74	Pecka M	P83
Kissová J	P9	Kupská R	P12	Michaux L	P13	Pecůchová M	P78
Klabusay M	P53	Kviatkovská Z	P57	Mikula P	P81	Peková S	P50, P83
Klamová H	P26, P59	Kyjovská D	P40, P67, P74, P80	Mikulenková D	P65	Pelková V	P19, P70
Klement P	P63, P77	Kynčl M	P33	Minařík J	P10, P11, P24, P62, P72	Penka M	P9, P12, P20, P40, P56,
Klener P	P68	Ladická M	P79	Mlejnek P	P38, P82	Peřina V	P21
Klodová D	P63	Langová K	P24, P29, P62	Mokrý J	P68	Petera J	P88
Klusová N	P73	Langrová E	P20	Molinský J	P68	Petráček D	P70
Kocák I	P14	Lapčíková A	P48, P54	Moravcová J	P40, P59, P67, P84	Petrová P	P73
Kodet R	P33, P41	Lasabová Z	P61, P83	Moravcová K	P38	Petrtylová K	P71
Kodetová D	P33	Laštovková A	P45	Močovská Z	P9	Petřek M	P29, P85
Köhlerová S	P56	Leahomschi S	P68	Mrázek F	P29, P85	Petríková V	P63
Kokavec J	P15, P25, P39	Leonard S	P14	Mrázek P	P76	Piačková B	P81
Kokeszová M	P56	Ligová A	P76, P77	Mráhalová M	P41	Pika T	P11, P24, P62, P72
Kolářková M	P83	Lihosithová E	P44	Murray GP	P14	Pikalová Z	P43, P48, P66, P73, P82
Kolar Z	P14	Linková V	P55	Musial J	P65	Pimková K	P26, P69
Kolaříková I	P31	Lipšic T	P28	Mužík J	P19	Pink R	P37
Koledová Z	P26	Lukáš J	P24	Mužíková J	P80	Plachý R	P49, P82
Konečná H	P64	Lukeš J	P42	Mužíková K	P19, P65	Plameňová I	P64, P89
Kopečná L	P18	Lukl J	P53	Mysliveček M	P10, P11, P33, P34	Plank L	P35, P50, P57, P61, P79, P83
Koranda P	P10, P33, P34	Luxová A	P9	Nagyová B	P37	Plonková H	P63, P77
Kořínek V	P24	Lysák D	P31, P32, P42, P58	Navrátilová J	P31	Podskočová J	P15, P25
Kořínková L	P47	Maaloufová J	P74	Nečas E	P61, P68	Poláčková H	P85, P90
Kořístka M	P77	Macková K	P39	Němcová A	P77	Porkka K	P16
Kořístková V	P37	Machálka M	P21	Němec P	P12	Pospíšil V	P25, P39
Kostadinov A	P46	Machová B	P89	Neradová M	P41	Pospíšilová D	P18, P27, P71
Kostečka A	P75	Machová K	P59	Neubauer J	P62	Pospíšilová Š	P25, P50
Kostková J	P45	Maisnar V	P12, P23	Neuwirtová R	P16, P63	Potáčková A	P64
Kotlín R	P70	Májek P	P26, P69, P70	Novák M	P48, P49	Potěšil D	P50
Koukalová A	P37	Malčíková J	P50	Nováková P	P50, P79	Pour L	P12, P20, P21, P22, P23, P40, P62
Kováč M	P70	Malinová E	P51	Novosadová A	P83	Prekopová I	P11, P55
Kovářová L	P12, P39, P40, P67	Malý J	P43, P56, P73, P77, P83, P86, P87	Novosadová L	P81	Pretnar J	P29
Koza V	P29, P30, P31, P32, P42, P58	Malý R	P87	Novotná J	P70	Prchal JT	P6, P26, P61
Kozák T	P44, P48, P50	Marcinek J	P57, P61, P83	Novotná R	P45	Procházka V	P33, P34, P41, P42, P43
Krajsová I	P77	Mareš J	P66	Novotová E	P63	Procházková D	P18
Krállová D	P22	Marešová I	P9, P60	Očadlíková D	P39, P40, P74		
Krállová J	P76	Marešová L	P46				
Kralovics R	P5						
Kramaržová K	P17, P18						
Krämer A	P26						

Procházková J	P42, P84	Smetana K	P26	Špaček M	P48, P50	Visokaiová M	P37
Procházková R	P52	Smišek P	P17, P18, P19	Špatenková N	P76	Vitetta SE	P14
Provazníková D	P75	Smolej L	P43, P50, P56, P77, P83, P86	Špička I	P63, P72	Vítková J	P37
Průcha M	P50	Sobotka J	P73	Štecová N	P62, P78	Vodičková E	P17, P19
Přikrylová A	P55	Sobotková A	P69	Štefániková Z	P58	Vokurka S	P8, P32, P42, P45, P58, P91
Ptáček J	P52	Solná R	P59	Štěpánková P	P56	Vondráková J	P8, P42, P43, P55, P84
Ptoszková H	P18	Soukup T	P68	Štěpánová E	P87	Vorlíček J	P23
Pučelíková L	P9	Springerová J	P45	Štěpánová V	P87	Vorlová P	P46
Pytlík R	P66, P68, P78	Srovnalík K	P24, P62	Štěrba J	P18, P56, P74	Votrubová J	P33
Račay P	P64	Sťahelová A	P85	Štícha M	P42	Vozobulová V	P32, P58
Ráčil Z	P7	Stárková D	P51	Štikarová J	P26, P69	Vraná M	P30, P31
Radina M	P63, P73	Starostka D	P81	Štrajtová D	P46	Vránová M	P84
Radocha J	P23	Starostová L	P8	Štuková M	P81	Vranovský A	P79
Raida L	P14, P29, P34, P40, P42, P43, P78, P85	Starý J	P17, P18, P19, P31, P33, P65	Šuvada J	P35	Vrbacký F	P83
Rasková-Kafková L	P26	Staško J	P89	Švorcová E	P62	Vroblová V	P83
Reicheltovej Z	P70	Stehl A	P5	Tajtlová J	P51, P72	Vylitová L	P37, P38
Riedel T	P70, P71	Steinerová K	P8, P30, P31, P32, P42, P58	Takáč V	P62	Waloschek T	P76
Richter M	P53	Stejskalová A	P40	Takeda H	P13	Wenbin W	P14
Ročňová L	P50	Stoklasová M	P73	Tichý M	P12	Wintnerová J	P38
Rohoň P	P60	Stopka T	P15, P25, P39	Timr P	P18	Wlodarska I	P13, P35
Roland B	P35	Straub J	P63	Tomková J	P60	Woodman BJC	P14
Rožmanová Š	P41, P59, P60	Strnadová B	P79	Tóthová E	P62, P78	Wróbel M	P63, P77
Rulcová J	P59, P84	Suková M	P17	Toušovská K	P18	Young SL	P14
Rusiňáková Z	P34	Sumerauer D	P33	Tovaryšová A	P73	Zahradová L	P12, P21, P22, P23, P40
Rycová M	P40, P67	Surová M	P62, P78	Trbušek M	P50	Zákoucká H	P53
Rychtrmocerová H	P66, P78	Suská R	P12, P67	Trněný M	P51, P68	Zaoralová R	P12
Řehořová I	P90	Suttnar J	P26, P69, P70	Tyčová V	P91	Zapletal O	P56
Řehořová P	P85	Svoboda T	P30, P31, P32, P42, P58	Uchytílová L	P66, P78	Zapletalová J	P60, P66
Řepková J	P46	Sýkorová M	P47	Ujhelly O	P15	Zavadiil J	P15, P39
Řeřichová M	P45	Syslová I	P55	Úlehlová J	P47	Zavřelová A	P91
Řezníčková L	P19	Szépe P	P57, P61, P83	Urbánková H	P11, P13, P35, P49, P55, P82	Zavřelová J	P9
Salaček P	P48	Szotkowská R	P73	Urbanová R	P42, P66	Zbořilová R	P8
Sandecká V	P21, P22	Szotkowski T	P8, P19, P42, P73	Vaculová J	P52	Zdráhal K	P18
Savulidi GF	P15	Šáchová L	P63	Vališ M	P77	Zdráhal Z	P64
Sečkařová M	P47	Šarounová K	P83	Válek Z	P46	Zdráhalová K	P17, P18
Sedláček P	P30, P31, P65	Ščudla V	P10, P11, P24, P62, P72	Valníček S	P56	Zemanová M	P20, P24, P62, P72
Sedláčková B	P37	Ščudlová J	P37, P38, P85	Valová T	P19	Zemanová Z	P19, P51, P59, P72, P74
Shetty S	P35	Šedo O	P64	Van Loo P	P35	Zíkova J	P45
Schönfeldová E	P26	Šedová Z	P33, P34, P42	Vandenberghe P	P13, P35	Zimová R	P87
Schröderová R	P45	Šigutová P	P63	Vaňková G	P55	Zitková M	P37, P44, P46, P85
Schwarz J	P51	Šimkovič M	P73	Vaňochová A	P61	Zmeková V	P59
Siebertová K	P16	Šimonová T	P68	Vargová K	P15, P25, P39	Zounar R	P72
Skálová K	P39	Široký O	P23, P86	Vášková M	P19, P70	Zuchnická J	P63, P77
Sklenářová J	P66	Šišková M	P16	Vášová I	P76	Zuna J	P19
Skoultchí IA	P15, P25	Škardová J	P8, P45, P91	Vávra V	P18	Žák P	P86, P87, P91
Skoumalová I	P43, P60	Škrobánková A	P91	Vávrová J	P12	Žákovičová A	P50, P57
Slavík L	P47	Škúrková B	P48, P54	Verner J	P25	Železná I	P50
Slezák P	P63, P77	Šmardová J	P50	Veselá B	P69	Žezulková D	P50
Slováček L	P88	Šmídová J	P90	Veselá R	P66, P78	Živná J	P10
Slováčková B	P88			Veselovská J	P59	Živný J	P68
Smejkalová J	P12, P40, P74, P80			Vidán-Jeras B	P29		
Smetana J	P12			Vidláková P	P39, P40, P74		
				Vinarský V	P25		

