

**XXIII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí****XIII. Konference ošetrovatelských profesí v hematologii****XII. Konference zdravotních laborantů v hematologii****2<sup>nd</sup> Symposium on Advances in Molecular Hematology**

Olomouc, 24. - 26. 6. 2009

**TRANSPLANTACE****1469.****Výsledky nemocných s myelodysplastickým syndromem, akutní myeloidní leukémií s trilineární dysplázií a sekundární akutní myeloidní leukémií po alogenní transplantaci krvetvorných buněk**Steinerová Kateřina, Koza Vladimír, Jindra Pavel, Karas Michal, Lysák Daniel, Vokurka Samuel, Svoboda Tomáš, Vozobulová Věra (*Hematologicko-onkologické oddělení FN, Plzeň*)

Myelodysplastický syndrom a příbuzné diagnózy jako akutní myeloidní leukémie s trilineární dysplázií (TLD-AML) a sekundární myelodysplázie/akutní myeloidní leukémie (t-MDS/t-AML) související s léčbou mají obvykle velmi špatnou prognózu po léčbě konvenční chemoterapií. Alogenní transplantace krvetvorných buněk (SCT) skýtá šanci k trvalému vyléčení nemocných s těmito diagnózami. V našem souboru jsme retrospektivně analyzovali soubor nemocných transplantovaných na našem oddělení pro vysoce rizikovou AML/MDS. Materiál a metody: 50 nemocných (nem) s dg. TLD-AML (32 nem, 65%; 9 nem s předchozím MDS a 23 nem s de novo AML), t-AML (7 nem, 14%), MDS (7 nem, 14%) a t-MDS (4 nem, 8%) podstoupilo na našem oddělení 51 alogenních SCT v rozmezí let 2003 – 2008. Medián věku v celé skupině byl 53 let (24-68 let). 2 nem (4%) měli dobrou cytogenetickou prognózu, 33 nem (66%) intermediální a 16 nem (32%) špatnou cytogenetickou prognózu. 20 nem (40%) bylo transplantováno s příbuzenským dárce, 30 nem (60%) s nepříbuzenským dárce. 17 nem (34%) prodělalo myeloablativní přípravu (Bu/Cy/+ATG) a 33 nem (66%) redukovanou přípravu (FAMP/Mel). Všichni nem dostávali jako GVHD profylaxi cyklosporin a "short" methotrexát. Výsledky: 26 nem (52%) žije v kompletní remisi a kompletní chiméře s mediánem follow-up 15 měsíců (1-63 měsíců) a s pravděpodobností přežití 2 roky (OS) 46% (42% příbuzenské a 49% nepří-

buzenské,  $p=0,6552$ ). 24 nem (48%) zemřelo s mediánem 6 měsíců (1-50 měsíců). Nonrelaps mortalita (NRM) v den 100 byla 14% (6% příbuzenské a 8% nepříbuzenské), NRM v 1 roce byla 24% (6% příbuzenské a 18% nepříbuzenské). 10 nem (20%) -7 (14%) příbuzenské a 3 (6%) nepříbuzenské,  $p=0,0673$  – zrelabovali po SCT s mediánem relapsu 5 měsíců (3-48 měsíců) a s pravděpodobností disease free survival (DFS) 2 roky 47% (43% příbuzenské a 50% nepříbuzenské,  $p=0,5116$ ). Diskuze: naše výsledky nasvědčují, že alogenní SCT je dobrou volbou léčby pro nemocné s vysoce rizikovou AML a MDS. Ve srovnání OS a DFS skupin transplantovaných příbuzensky a nepříbuzensky nebyl zaznamenán statisticky signifikantní rozdíl. Avšak naše data ukazují trend k lepšímu OS, DFS a nižšímu počtu relapsů ve skupině nemocných transplantovaných s nepříbuzným dárce, zřejmě díky předpokládanému GVL efektu.

**1439.****Rozdílnost dávek melfalanu vztažených na kilogram hmotnosti a vliv na výsledky pacientů s AML po alogenní transplantaci krvetvorných buněk po přípravě FLU/MEL (melfalan 140mg/m<sup>2</sup>)**Vokurka Samuel, Jindra Pavel, Steinerová Kateřina, Jungová Alexandra, Karas Michal, Svoboda Tomáš, Lysák Daniel, Koza Vladimír (*Hematologicko-onkologické odd., Fakultní nemocnice, Plzeň*)

Úvod: Alogenní transplantace krvetvorných buněk (SCT) s protokolem přípravy FLU/MEL (melfalan 140mg/m<sup>2</sup>) je významnou možností léčby pacientů s AML, včetně pacientů starších. Empiricky ustanovené dávkování melfalanu s ohledem na tělesný povrch a nikoliv hmotnost pacienta vede ve svém důsledku k nehomogenitě dávek vztažených na kilogram hmotnosti ve skupinách stejně léčených pacientů. Cíl: zhodnotit vliv rozdílnosti dávek melfalanu na léčebné výsledky SCT. Metodika: prospektivní sledování pacientů s AML podstupujících SCT po přípravě FLU/MEL (fludarabin

120mg/m<sup>2</sup>, melfalan 140mg/m<sup>2</sup>). Dávka melfalanu považována za hlavní sledovanou proměnnou za celý protokol FLU/MEL. Porovnání výsledků skupin pacientů s „vyšší“ a „nižší“ dávkou melfalanu vztaženou na kg aktuální tělesné hmotnosti. Výsledky: 38 pacientů léčených v 10/2001-12/2007. Medián dávky melfalanu na pacienta: 3,5 (2,5 - 4,1) mg na kilogram aktuální hmotnosti. S ohledem na vypočtený medián byly dále porovnány skupiny pacientů s dávkou melfalanu „medián a vyšší“ ( $\geq 3,5$ mg/kg) vs. „nižší“ ( $< 3,5$ mg/kg). Obě skupiny byly relativně dobře srovnatelné ve všech důležitých transplantačních charakteristikách na straně pacientů tak i dárců štěpu. Nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v pravděpodobnosti 3-letého OS a DFS mezi oběma skupinami (48% vs. 54% a 48% vs. 43%,  $p=0,8$ ). Ve skupině „nižší“ byly četnější prognosticky nepříznivé genetické aberace dle NCCN (0% vs. 23%,  $p=0,03$ ). U pacientů se stejným tělesným povrchem, ale nižší hmotností a tedy vyšší dávkou melfalanu vztaženou na kilogram hmotnosti, byl trend k vyššímu výskytu těžké mukozitidy dutiny ústní stupně 3-4 dle WHO (48% vs. 24%,  $p=0,1$ ). Závěr a diskuze: Výsledky ukazují, že zavedené schéma dávkování melfalanu s ohledem na tělesný povrch vede k nehomogenitě dávek vztažených na kilogram hmotnosti pacienta. V rámci rozptylu podaných dávek nebyl patrný rozdíl v efektu na 3-leté OS a DSF, ale naopak byla tendence k vyšší toxicitě sliznic dutiny ústní při vyšší dávce melfalanu na kilogram. Efekt dávky 3,5mg/kg melfalanu v rámci protokolu FLU/MEL (melfalan 140mg/m<sup>2</sup>) by nejspíše mohl být ověřován v rámci dostatečně veliké prospektivní studie. Limitem našeho sledování je zatím kratší doba sledování a omezený počet pacientů.

1395.

**Alogenní transplantace krvetvorných buněk u nemocných s akutní myeloidní leukémií se středním cytogenetickým rizikem v 1. kompletní remisi – analýza výsledků jednoho centra v období 2003-2008**  
Karas Michal, Steinerová Kateřina, Jindra Pavel, Lysák Daniel, Svoboda Tomáš, Vokurka Samuel, Mohammad Lekaa, Vozobulová Věra, Hrabětová Marcela, Koza Vladimír (*Hematologicko-onkologické odd. FN, Plzeň*)

Úvod: alogenní transplantace (alloSCT) po myeloablativní přípravě (MAC) s příbuzným dárcem u pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML) s intermediárním cytogenetickým rizikem (IR) v 1.kompletní remisi (CR) zlepšuje přežití bez nemoci (DFS) a incidenci relapsů (RI) ve srovnání s pacienty léčenými pouze chemoterapií (CHT). Tento pozitivní vliv nebyl jednoznačně prokázán na celkové přežití (OS) transplantovaných pacientů z důvodu jejich vyšší léčebné mortality (TRM). Redukované přípravné režimy (RIC), použití nepřibuzného dárce a zavedení nových diagnostických postupů a léků v posledních letech může významně ovlivnit TRM a tím i výsledky alloSCT. K ověření potenciální role těchto změn na transplantační výsledky jsme retrospektivně zhodnotili

výsledky alloSCT u nemocných s IR-AML v 1. CR transplantovaných na našem pracovišti v posledních 6 letech a současně jsme tyto výsledky srovnali s výsledky pacientů s IR-AML v 1. CR, kteří byli indikováni k alloSCT, ale kteří z důvodu nenalezení dárce či odmítnutí alloSCT byli léčeni CHT. Pacienti a metody: od roku 2003 30 pacientů s mediánem věku 52 let (rozmezí 28-59) s IR-AML v 1. CR podstoupilo alloSCT od příbuzného (43%) nebo nepřibuzného (57%) dárce po MAC (40%, BuCY) nebo RIC (60%, FLU/MEL). Kontrolní skupinu tvořilo 19 pacientů s IR-AML v 1. CR, kteří z důvodu nedostupnosti dárce nebo odmítnutí transplantace pokračovali v další léčbě CHT a kteří se kromě nižšího věku nelišili od skupiny transplantovaných pacientů v žádném dalším prognostickém faktoru. Výsledky: u všech pacientů po alloSCT došlo k přihojení štěpu. K rozvoji akutní GVHD došlo u 9 (30%) pacientů. Chronická GVHD se rozvinula u 9 (36%) z 25 hodnocených pacientů. 3 (10%) pacienti zrelabovali a 5 (16%) zemřelo z důvodu TRM. Předpokládaný 3-letý DFS a OS jsou 84% a 60%. Způsob transplantační přípravy ani typ dárce neměly vliv na OS po alloSCT. Ve skupině CHT léčených pacientů zemřeli 2 (11%) z důvodu TRM a 10 (53%) pacientů zrelabovalo. Předpokládaný 3letý DFS a OS jsou 31% a 40%. AlloSCT se srovnatelnou TRM ( $p=0,69$ ) zlepšila DFS ( $p=0,001$ ), snížila RI ( $p=0,002$ ) a současně byl patrný trend ke zlepšení OS ( $p=0,10$ ). Závěr: 1) alloSCT při nízkém riziku relapsu a v posledních letech při nízké TRM zlepšila DFS a snížila RI ve srovnání se samotnou CHT u nemocných s IR-AML v 1. CR. 2) menší vliv alloSCT na OS může souviset s vysokým zastoupením alloSCT (50%) v záchranné léčbě relabujících pacientů. 3) typ dárce ani volba přípravy neovlivnili OS po alloSCT.

1541.

**Vliv hladiny feritinu na výsledky alogenních transplantačních krvetvornými buňkami**

Bělohávková Petra, Žák Pavel, Zavelová Alžběta, Lánská Miriam, Horáček Jan, Radoulea Jakub, Voglová Jaroslava, Jebavý Ladislav, Malý Jaroslav (*II. interní klinika – OKH FN a LF UK, Hradec Králové*)

Úvod: U pacientů před alogenní transplantační krvetvornými buňkami (HSCT) často nalézáme vysoké hodnoty feritinu se známkami přetížení železem. Je známo, že přetížení železem je negativním prognostickým znakem pro výsledky HSCT u pacientů s thalasemií. Další práce prokázaly význam hladiny feritinu na výskyt komplikací i u dalších skupin nemocných. Přetížení železem zvyšuje především četnost jaterních a infekčních komplikací a negativně ovlivňuje celkové přežití nemocných. Souhrn: Z našeho souboru alogenně transplantovaných pacientů jsme hodnotili skupinu 65 nemocných (37 mužů, 28 žen), u které při zahájení přípravného režimu byla vyšetřena hladina feritinu. Zjištěný medián hodnoty feritinu byl 769 ug/l (5 – 10466 ug/l) a medián sledování po transplantační byl 12 měsíců (1-127 měsíců). V 70% (45 paci-

entů) byl užit myeloablativní přípravný režim, v 95% (62 pacientů) byly štěpem periferní kmenové buňky. Podle mediánu hodnoty feritinu jsme tento soubor rozdělili do dvou skupin. První skupinu (34 pacientů) tvoří nemocní s feritinem < 800 ug/l a druhou (31 pacientů) nemocní s feritinem > 800 ug/l. Výsledky: Ve skupině s nižší hodnotou feritinu bylo prokázáno lepší celkové přežití pacientů (65% vs. 45%). Příčinou úmrtí v první skupině byl u 7 pacientů (58% zemřelých) relaps choroby a ve 2 případech (17% zemřelých) byla příčinou úmrtí infekce. Ve druhé skupině souboru byl relaps příčinou úmrtí v 10 případech, což odpovídá stejné frekvenci výskytu (59% zemřelých). V této skupině častější příčinou úmrtí byla infekce (36% zemřelých). Ve dvou případech se jednalo o aspergilovou infekci, která se v první skupině nevyskytovala. V obou skupinách jsme nezaznamenali rozdílnou četnost výskytu akutní a chronické GvHD (65% vs 58%), ale ve skupině s nižší hladinou feritinu byla méně často přítomna CMV infekce (35% vs 52%). Nezaznamenali jsme rovněž rozdílnou frekvenci jaterních komplikací (veno-okluzivní choroba). V těchto skupinách nebylo také rozdílné dosažení přihojení štěpu v leukocytech (den 15,5 vs den 16). Závěr: V našem souboru jsme potvrdili negativní prognostický vliv vysoké hladiny feritinu na celkové přežití nemocných a na vyšší výskyt závažných infekčních komplikací. Nebyl zaznamenán rozdíl ve frekvenci výskytu relapsu onemocnění. Práce podpořena výzkumným záměrem MZO 00179906.

1397.

**Léčba pacientů se sekundárními hematologickými malignitami transplantací kmenových buněk krvetvorby ve FN v Motole v letech 1991 – 2008**

Král Ladislav, Mejstříková Ester, Kotus Dušan, Matulová Martina, Keslová Petra, Formánková Renata, Šmelhaus Vratislav, Blažek Bohumír, Štěrba Jaroslav, Vávra Vladimír, Smíšek Petr, Sedláček Petr, Starý Jan (*Klinika dětské hematologie a onkologie UK 2. LF a FN v Motole, Praha; CLIP, UK 2. LF, Praha; Klinika dětského lékařství, FN, Ostrava*)

Sekundární hematologické malignity jsou závažným nežádoucím efektem chemoterapie (zejména inhibitory topoizomerázy 2) podané v léčbě primární malignity. K těmto malignitám jsou řazeny sekundární akutní leukémie (sAL) a sekundární myelodysplastický syndrom (sMDS). Nejčastěji se jedná o akutní myeloidní leukémii (sAML), méně časté jsou sMDS a akutní lymfoblastická leukémie (sALL), typicky s přestavbou MLL genu. Nejefektivnější léčebnou modalitou pro tyto pacienty je alogenní transplantace kmenových buněk krvetvorby (HSCT). Ve sledovaném období bylo v našem centru zahájeno hledání dárce pro 16 dětí se sekundární hematologickou malignitou (8 chlapců/ 8 dívek). Primární malignitou byla ALL u 4 (25,0%), AML u 3 (18,8%), kostní tumor u 5 (31,3%), Hodgkinova choroba u 1 (6,3%), germinální tumor u 1, meduloblastom u 1 a ganglioneu-

roblastom u 1 pacienta. Medián věku při diagnóze sekundární malignity byl 9,9 let (2,2 – 17,7). sALL byla diagnostikována u 4 (25,0%), sAML u 6 (37,5%), sMDS u 5 (31,3%) a akutní hybridní leukémie (sAHL) u 1 (6,3%) pacienta. Medián diagnózy sekundární malignity od primární diagnózy byl 31,7 měsíců (11,9 – 78,6). Kompletní hematologické remise (CR) bylo dosaženo u 10/11 (90,9%) pacientů se sAL, pacient který nedosáhl CR zemřel na progresi nemoci. 5 pacientů s MDS bylo transplantováno front-line ihned po nalezení vhodného dárce. Pro 1 (6,3%) pacienta se sALL se nepodařilo najít vhodného dárce, tento pacient žije v 2. CR. 14/16 (87,5%) pacientů podstoupilo HSCT v mediánu 4,9 měsíců (2,37 – 10,2) od diagnózy sekundární malignity. 2/14 (14,3%) pacientů mělo štěp od příbuzného a 12/14 (85,7%) od nepříbuzného dárce. Celkové přežití (OS) pacientů po transplantaci bylo 50,0% s mediánem exitu 105 (23 – 317) dní po HSCT. Příčinou úmrtí byl relaps ve 2 nebo transplant-related mortality (TRM) v 5 případech. Medián sledování souboru je 13,73 (0,7 – 111,3) měsíců od diagnózy sekundární malignity a 7,43 (0,8 – 51,0) měsíců od HSCT. I při velmi nepříznivé diagnóze sekundární hematologické malignity je velkým úspěchem vysoké procento dosažených remisí a navzdory vysoké míře TRM i celkové přežívání pacientů po alogenní HSCT. Podpořeno grantem MZO 00064203.

1581.

**Nepríbuzenská transplantácia krvotvorných buniek na Slovensku**

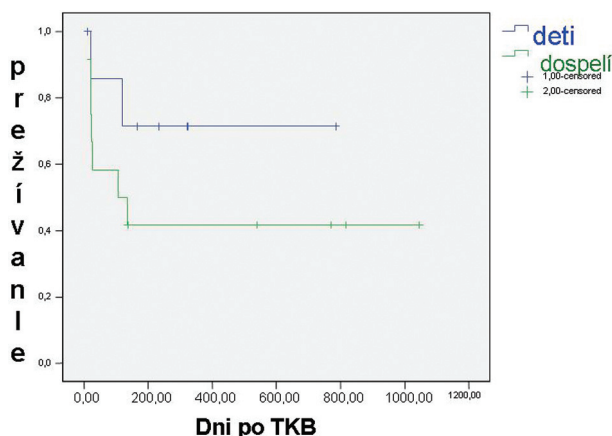
AlSabty Firas, Boďová Ivana, Bojtárová Eva, Demečková Eva, Horáková Júlia, Hrubíško Mikuláš, Kušíková Mária, Skraková Marcela, Slezáková Katka, Stemmická Denisa, Šufliarska Sabina, Mistřík Martin (*KHaT LF UK, SZU a FNŠP, Bratislava; II. Detská klinika LF UK DFNSP, Bratislava*)

Ciel' práce. Nepríbuzenská transplantácia krvotvorných buniek v pediatrickom transplantáčnom centre II. Detskej kliniky LFUK DFNSP v Bratislave (EMBT CIC 684) a v centre pre dospelých na KHaT LFUK, SZU a FNŠP v Bratislave (EBMT CIC 610). Materiál a metódy. Vyhľadávanie nepríbuzenského darcu pre 53 chorých (28 dospelých a 25 detí) v národnej databáze dobrovoľných darcov kostnej drene a cez BMDW. Vyšetrenie HLA na úrovni sérotypizácie a HR typizácie. Pravdepodobnosť prežívania sme stanovili Kaplan-Meirovou metódou (obrázok). Výsledky. Vyhľadávanie bolo úspešné pre 56% chorých, darca nedostupný v 25%, a prerušenie vyhľadávania pred jeho ukončením až v 19%. Pre dospelých chorých sa našiel vhodný darca 10/10 (HLA -A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 na úrovni HR typizácie ) 7 x a čiastočne nevhodný 5 x (2x v 1 a 3x v 2 lokusoch): 1 x v HLA-B na úrovni sérotypizácie, 1 x HLA-C na úrovni sérotypizácie, 2 x HLA-A na úrovni sérotypizácie a v HLA-B na úrovni HR typizácie, 1 x HLA-A na úrovni HR typizácie a v HLA-C na úrovni sérotypizácie



cie; pre deti boli dostupní 9 – ti nepríbuzní darcí, všetci zhodní 10/10. Nepríbuzenskú transplantáciu krvotvorných buniek sme urobili u 21 chorých (12 dospelých a 9 detí), 11 žije (52%)(4, resp. 7). Prihodenie sme pozorovali u 18 chorých (10, resp. 8). Nerelapsová mortalita sa vyskytla 8x (3x infekčná komplikácia, 3x multiorgánové zlyhanie, 2 x reakcia štepu proti príjemcovi). Relaps leukémie bol príčinou exitu u 2 chorých. Záver. Lepšie výsledky nepríbuzenskej transplantácie krvotvorných buniek pozorujeme v detskom veku a pri úplnej zhode v HLA (10/10) (zhoda s literárnymi údajmi).

prežívání po nepríbuzenskej TKB  
– porovnanie deti a dospelí



## MALIGNÍ LYMFOMY 1

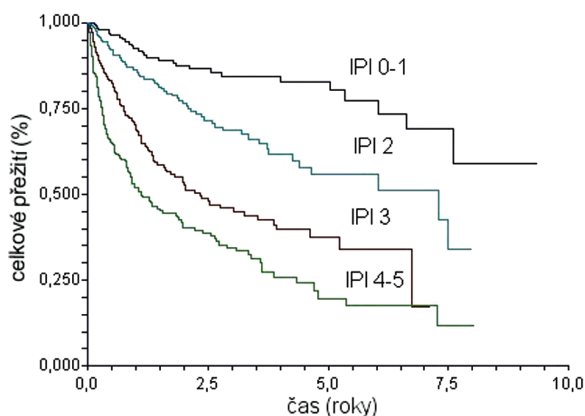
1566.

### Analýza prežití nemocných s difúzním veľkobuněčným B-lymfomem starších 60 let z registru Kooperativní lymfomové skupiny

Procházka Vít, Papajík Tomáš, Trněný Marek, Pytlík Robert, Vášová Ingrid, Šálek David, Belada David, Hrudková Monika, Kozák Tomáš, Kubáčková Kateřina, Šiffnerová Hana, Matuška Milan, Lysý Milan, Bolomská Inge, Petráková Katarína, Otavová Barbora, Příbylová Jana, Švecová Jiřina, Brejcha Martin, Starostka David, Petrová Markéta (*HOK, FN, Olomouc; Kooperativní lymfomová skupina*)

Úvod: DLBCL je v ČR nejčastějším typem ne Hodgkinova lymfomu. Medián věku při diagnóze se pohybuje kolem 60 let. Samotný věk je ve většině prognostických systémů považován za nezávislý negativní prediktor prežití, což je podmíněno nižší tolerancí intenzivních protokolů terapie a komorbiditou pacientů. Cíl: Zmapovat prežití neselektované populace starších nemocných s DLBCL na základě dat databáze Kooperativní lymfomové skupiny. Metoda: Analyzovali jsme data 1337 nemocných, kteří při diagnóze lymfomu měli 60 a více let. Medián věku dosáhl 70 let (60-94), 50,2 % nemocných mělo pokročilé stádium lymfomu (III/IV dle Ann Arbor), u 74,5 % bylo popsáno postižení extranodální lokality. Stratifikace dle IPI: nízké riziko (L-

IPI; 20,8 %), nižší střední riziko (LI-IPI; 25,5 %), vyšší střední riziko (IH-IPI; 24,1 %) a vysoké riziko (HI-IPI; 29,6 %). 96,6 % nemocných bylo léčeno s kuraťivním cílem, chemoterapie byla v 1. linii podána v 91,6 % případů. Rituximab byl v rámci 1. linie léčby podán u 43,2 % a radioterapie (RT) byla aplikována u 26,3 % nemocných. Výsledky: Medián celkového přežití souboru (OS) dosáhl 4,3 roku (95 % CI 3,5-5,0). OS ve 3 letech v rámci jednotlivých podskupin dle IPI bylo následující: L-IPI 84,4 % (95% CI 0,78-0,90), IL-IPI 67,4 % (95 % CI 0,60-0,75), IH-IPI 45 % (95 % CI 0,37-0,53), H-IPI 33,4 % (95 % CI 0,26-0,41),  $p=0,0001$ . Interval do progresu choroby (PFS) ve 3 letech dosáhl 41 % (95 % CI 0,38-0,45). PFS bylo stratifikováno dle IPI: L-IPI 69 % (95 % CI 0,60-0,77), IL-IPI 53,3 % (95 % CI 0,45-0,61), IH-IPI 31% (CI 95 % 0,23-0,39), H-IPI 21 % (95 % CI 0,14-0,27),  $p=0,0001$ . V univariátní analýze byl prokázán efekt rituximabu na prodloužení OS (OS ve 3 letech 53 % vs 60 %;  $p=0,0002$ ), ale nikoliv PFS. RT v první linii léčby prodlužuje OS (OS ve 3 letech 54 % vs 65 %;  $p=0,0002$ ) i PFS (PFS ve 3 letech 38 % vs 52 %;  $p=0,0001$ ). Věk  $\geq 70$  let je spojen s kratším přežitím (OS ve 3 letech 48 % vs 65 %;  $p=0,0001$ ). Vysoká hladina beta-2-mikroglobulinu je spojena s horší prognózou (OS ve 3 letech 41 % vs 62 %;  $p=0,0001$ ) i delším PFS (PFS ve 3 letech 39 % vs 44 %;  $p=0,0005$ ). Závěr: Současné léčebné modalitavyvedou k dlouhodobému přežití u více než poloviny starších nemocných s DLBCL, nicméně křivka přežití plynu klesá. Silným prediktorem OS i PFS zůstává hodnota IPI skóre. Podskupina pacientů  $\geq 70$  let však vykazuje horší přežití. Rituximab i aplikace radioterapie v 1. linii léčby zlepšuje osud nemocných. Práce podpořena grantem NR9453-3.



1474.

**Vyšší věk není kontraindikací kurativní terapie u pacientů s difúzním B velkobuněčným lymfomem - přehled výsledků jednoho centra se zaměřením na nemocné starší 60 let**

Belada David, Sýkorová Alice, Štěpánková Pavla, Hrudková Monika, Smolej Lukáš, Šimkovič Martin, Malý Jaroslav (*II. interní klinika, Oddělení klinické hematologie, FN a LF UK, Hradec Králové*)

Více než polovina nemocných s nově diagnostikovanými lymfomy je starší 60 let. Vzrůstající podíl starších nemocných vyplývá z prodlužování středního věku a částečně i z narůstající incidence lymfomů. Vyšší věk představuje sám o sobě negativní prognostický faktor - je součástí prognostických indexů, např. IPI (International Prognostic Index). Přítomnost dalších komorbidit omezuje možnosti léčby starších pacientů. Cílem práce bylo analyzovat výsledky léčby nemocných s difúzním B-velkobuněčným lymfomem (DLBCL) na našem pracovišti za období 2003-2007 se zaměřením na skupinu pacientů (p) nad 60 let. Za toto období bylo celkem léčeno 133 p, všichni imunochemoterapií s rituximabem. Ve skupině > 60 let bylo 74/133 (56 %), mladší nemocní (59 p) sloužili v analýze jako kontrolní skupina. Z analýzy byli vyloučeni nemocní s primárními CNS lymfomy vzhledem k odlišnému biologickému chování. Vstupní charakteristika podskupiny >60 let: ze 74 p bylo v době diagnózy 41 p >70 let (55 %), 22 p >75 let (30 %) a 8 p >80 let (11 %). Léčbou první linie byla imunochemoterapie: 64x R-CHOP, 6x R-CNOP a 4x R-COP. Při mediánu sledování celého souboru 32 měsíců zemřelo 32 z 74 nemocných > 60 let (43 %), v kontrolní skupině < 60 let zemřelo 9 z 58, tedy 16 %. Medián celkového přežití (OS) u skupiny > 60 let byl 46 měsíců, u mladších nebyl dosažen ( $p < 0,002$ ). Nebyl zjištěn rozdíl v OS mezi podskupinou >70 let (20 p) vs. >75 let (22 p),  $p = 0,66$ . Imunochemoterapií bylo léčeno i 8 nemocných ve věku >80 let v době diagnózy, a to v sedmi případech antracyklinovým režimem s redukcí dávky doxorubicinu nebo s mitoxantronem. Šest z osmi nemocných > 80 let žije s mediánem sledování 24 měsíců. Závěr: vyšší věk nemocných není kontraindikací podání kurativní terapie u nemocných s DLBCL. V našem souboru jsme ověřili význam věku jako negativního prognostického faktoru. Nebyl shledán rozdíl mezi výsledky léčby pacientů nad 70 let vs. nad 75 let. Celkem 75 % nemocných nad 80 let v době diagnózy dokončilo úspěšně terapii a nadále žije. Kurativní léčba je tedy možná i u většiny starších nemocných. Nezbytností je kvalitní podpůrná terapie, zejména správné používání růstových faktorů (G-CSF) v rámci primární profylaxe febrilní neutropenie. Pro volbu léčby tak není rozhodující kalendářní věk nemocného, ale biologický. Celkově musí být léčba u této věkové kategorie mnohem více individualizována než u mladších jedinců. Podpořeno grantem NR/9453-3 IGA MZ ČR a výzkumným záměrem MZO 00179906 MZ ČR.

1500.

**Léčba nemocných s difúzním B-velkobuněčným lymfomem: chemoterapie s rituximabem zlepšuje prognózu nemocných ve všech věkových skupinách**

Papajík Tomáš, Procházka Vít, Raida Luděk, Faber Edgar, Kubová Zuzana, Urbanová Renata, Hubáček Jaromír, Hluší Antonín, Szotkowski Tomáš, Vondráková Jana, Kučerová Ladislava, Tichý Martin, Mysliveček Miroslav, Štícha Michal, Pavlík Tomáš, Indrák Karel (*Hemato-onkologická klinika FN a LF UP, Olomouc; Ústav patologie FN a LF UP, Olomouc; Klinika nukleární medicíny FN a LF UP, Olomouc; IBA MU, Brno*)

Difúzní B-velkobuněčný lymfom (DLBCL) je nejčastějším podtypem skupiny ne-hodgkinových lymfomů (NHL), když tvoří více než 1/3 ze všech nově diagnostikovaných případů. Kombinovaná chemoterapie s antracyklinem se stala standardem léčby již před více než 25 lety. Kombinace této chemoterapie s rituximabem (anti-CD20 protilátka, R) významně zlepšila přežití u starších a nízké rizikových mladších nemocných. Řada dat naznačuje, že kombinace R s intenzivní chemoterapií může zlepšit osud mladších nemocných s kumulací rizikových faktorů. Na vlastním pracovišti jsme retrospektivně analyzovali data nemocných s DLBCL léčených chemoterapií s nebo bez přidání R od roku 1995. 290 nově diagnostikovaných pacientů s DLBCL bylo léčeno plně-dávkovanou chemoterapií založenou na antracyklinu. Nemocní mladší 65 let byli rozděleni do 3 prognostických skupin a podle individuálního rizika byli léčeni chemoterapií CHOP, PACEBO v rámci intenzivní sekvenční léčby a nejrizikovější skupina pak i léčbou vysoce dávkovanou s autologní transplantací krvetvorných buněk. Pacienti ve věku 65 let a starší byli léčeni chemoterapií CHOP. Od roku 2003 byl k chemoterapií přidán R. 3-leté celkové přežití (OS) bylo 84% ve skupině s R a 59% ve skupině léčené jen chemoterapií ( $p < 0,001$ ). 3-letý interval bez progresse nemocnění (PFS) byl 85% ve skupině s R a 64% ve skupině bez přidání R ( $p = 0,002$ ). Léčba s použitím R zlepšila OS a PFS u pacientů mladších 65 let i pacientů nad tento věk (OS: 90% vs 71%, and 69% vs 37%;  $p < 0,001$ ), (PFS: 87% vs 68%, and 78% vs 53%;  $p = 0,09$ ). R také zlepšil 3-leté OS u mladších nemocných s aaIPI 2-3 v porovnání s pouhou chemoterapií (91% vs 45%;  $p < 0,001$ ), kdežto OS aa-IPI 0-1 nebylo statisticky odlišné (90% vs 89%;  $p = 0,76$ ). U nemocných léčených R bylo nalezeno statisticky méně relapsů/progresí (9% vs 30%;  $p < 0,001$ ) a úmrtí (13% vs 46%;  $p < 0,001$ ). V multivariátní analýze byly věk, velikost nádoru, počet lymfocytů, IPI a terapie s R identifikovány jako nezávislé prognostické faktory pro délku OS. Prognosticky stratifikovaná terapie u mladších pacientů a přidání R ve všech věkových skupinách významně zlepšuje PFS a OS u nemocných s DLBCL. Podpořeno VZ MŠMT 619 895 9205 a 619 895 922 a grantem IGA NR/9502-3.

1577.

**Vliv primární lokalizace difúzního velkobuněčného B-lymfomu na léčebnou odpověď po indukční terapii a na celkové přežití**

Kubová Zuzana, Papajík Tomáš, Procházka Vít, Šedová Zuzana, Pavlík Tomáš, Indrák Karel  
(Hemato-onkologická klinika FNOL, Olomouc; IBA, MU, Brno)

Úvod: Více jak 1/3 de novo ne-Hodgkinských lymfomů (NHL) vzniká v mimouzlinových lokalizacích, dokonce i v místech, kde se normálně lymfatická tkáň nenachází. Difúzní velkobuněčný B-lymfom (DLBCL) tvoří téměř 50% všech primárně extranodálních lymfomů. DLBCL představuje heterogenní jednotku s odlišnými klinicko-biologickými znaky, mimo jiné i v závislosti na primární lokalitě onemocnění. Cíl: Hodnocení léčebné odpovědi a přežití pacientů s DLBCL v závislosti na primární lokalizaci onemocnění, respektive na primárně nodálním (PN) a extranodálním postižením (PEN). Metody: Hodnotili jsme soubor 314 pacientů s nově diagnostikovaným DLBCL, léčených v období od roku 1995 až 2007 na Hemato-onkologické klinice FN Olomouc. Jako PEN DLBCL bylo definováno onemocnění s dominantním postižením orgánu či tkáně s žádným či minimálním postižením regionálních uzlin. Poměrné zastoupení PEN v souboru činilo 20% (N=63), PN 69% (N=218), zbývajících 11% (N=33) tvořili pacienti s primárně mediastinálním velkobuněčným B-lymfomem (PMBL). Mezi hodnocené modalitě byla zahrnuta léčebná odpověď po indukční plně dávkované chemoterapii, pravděpodobnost celkového přežití (OS) a pravděpodobnost přežití bez progresu onemocnění (PFS) ve vztahu k počtu postižených uzlinových a mimouzlinových lokalit. Výsledky: PEN DLBCL nejčastěji zahrnovalo postižení GIT (37%), Waldeyerův okruh (25%), kůže (14%), kost a kostní dřev (8%), štítná žláza (6%), varle (5%), měkké tkáně (3%), slezina (2%). Kompletní remise onemocnění po plně dávkované indukční chemoterapii dosáhlo 85% PEN DLBCL, 66% PN DLBCL s postižením 1-2 uzlinových lokalit a 42% PN DLBCL s postižením více jak 3 uzlinových regionů. Nejvyšší pravděpodobnost OS a PFS ve 3 letech měli pacienti s PEN DLBCL, nejnižší pak pacienti s PN DLBCL s postižením více jak 3 uzlinových lokalit (OS: PEN vs. PN 82,9% vs. 57,8%,  $p < 0,001$ , PFS: PEN vs. PN 80,7% vs. 60%,  $p = 0,002$ ). Ve vztahu k počtu postižených mimouzlinových lokalit měli nejvyšší pravděpodobnost OS a PFS ve 3 letech pacienti s postižením 1 orgánu či tkáně oproti pacientům s PN DLBCL či s vícečetným postižením PEN DLBCL (OS: 80,1% vs. 65,1% a 61,1%,  $p = 0,008$ , PFS: 80,1% vs. 67,5% a 67,2%,  $p = 0,077$ ). Závěr: Primárně extranodální lokalizace DLBCL byla spojena s lepší odpovědí na plně dávkovanou indukční terapii, s lepším celkovým přežitím a s delší dobou bez progresu onemocnění. Dedicováno NR9502-3/2007.

1482.

**Korelace úpravy počtu lymfocytů a přežívání bez relapsu po autologní transplantaci periferních kmenových buněk u pacientů s Hodgkinovým lymfomem**

Móciková Heidi, Vacková Blanka, Pytlík Robert, Obrtlíková Petra, Trněný Marek (1. Interní klinika a 1. LF UK VFN, Praha)

Úvod. Cílem této retrospektivní studie bylo vyhodnocení korelace úpravy počtu lymfocytů a přežívání bez relapsu (PFS) po autologní transplantaci periferních kmenových buněk (ASCT) u pacientů (pt) s primárně progredujícím nebo relabujícím Hodgkinovým lymfomem (HL) a analýza faktorů, které ovlivňují přežívání. Pacienti a metody. Retrospektivně jsme vyhodnotili 33 pt s HL, kteří byli autologně transplantováni od roku 2000 do konce roku 2008. Analyzované faktory: klinické stadium a věk v době relapsu, relaps  $< 12$  měsíců a  $> 12$  měsíců, chemosenzitivita relapsu, PET pozitivita před ASCT, počet lymfocytů a CD34 buněk v podaném štěpu, absolutní počet lymfocytů (ALC) v periferní krvi před separací kmenových buněk, ALC den 15 a den 90 po ASCT, charakteristiky příhojení a infekce prvních 6 měsíců po ASCT. Výsledky. Před ASCT 14/33 pacientů bylo v kompletní remisi, 7/33 v parciální remisi, 8/33 mělo stabilní nemoc a 4/33 mělo primárně progredující HL. Medián věku: 34 let (rozsah 19-57). Medián podaných CD34+buněk:  $6,8 \times 10^6$  /kg (rozsah 4,1-34,7). Medián ALC v periferní krvi před separací:  $1,2 \times 10^9$  /L, ALC den 15:  $0,7 \times 10^9$  /L, ALC den 90:  $1,35 \times 10^9$  /L. Medián sledování: 3,6let. 3letý medián celkového přežití (OS) a PFS je 82% a 71%. Nebyla zjištěna korelace mezi PFS a stavem remise v době ASCT, podanými lymfocyty a počtem podaných CD34+ buněk, počtem ALC před separací, počtem ALC den 15 nebo dobou příhojení. ALC den 90  $> 0,75 \times 10^9$  /L (HR=0,205,  $p = 0,017$ ) byl signifikantně spojený s PFS v univariační analýze. Závěr. V naší retrospektivní studii na malém souboru pacientů byl absolutní počet lymfocytů den 90 spojený se zlepšeným PFS. Na základě našich údajů počet lymfocytů po autologní transplantaci by mohl být faktorem, který ovlivňuje relaps lymfomu.

1528.

**Nodulární Hodgkinův lymfom s predominancí lymfocytů, naše zkušenosti s diagnostikou a léčbou**

Šmardová Lenka, Král Zdeněk, Janíková Andrea, Vášová Ingrid, Šálek David, Navrátil Milan, Navrátilová Andrea, Mayer Jiří (Interní hematoonkologická klinika FN a LF Masarykovy univerzity Brno, Brno)

Úvod: Nodulární Hodgkinův lymfom s predominancí lymfocytů (NLPHD) představuje vzácnou variantu Hodgkinova lymfomu (asi 5% všech případů). Charakteristickými nádorovými buňkami jsou tzv. L&H buňky (lymfocytárně-histiocytární neboli „popcorn cells“) vycházející z buněk germinálního centra. Onemocnění postihuje



nejčastěji muže středního věku v počátečním klinickém stádiu bez systémových příznaků. Průběh je indolentní a i přes větší riziko zvláště pozdních relapsů má ve srovnání s klasickou variantou Hodgkinova lymfomu lepší prognózu. Vzácně se může transformovat do difúzního velkobuněčného B lymfomu (DLBCL). Materiál: Od roku 1995 bylo na naší klinice léčeno celkem 14 pacientů s diagnózou NLPHD, 10 mužů a 4 ženy. Medián věku v době diagnózy byl 32 let (18-71). Většina pacientů (N=11) byla diagnostikována v počátečním klinickém stádiu. Z hlediska uzlinových lokalit jednoznačně převládalo postižení periferních lymfatických uzlin (krku, axil a třísel). Všichni pacienti byli v době diagnózy asymptomatictí. Výsledky: Pacienti byli léčeni s ohledem na klinické stádium onemocnění a komorbiditu. Většina podstoupila léčbu kombinací chemoterapie (2-8 cyklů ABVD) a radioterapie IF 30 Gy (N=8), 2 pacienti s pokročilým onemocněním byli léčeni pouze chemoterapií (6x eskalovaný BEACOPP), 2 pacienti pouze radioterapií (30 a 41 Gy). U jednoho pacienta ve vyšším věku jsme vzhledem k jeho komorbiditě indikovali podání rituximabu v monoterapii (6x 375mg/m<sup>2</sup>). Další pacient s pokročilým onemocněním byl v úvodu léčen režimem R-CHOP pro diagnózu blíže nespecifikovaného B lymfomu, až na základě třetího čtení na referenčním pracovišti v Německu byla diagnóza přehodnocena na NLPHD a pacient dokončil léčbu režimem R-BEACOPP. U 2 pacientů jsme za 7 resp. 12 let po ukončení primární léčby diagnostikovali DLBCL, další výskyt relapsů nebo sekundárních malignit jsme nezaznamenali. Všichni pacienti s NLPHD léčení na našem pracovišti žijí v kompletní remisi, medián sledování celého souboru je 17,4 měsíců. Závěr: Obvykle limitovaný rozsah onemocnění a indolentní klinický průběh umožňují u pacientů s NLPHD podání méně intenzivní léčby, která může v indikovaných případech zahrnovat i rituximab vzhledem k pravidelné CD 20 pozitivitě nádorových L&H buněk. Pro diagnostickou obtížnost je doporučováno druhé čtení histologických preparátů na erudovaném pracovišti, v rámci diferenciální diagnostiky je nutné odlišit zejména TCRBCL a klasický typ Hodgkinova lymfomu (bohatý na lymfocyty).

## CML A MYELOPROLIFERATIVNÍ ONEMOCNĚNÍ

1597.

**Kritéria WHO 2008 pro diagnostiku Ph-myeloproliferativních onemocnění.**

**Kritika a doporučení České skupiny pro Ph- MPO**

Schwarz Jiří, Penka Miroslav, Indrák Karel, Pospíšilová Dagmar (Praha, Brno, Olomouc)

V posledních desetiletích se pro klinickou klasifikaci a diagnostiku chronických Ph- myeloproliferativních onemocnění (MPO) užívají kritéria PVSG (Polycythemia Vera Study Group). Způsob histopatologického hodnocení nedokáže odlišit časná stádia jednotlivých subtypů MPO.

PVSG užívá ke stanovení diagnózy primárního MPO celou řadu kritérií, která mohou vyloučit sekundární, resp. potvrzovat primární charakter těchto stavů, ne vždy však s jistotou odliší primární MPO od reaktivního stavu. Napak Evropská klinická a patologická (ECP) kritéria z r. 2002 a kritéria WHO z r. 2001 jsou založena na pozitivní identifikaci primárních MPO na histopatologickém podkladu. Jednotlivé nosologické jednotky (esenciální trombocytémie – ET, primární myelofibróza – PMF a polycythaemia vera – PV) jsou patologem navzájem odlišitelné, a to v podstatě bez ohledu na KO. V souladu s tím je možné rozpoznat i prefibrotické stádium PMF nebo prepolycytemickou PV (klinicky se dle PVSG kritérií shodně projevují jako ET), suverénně jsou odlišeny sekundární stavy. Nová kritéria WHO z r. 2008 jsou u Ph-MPO jakýmsi průnikem původních PVSG kritérií a WHO 2001. Česká skupina pro Ph- MPO (ČSMPO) již upozornila na řadu nedostatků této klasifikace. „Malá“ kritéria (připomínajících PVSG klasifikaci) se v diagnostice ET a PMF jeví jako nadbytečná ve světle pozitivního rozpoznání nosologické jednotky na základě histologie coby „velkého kritéria,“ navíc v případě PMF „malá“ kritéria téměř vylučují možnost diagnózy prefibrotické fáze onemocnění. Nová kritéria také nejsou vhodná pro pediatrickou hematologii. ČSMPO před 2 lety souhlasila s tím, že mutace genu JAK2 V617F může při současné polyglobulii (event. zvýšení celkového erytrocytárního volumu) postačovat k diagnóze PV bez potřeby biopsie (ta je však klíčová v případě suspekce na JAK2- PV). Nelze však s kritérii WHO 2008 souhlasit v tom, že stejný význam má i průkaz mutace v exonu 12 genu JAK2 – ta je spojena s poněkud rozdílným klinickým obrazem (bývá méně častá a méně výrazná leukocytóza a trombocytémie) i s odlišnou histopatologií. ČSMPO tedy pro klinické užití v ČR doporučuje nadále klasifikaci WHO 2001, event. ECP kritéria, s tím, že do klasifikace začlenila mutaci JAK2 V617F. U pacientů bez možnosti diagnostické klasifikace podle WHO 2001/ECP 2002 lze doporučovat užívání kritérií PVSG. ČSMPO nedoporučuje termín WHO 2008 „myeloproliferativní neoplázie,“ zůstává u původního pojmu „chronická MPO.“

1590.

**Korelácia výsledkov morfolologickej a genetickej analýzy kostnej drene pacientov s klinicky potvrdenou esenciálnou trombocytémiou**

Marcinek Juraj, Burjanivová Tatiana, Balhárek Tomáš, Szépe Peter, Lasabová Zora, Plank Lukáš (Ústav patologickéj anatómie a Konzultačné centrum hematopatológie JLF UK, Martin; Ústav molekulárnej biológie JLF UK, Martin)

ÚVOD: Mutácia JAK2V617F (JAK2) sa vyskytuje v skupine myeloproliferatívnych neoplázií (MPN), ovplyvňujúc ich laboratórny obraz, klinickú manifestáciu, a občas i prognózu. Biopťické vyšetrenie kostnej drene (KD) zohráva dôležitú úlohu pri potvrdení JAK2- MPN,

ako aj pri odlišení skorých štádií esenciálnej trombocytemie (ET) od iných MPN (najmä primárnej myelofibrózy - PMF). Vplyv JAK2 na morfológiu KD, ako i prognózu pacientov s ET je nejasný. Preto sme sa zamerali na analýzu morfológie KD a prítomnosti JAK2 u pacientov s klinicky potvrdenou ET. METÓDY: Vyšetřili sme 64 pacientov (20 mužov, 44 žien, vekový priemer 52,7r) s celkovým počtom 80 vzoriek KD, u ktorých ošetrujúci hematológovia potvrdili ET. Osobitne hodnotená bola skupina biopsií odobratých v skorých štádiách ET (trvanie do 2r.). Analýza KD sa zamerala na klasickú morfológiu ET (normocelularita, proliferácia megakaryocytov - mgk s typickou morfológiou, žiadne resp. minimálne zmnoženie retikulínu), ako aj na znaky netypické pre ET. JAK2 sme vyšetřovali alelo-špecifickou PCR z DNA izolovanej z parafrínových blokov KD. Štatistickú analýzu sme realizovali  $\alpha$ -kvadrátovým testom. VÝSLEDKY: JAK2 sme zaznamenali u 41 (64%) pacientov s celkovým počtom 48 biopsií KD. Morfológia KD prevažne zodpovedala klasickému morfológickému obrazu ET, avšak relatívne často s malým množstvom atypických morfológických znakov (atypie a dysplázie mgk, myelofibróza), ktorých výskyt stúpal po terapii resp. v dlhodobom priebehu. V JAK2+ prípadoch ET sme častejšie pozorovali lymfoidné agregáty (v prípadoch skorých štádií ET) a minimálne zmnoženie retikulínu (prípustné pre dg. ET), v JAK2-ET rozvinutú myelofibrózu a v celkovom súbore 80 vzoriek i vyššiu celularitu KD a častejšie „obláčikovitú“ mgk (typické skôr pre PMF). Ostatné sledované parametre nevykazovali štatisticky relevantné rozdiely. ZÁVER: V súlade s inými štúdiami sme nepotvrdili zásadnejší vplyv mutácie JAK2 na morfológiu ET. Častejšia prítomnosť netypických morfológických znakov v JAK2- prípadoch mohla byť spôsobená prímiesou iných MPN (PMF klinicky mylne považovaná za ET), ale nemožno vylúčiť ani vplyv doteraz neznámych patomechanizmov JAK2- MPN a malého súboru pacientov. Prítomnosť JAK2 je dôležitá pre potvrdenie MPN, avšak vzhľadom na neprítomnosť rozdielov v morfológii KD a prognóze pacientov zatiaľ nie je potrebné subtypizovať ET vzhľadom na prítomnosť mutácie.

#### 1526.

##### **Buddův-Chiariho syndrom u detských pacientů s polycythemia vera**

Pospíšilová Dagmar, Marková Jana, Schwarz Jiří, Komrka Vladimír, Novák Zbyněk, Cario Holger (*Dětská klinika LF UP a FN, Olomouc; ÚHKT, Praha; Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK, FN Motol, Praha; Dětská klinika, Univerzität nemocnice, Ulm - Germany*)

Úvod. Polycythemia vera (PV) se nejčastěji vyskytuje ve věkové skupině 50-60 let, pouze 1/1000 pacientů je mladší 20 let. Literární zdroje shrnující klinické a laboratorní charakteristiky dětských pacientů s PV jsou sporadické. Dětské pacienti s primární erytrocytózou mají obvykle pouze příznaky přechodné mikrovaskulár-

ní obstrukce, polycytemie však může být příčinou závažných trombotických komplikací. V práci jsou shrnuta klinická a laboratorní data dvou dětských pacientů s PV, u kterých se vyskytla vzácná, ale obávaná komplikace: Buddův-Chiariho syndrom (BCS). Pacienti a metody. U dvou dětských pacientů s polycythemia vera a BCS bylo provedeno základní hematologické vyšetření. Hladina EPO byla stanovena standardním způsobem, pro vyšetření EECs byla použita dříve popsaná metoda (Grieshammer et al, 2004), pro detekci mutace genu pro JAK2 kinázu alelově specifická PCR s modifikací alelově specifických primerů (Baxter et al, 2005). Mutace genu pro JAK2 kinázu v exonu 12 byla potvrzena sekvenováním. Výsledky. Oba pacienti měli mírnou trombocytózu, pacient č.1 i leukocytózu. U obou byl pozitivní nález EECs a nízká hladina EPO. U 11-ti letého chlapce se objevil postupně narůstající ascites s progredující poruchou jaterních funkcí, při základním vyšetření byla zjištěna polycytemie s nálezem mutace JAK2V617F. Byla potvrzena diagnóza BCS. Pro závažné postižení jater byla provedena ortotopní transplantace jater. Pacient žije 7 let po transplantaci. U 12-ti leté pacientky byla diagnóza polycytemie zjištěna při vyšetření pro synkopy. O dva roky později se manifestovala hepatosplenomegalie a ascites, byl diagnostikován BCS. Byla podána streptokináza, heparin a Warfarin. Vzhledem k rozvoji jícnových varixů byl založen transjugulární portosystémový shunt, který vedl ke snížení tlaku v portálním řečišti a regresi hepatosplenomegalie. U pacientky byla nalezena mutace JAK2N542-E543del. Při skríninku vrozeného trombofilního rizika byla prokázána heterozygotní mutace F5R506Q (faktor V Leiden) a F2G20210A. Závěr. Buddův-Chiariho syndrom je vzácná komplikace u dětí s PV, která může být život ohrožující. Dosud bylo popsáno pouze 7 případů. U většiny z nich byl BCS první manifestací PV. Riziko trombotických epizod zvyšuje přítomnost mutací genu pro JAK2 kinázu a může být potencováno dalšími vrozenými trombofilními stavy. Mutace v exonu 12 je dávána do souvislosti s nejzávažnějšími trombotickými komplikacemi. Práce byla sponzorována grantem IGA MZ: NR 9471-3.

#### 1483.

##### **Kvantitativní stanovení hladiny transkriptů BCR-ABL v ČR v roce 2008**

Rulcová Jana, Machová Poláková Kateřina, Vlčanová Kateřina, Zemanová Karla, Moravcová Jana (*ÚHKT, Praha*)

Molekulární monitorování množství transkriptu BCR-ABL, molekulárního markeru chronické myeloidní leukemie (CML), slouží ke sledování stavu pacientů s tímto onemocněním. Bylo prokázáno, že zvyšování hladiny BCR-ABL naznačuje progresi choroby, snížení naopak úspěšnou léčbu. Různé metodické přístupy kvantifikace BCR-ABL transkriptu (od izolace RNA až po použitý kontrolní gen při RT-PCR) mohou vést k rozdí-



ným výsledkům v jednotlivých laboratořích. V současné době probíhá mezinárodní standardizace s cílem získávat srovnatelné výsledky, které jsou mimo jiné součástí mezinárodních klinických registrů. Národní referenční laboratoř pro DNA diagnostiku ÚHKT Praha, jmenovaná ČIA pilotním pracovištěm pro oblast kvantitativního stanovení hladiny transkriptu BCR-ABL, provedla v roce 2008 mezilaboratorní zkoušení způsobilosti v ČR v rámci mezinárodní standardizace pod záštitou European LeukemiaNet (projekt EUTOS). Zkoušení způsobilosti se účastnily 4 laboratoře (FN Brno, FN Hradec Králové, FN Plzeň, Nemocnice Na Homolce Praha) a pilotní pracoviště. Pro porovnání byly připraveny vzorky dle instrukcí Dr. Müllera (III. Medizinische Klinik, Mannheim). K testování byly použity anonymizované vzorky pacienta s CML a zdravého dobrovolného dárce. Z periferní krve byly metodou osmotické lýzy získány leukocyty, z kterých byly připraveny trizolové lyzáty o koncentraci  $2 \times 10^7$  buněk/mL a smíchány tak, aby byly pozitivní řádově 10%, 1%, 0,1% a 0,01%. Takto připravené vzorky byly v tripletech rozeslány poštou jednotlivým laboratořím. Ve všech laboratořích probíhala kvantifikace BCR-ABL metodou real-time RT-PCR: používané kontrolní geny: 4x ABL a 1x B2M; přístroje pro real-time PCR: 3x RotorGene, 1x Light Cycler, 1x ABI 7300; standardy: 4x komerční (Ipsogen), 1x vlastní plasmidy. Všechny laboratoře dosáhly předpokládané citlivosti metody, tj. 10 kopií BCR-ABL (0,01% BCR-ABL). V daném rozsahu měření (nebo v rozmezí 0,1 – 10%) byla potvrzena linearita u všech laboratořích. Naměřené hodnoty BCR-ABL byly použity pro výpočet přepočtových koeficientů (rozmezí 1,2-10,02) platných pro měření do 10% BCR-ABL v rámci standardizace v projektu EUTOS. Výsledky laboratoře používající vlastní primery, sondy a standardy, byly nejvíce odlišné (koeficient 10) v porovnání s ostatními laboratořemi používající primery, sondy a standardy dle EAC, proto doporučujeme používat primery, sondy a standardy shodně dle EAC.

#### 1498.

##### **Neměnná hladina BCR-ABL v hodnotách $\geq 0,1\%$ (IS) u pacientů s CML odpovídajících optimálně na imatinib kompletní cytogenetickou remisí indikuje detekci mutací**

Machová Poláková Kateřina, Polívková Václava, Rulcová Jana, Žáčková Markéta, Klamová Hana, Žáčková Daniela, Jurček Tomáš, Dvořáková Dana, Nádvořníková Sylvie, Mayer Jiří, Moravcová Jana (*Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha; IHOK LF MU a FN, Brno*)

Nejlépe charakterizovaným mechanismem rezistence na léčbu imatinibem u pacientů s chronickou myeloidní leukémií jsou mutace v kinázové doméně BCR-ABL. V současné době je celosvětově doporučováno vyšetřovat na přítomnost mutací pacienty, u nichž léčba imatinibem selže nebo odpovídá suboptimálně a pacienty s 2.6

– 5 násobným nárůstem hladiny BCR-ABL v jakékoli fázi onemocnění či odpovědi na léčbu. Detekce mutací a zjištěný typ napomáhají volit změnu terapie inhibitory tyrozinových kináz (TKI) druhé generace se známou citlivostí k nejčastějším typům mutací. Kinetika hladiny BCR-ABL v průběhu monitorování odpovědi na léčbu TKI odráží stav onemocnění. U pacientů odpovídajících suboptimálně často dochází k zastavení poklesu množství BCR-ABL na ustálené hladině (trend je neměnný, směrnice je nulová). Podobný jev jsme zaznamenali i u některých pacientů odpovídajících na léčbu TKI optimálně kompletní cytogenetickou remisí (CCgR). Ze 141 pacientů v CCgR po podání imatinibu a v jednom případě dasatinibu, jsme u 32 (23%) zaznamenali zastavení poklesu hladiny BCR-ABL na hodnotách  $\geq 0,1\%$  (IS, International Scale). Hladina zůstala neměnná minimálně ve 3 následných odběrech (min doba trvání 6-9 měsíců). Median follow-up neměnné hladiny BCR-ABL byl 12 měsíců (rozsah 6-64). Vzorky periferní krve 32 pacientů byly vyšetřeny na přítomnost mutací metodou přímé sekvenace. Mutace byla detekována v 11 případech (34%) a byla potvrzena v dalších odběrech nárůstem množství mutovaného BCR-ABL. U 5/11 pacientů jsme již v průběhu studie zaznamenali molekulární relaps. Doba mezi první detekcí mutace a signifikantním nárůstem hladiny BCR-ABL byla 4 – 17 měsíců (medián 5). Mutace nebyla detekována u 20/32 pacientů. U 14/20 pacientů zůstala neměnná hladina BCR-ABL po dobu 6-64 měsíců (medián 12). U 6/20 pacientů byl po prvním zastavení hladiny BCR-ABL po dobu 7-28 měsíců (medián 11) zaznamenán pokles hladiny o cca 1 řád, přičemž se hladina podruhé zastavila po dobu 5-22 měsíců (medián 11). U 3/6 pacientů mohlo k tomuto nepravidelnému poklesu hladiny BCR-ABL dojít v důsledku intermitentně snižované dávky imatinibu na 300 mg/den v průběhu léčby, u jednoho pacienta mohla sehrát roli další chromozomální aberace v Ph+ buňkách. Na základě naší studie doporučujeme zahájení detekce mutací při zastavení poklesu hladiny BCR-ABL na jakékoli hladině  $\geq 0,1\%$ , což umožní časné identifikovat riziko progresu onemocnění u pacientů odpovídajících na léčbu imatinibem CCgR.

#### 1546.

##### **Účinnost a bezpečnost imatinibu v první linii léčby chronické myeloidní leukemie (CML).**

##### **Analýza databáze INFINITY**

Žáčková Daniela, Klamová Hana, Doubek Michael, Pospíšil Zdeněk, Dvořáková Dana, Jurček Tomáš, Moravcová Jana, Machová Kateřina, Dobešová Blanka, Ryšavá Jana, Cetkovský Petr, Mayer Jiří (*IHOK, FN a MU, Brno; ÚHKT, Praha; Ústav matematiky a statistiky, MU, Brno*)

Imatinib doslova revolučním způsobem změnil léčbu CML. Jeho účinnost vyniká zejména u nově diagnostikovaných pacientů v chronické fázi (CP). Většina informací o účinnosti a toleranci imatinibu v první linii po-

cháží ze studie IRIS a z nedávno publikovaných zkušeností jednoho centra. Potvrzujících dat z reálného života je tak stále třeba. Data o všech pacientech léčených imatinibem pro CML v 1. CP v definovaném regionu v období mezi 6/2003 až 12/2008 byla shromažďována v databázi zvané INFINITY. Do analýzy bylo zahrnuto celkem 147 pacientů (medián věku 54 let, 22-77; 67 mužů a 80 žen). Medián doby sledování od zahájení léčby byl 22 měsíců (1-56). Procenta léčebných odpovědí dosažených ve 3., 6., 12 a 18. měsíci byla následující: kompletní hematologická odpověď: 84%, 87%, 90% a 94%, velká cytogenetická odpověď: 82%, 82%, 85% a 81% a kompletní cytogenetická odpověď: 35%, 49%, 62% a 74%. Velké molekulární odpovědi ve 12., 18. a 24. měsíci bylo dosaženo u 41%, 49% a 52% pacientů; poklesu hladiny BCR/ABL transkriptů pod úroveň detekce pak u 5, 10 a 20% pacientů. Výskyt nehematologické toxicity všech stupňů klesal ze 67% ve 3. měsíci k 31% ve 24. měsíci; přičemž stupeň 3/4 byl přítomen jen ve 13 případech. Ještě výraznější byl trend poklesu u toxicity nehematologické; z 51% ke 12% ve stejných časových bodech. Celkem 28 pacientů (19%) trvale přerušilo léčbu imatinibem v mediánu 15,5 měsíců (1-51) z různých důvodů: alogenní transplantace krvetvorných buněk (n=4), nehematologická (n=5) a hematologická toxicita (n=1; pacientka následně zemřela na septický šok), progresse do akcelerované fáze nebo blastické krize (n=2), nedosažení kompletní hematologické remise (1), nedosažení velké či kompletní cytogenetické odpovědi (n=5) nebo jejich ztráta (n=8). Celkem 25 pacientů (17%) přešlo na alternativní léčbu: alogenní transplantaci (n=4), dasatinib (n=18), nilotinib (n=1) a hydroxyureu (n=2) v mediánu 15 měsíců (1-51). Zaznamenali jsme 5 úmrtí: 1 případ je popsán výše, 2 pacienti zemřeli na imatinibu z důvodů nesouvisejících s CML a 2 pacienti zemřeli po ukončení imatinibu z důvodu progresse onemocnění. Potvrdili jsme velmi dobrou účinnost a toleranci imatinibu se zlepšující se tendencí v čase na populaci pacientů léčených mimo klinické studie. Časná identifikace skupiny pacientů, u kterých léčba imatinibem selhává nebo je suboptimální, může výsledky dále zlepšovat. Podpořeno The Czech Leukemia Study Group for Life, CELL.

### 1507.

#### Účinnost zvýšení dávky imatinibu (IM) při selhání standardního dávkování u nemocných s chronickou myeloidní leukemií předléčenou interferonem- $\alpha$ (INF- $\alpha$ )

Faber Edgar, Kuba Adam, Rožmanová Šárka, Divoká Martina, Skoumalová Ivana, Plachý Radek, Rohoň Peter, Holzerová Milena, Jarošová Marie, Indrák Karel (*Hemato-onkologická klinika FN a LF UP, Olomouc; LF UP, Olomouc*)

V případě rezistence nebo suboptimální odpovědi na standardní dávky IM je u nemocných s CML odborní-

ky skupiny European Leukemia Net jako první možnost doporučována eskalace dávek imatinibu (EDIM) na 600-800mg denně. Naším cílem bylo ověřit efektivitu tohoto postupu u nemocných předléčených INF- $\alpha$ . Provedli jsme retrospektivní studii, v níž jsme se snažili zjistit vliv iniciálního rizika CML, přídatných cytogenetických abnormalit, příčin rezistence k IM a odpovědi na léčbu na účinnost eskalovaných dávek IM. Byl analyzován soubor 65 nemocných s CML, kteří byli předléčeni INF- $\alpha$ . Medián intervalu od stanovení diagnózy CML po zahájení léčby IM byl 15 měsíců (1-102 měsíců). Medián délky sledování od diagnózy byl 81 měsíců (32-169 měsíců), zatímco medián sledování od zahájení léčby IM byl 60 měsíců (7-98 měsíců). EDIM byla užita celkem u 14 pacientů (21,6%): u jednoho nemocného k léčbě hematologické rezistence, u 9 ke zvládnutí cytogenetické progresse a u 4 pro suboptimální odpověď. Medián intervalu od zahájení léčby IM do EDIM byl 28 měsíců (4-54 měsíců). Po standardních dávkách IM byla u 8 nemocných po mediánu 10 měsíců dosažena kompletní cytogenetickou odpověď (CyR) trvajících v mediánu 8 měsíců. Medián trvání EDIM byl 9 měsíců (6-14 měsíců). Po EDIM 5 pacientů dosáhlo kompletní a 7 velkou CyR průměrného trvání 9 a 14 měsíců. Nicméně pouze dva nemocní dosáhli velké molekulární odpovědi (MR). Většina nemocných byla převedena na inhibitory tyrosinové kinázy 2. generace pro hematologickou (2 pacienti; 14,3%), cytogenetickou rezistenci (6 pacientů; 42,9%) nebo suboptimální odpověď (1 pacient; 7,1%). Pouze 4 nemocní (28,6%) v současnosti pokračují s EDI. Závěry: u většiny nemocných s INF- $\alpha$  předléčenou CML vedla EDIM k přechodné CyR trvajících méně než jeden rok. Odpověď na EDIM byla asociována s nepřítomností přídatných cytogenetických změn, mutací v ABL doméně tyrosinové kinázy a s dosažením velké MR. Další prognostické faktory včetně Sokalova rizika nebo odpovědi na standardní dávku IM nehrály roli. Ke zhodnocení účinnosti EDIM u nemocných s CML předléčenou INF- $\alpha$  s rezistencí na standardní dávky IM je nezbytné analyzovat větší skupiny pacientů. Studie byla podpořena grantem IGA MZ NS 9949-3 a granty MŠMT MSM 6198959223 a MSM 6198959205.

## AKUTNÍ LEUKEMIE

### 1413.

#### Sekundární akutní myeloidní leukemie – zkušenosti Hemato-onkologické kliniky FN Olomouc v období let 1996 - 2008

Szotkowski Tomáš, Rohoň Peter, Zapletalová Jana, Sičová Kateřina, Hubáček Jaromír, Indrák Karel (*HOK FN, Olomouc; Ústav lékařské biofyziky LF UP, Olomouc*)

Úvod: Sekundární akutní myeloidní leukemie (sAML) vznikají buď vývojem z předchozího klonálního postižení krvetvorby, obvykle myelodysplastického syndromu

(MDS) nebo myeloproliferativní neoplázie (MPN), nebo po expozici leukemogenní noxe v podobě předchozí chemoterapie, aktinoterapie, některých imunosupresiv nebo leukemogenních látek z okolního prostředí. Sekundarita je u AML významným nepříznivým prognostickým faktorem. Tato onemocnění jsou z velké části (kromě sekundárních promyelocytárních leukemií) považována za konvenčně nevyléčitelná. Metody: Obsahem této práce je retrospektivní analýza souboru nemocných, diagnostikovaných a léčených na Hemato-onkologické klinice FN Olomouc v letech 1996-2008. Soubor nemocných: V letech 1996-2008 bylo na našem pracovišti diagnostikováno celkem 574 onemocnění AML u 573 nemocných. U 430 nemocných z celkového počtu šlo o primární AML, u 86 nemocných leukemie vznikla sekundárně progresí předchozího myelodysplastického syndromu, 57 nemocných bylo v přechodobí sledováno a léčeno pro různá maligní onemocnění nebo podstoupilo potenciálně leukemogenní léčbu pro nemaligní choroby. Výsledky: Nemocní se sekundární AML jsou starší, jsou méně často léčeni než nemocní s primární AML. Mají častěji horší prognózu podle cytogenetického nálezu. Mají nižší pravděpodobnost dosažení kompletní remise, častěji relabují a jejich celkové přežití je horší téměř ve všech prognostických podskupinách. Kromě sekundárních promyelocytárních leukemií, jejichž prognóza se ani v našem souboru neodlišuje od velmi dobré prognózy primárních forem, jde až na výjimky o konvenčně nevyléčitelné choroby. Vypracováno s podporou grantu IGA MZ ČR NR 9481-3 a VZ MŠMT ČR 6198959205.

### 1393.

#### **Prognostický význam vyšetření periferní krve v průběhu léčby dětské akutní lymfoblastické leukémie (ALL)**

Volejníková Jana, Froňková Eva (*Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol, Praha*)

Vyšetření minimální reziduální nemoci (MRN) v kostní dřeni (KD) je nedílnou součástí moderních protokolů pro léčbu ALL. Rychlost poklesu MRN během indukce představuje jeden z nejdůležitějších prognostických znaků a je klíčová pro rozdělení pacientů do rizikových skupin. Měření MRN v periferní krvi (PK) se rutinně neprovádí, přestože by znamenalo mnohem menší zátěž pro pacienty. U T-ALL byla prokázána velmi dobrá korelace hladin MRN v PK a KD; výsledky studií B-prekurzorové (BCP)-ALL nejsou jednoznačné, mj. proto, že zahrnují malý počet vzorků z časných fází léčby s kvantifikovatelnou MRN v obou kompartmentech. Vyšetřili jsme MRN v KD i PK metodou RQ-PCR kvantifikace přestaveb genů pro imunoglobuliny a T-buněčné receptory u 221 párů vzorků od 47 dětí s BCP-ALL léčených podle protokolu ALL IC-BFM 2002 v následujících časových bodech: diagnóza (dg, n=47), den 8 (d8, n=39), den 15 (d15, n=44), den 33 (d33, n=34), týden 12 (w12, n=31) a ukončení léčby (post-MT, n=26). U 125 párů vzorků byla

MRN detekována v KD i PK, u 18 párů pouze v KD a u 5 párů pouze v PK. Hladina MRN v PK výrazně kolísala a byla v průměru 149x nižší než v KD (0,04-8293x). Pacienti s nízkou MRN v PK (stejně jako v KD) v d15 častěji dosáhli MRN negativitu KD v d33 (p=0,01, Mann Whitney). Pacienti mladší 10 let měli nižší MRN v PK v d8 a d15 než starší děti (p=0,03 a p=0,01). Pacienti s hyperdiploidní ALL měli nižší MRN v PK (ale ne v KD) v d15 než ostatní pacienti s výjimkou TEL/AML1 pozitivních (p=0,05). V žádném časovém bodě nebyla zjištěna asociace s počtem leukocytů při diagnóze, pohlavím, imunofenotypem (cALL/pre-B ALL) ani s přítomností fúzního genu TEL/AML1. 5-leté přežití bez relapsu (RFS) bylo u pacientů s MRN<10<sup>-4</sup> v PK v d15 100%, zatímco u MRN vyšší než 10<sup>-4</sup> pouze 62,5±9,9% (p=0,0089). Pro dg, d8 a d33 nebyla statisticky významná hranice MRN nalezena, malé množství pozitivních w12 a post-MT vzorků neumožnilo analýzu. Pravděpodobnost relapsu byla vyšší u pacientů s podobnou hladinou MRN v PK a KD (poměr MRN v KD/PK<10) ve dnech 8 a 15 (d8: RFS 88,1±6,4% vs. 61,5±13,5%, p=0,04; d15: RFS 89,5±5,7% vs. 54,5±15%, p=0,01). Závěr: Hladina MRN v PK u dětí s BCP-ALL není oproti KD pouze doporučeně snížena a má důležitou prognostickou hodnotu. Častější relapsy u pacientů s podobnou hladinou MRN v PK a KD poukazují na vysoký potenciál jejich leukemických blastů migrovat z KD do PK, unikát léčbě a dát vznik relapsu. Podpořeno GAUK 7393/2007, VZ MSM 0021620813, MZ 000064203.

### 1392.

#### **Léčba dospělých pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií dle protokolu GMALL 07/2003 v České republice a její výsledky – zkušenosti dvou center**

Folber František, Šálek Cyril, Doubek Michael, Soukupová Maaloufová Jacqueline, Valová Taťána, Trka Jan, Cetkovský Petr, Mayer Jiří (*IHO FN, Brno; ÚHKT, Praha; CLIP FN Motol, Praha*)

Úvod: V této retrospektivní analýze prezentujeme dvouleté zkušenosti s léčbou akutní lymfoblastické leukémie dospělých (ALL) dle protokolu německé studie GMALL 07/2003 na dvou velkých hematologických pracovištích v České republice. Metody: Do studie bylo zařazeno celkem 37 pacientů. Hodnotili jsme dosažení kompletní a molekulární remise, výskyt relapsu a stav pacientů na konci sledovaného období. Byl sledován výskyt nežádoucích účinků po jednotlivých cyklech chemoterapie a příčiny úmrtí. Byla provedena statistická analýza rizikových faktorů ovlivňujících přežití pacientů. Výsledky: Kompletní remise bylo dosaženo u 36 (97 %) pacientů, molekulární remise u 16 (62 %) z 26 vyšetřitelných pacientů. Relaps onemocnění byl pozorován u 5 (14 %) pacientů. Na konci období sledování s mediánem 261 dní bylo 28 (76 %) pacientů živých v kompletní remisi, jeden (3 %) s relabovaným onemocněním a 8 (22 %) mrtvých. Příčinou smrti byla v 5 případech toxicita léčby a u 3 pa-



cientů relaps či progresse ALL. Nežádoucí účinky léčby následovaly nejčastěji po 1. konsolidaci, 1. fázi indukce, 2. konsolidaci a 2. fázi indukce. Šlo většinou o infekční komplikace v rámci febrilní neutropenie, mukosiditu GIT a nežádoucí účinky PEG-asparaginázy. Toxicita alogenní transplantace byla obvyklá, čtyři (25 %) pacienti po transplantaci zemřeli. Dvouleté přežití bez progresse bylo 66 %, dvouleté celkové přežití 70 %. Jako prognosticky nepříznivé rizikové faktory byly identifikovány vysoké riziko, věk pacientů nad 35 let, infiltrace CNS, relaps onemocnění a přetrvávající pozitivita minimální zbytkové nemoci. V diskuzi dále popisujeme praktické zkušenosti a možná úskalí tohoto protokolu. Závěr: Naše počáteční zkušenosti jsou pozitivní. Léčba je proveditelná, dosavadní výsledky velmi dobré a toxicita přijatelná. Pacienti s vysokým rizikem by měli být směřováni k alogenní transplantaci, jelikož výsledky samotné konsolidační chemoterapie jsou v této skupině velmi špatné. Myslíme si, že tento léčebný protokol by se mohl stát standardem léčby akutní lymfoblastické leukemie dospělých v České republice.

1547.

#### Dlouhodobé sledování dětí léčených pro akutní lymfoblastickou leukémií podle protokolů BFM

Smíšek Petr, Starý Jan, Janatová Iveta, Kramaržová Karolína, Gajdoš Petr, Blažek Bohumír, Černá Zdena, Hak Jiří, Hrstkova Hana, Jabali Yahia, Mihál Vladimír, Procházková Daniela, Šterba Jaroslav (*Klinika dětské hematologie a onkologie, FN Motol, Praha; Státní zdravotní ústav, Praha; Dětská klinika, FN, Ostrava; Dětská klinika, FN, Plzeň; Dětská klinika, FN, Hradec Králové; I. dětská interní klinika, FN, Brno; Dětská klinika, nemocnice České Budějovice; Dětská klinika, FN, Olomouc; Dětská klinika, MN, Ústí nad Labem; Klinika dětské onkologie, FN, Brno*)

Léčba dětí s akutní lymfoblastickou leukémií (ALL) je v České republice (ČR) od druhé poloviny 80. let minulého století sjednocena a probíhá podle protokolů BFM. Prvním společným terapeutickým protokolem byl ALL BFM 83. Postupné zavádění protokolu v jednotlivých centrech a počáteční absence jednotné databáze brání jeho kvalitnímu statistickému zpracování. V letech 1990 – 1996 probíhala léčba podle protokolu ALL BFM 90. Do studie bylo v 8 centrech v ČR zařazeno 350 pacientů. V letech 1996-2002 byl používán protokol ALL BFM 95, podle kterého bylo léčeno 380 pacientů. Výsledky léčby jednotlivých používaných protokolů jsou známé a byly publikovány. Desetileté přežití bez události u dětí léčených protokoly ALL BFM 90 a ALL BFM 95 se neliší (EFS = 70,5±2,4%, resp. 72,1±2,3%), je však trend k signifikantně lepšímu celkovému přežití na protokolu ALL BFM 95 (OS = 76,6 ± 2,3%, resp. 80,2 ± 2,1%). Méně známý je další osud léčených pacientů, méně se ví o jejich zdravotním stavu a případných komplikacích v delším odstupu od chemoterapie. Pokusili jsme se zjistit sou-

časný stav pacientů léčených v ČR podle uvedených protokolů. V remisi přežívá 267 (76,3%) pacientů léčených podle protokolu ALL BFM 90. V posledním roce bylo vyšetřeno 216 (80,9%) z nich, déle než 5 let nebyl kontakt se 14 dětmi. Pacientů léčených podle ALL BFM 95 žije 306 (80,5%), v posledních 12 měsících jsme vyšetřili 290 (94,8%), více než 5 let zůstávají bez kontaktu pouze 3 děti. Sekundární malignitu jsme zaznamenali u 5 (ALL BFM 90), resp. u 2 (ALL BFM 95) pacientů. Kumulativní riziko vzniku sekundární malignity je 1,9 ± 0,8% na protokolu ALL BFM 90 a 0,6 ± 0,4% na protokolu ALL BFM 95. Jako sekundární malignitu jsme zaznamenali 3x Hodgkinův lymfom, 1x akutní myeloidní leukémii, 1x histiocytární sarkom, 1x astrocytom a 1x karcinom mléčné žlázy u chlapce. V současné době je většina sledovaných pacientů bez závažnějších zdravotních obtíží, pokračuje ve studiu nebo pracuje. Pouze menší část pacientů vyžaduje pravidelné sledování odborným lékařem. K častějším obtížím patří zejména endokrinopatie (thyreopatie, hypergonadotropní hypogonadismus, diabetes mellitus), ortopedické problémy (způsobené zejména aseptickými nekrozami) a neurologické problémy. Pozitivní je také skutečnost, že někteří pacienti již založili rodinu a mají jedno či dvě děti. Podporováno VZ FNM 00064203.

## MALIGNÍ LYMFOMY 2

1563.

#### Transplantace krvetvorných kmenových buněk po nemyeloablativní přípravě s fludarabinem a cyklofosfamidem u nemocných s maligními lymfoproliferacemi

Raida Luděk, Faber Edgar, Papajík Tomáš, Vondráková Jana, Indrák Karel, Langová Kateřina (*HOK FN, Olomouc; Katedra biofyziky LF UP, Olomouc*)

Úvod: Kombinace fludarabinu a cyklofosfamidů (FLU+CY), event. doplněná o antithymocytární globulin (ATG), může zajistit dostatečnou imunosupresi příjemců podstupujících alogenní transplantaci krvetvorných kmenových buněk. Imunosuprese je nezbytným předpokladem stabilního přijetí dárčevských buněk a následného rozvoje reakce štěpu proti nádoru (GvT). Tento potenciál imunologické eliminace nádoru je hlavním důvodem indikace transplantací u nemocných s jinak inkurabilními maligními lymfoproliferacemi. Soubor nemocných a metody: 24 nemocných s věkovým mediánem 48 (28 - 59) let bylo alogenně transplantováno pro relabující/refrakterní maligní lymfoproliferativní onemocnění: 8x B chronická lymfatická leukémie (B-CLL), 5x Hodgkinův lymfom (HL), 7x B a 4x T ne-hodgkinské lymfomy (NHL). 10 pacientů (42%) bylo připravováno režimem FLU+CY, 14 (58%) FLU+CY+ATG. Dárce byl u 13 nemocných (54%) HLA-identický sourozenec, u 11 (46%) nepříbuzný dárce. Periferní kmenové buňky byly podány 21 (87%), kostní dřeň 3 (13%) příjemcům s mediánem převedených CD34+ a jaderných buněk 5,86 (1,2 - 8,8) x 10<sup>6</sup>/kg, resp. 7,05 (1,59 - 15,65) x 10<sup>8</sup>/kg.

Prevence nemoci štěpu proti hostiteli (GvHD) byla u 18 příjemců (75%) zajištěna pouze cyklosporinem A (CSP-A), který byl u zbylých 6 (25%) doplněn mykofenolát mofetilem (MMF). Medián potransplantačního sledování nemocných byl v době analýzy 21 (1 - 86) měsíců. Výsledky: Všechny 24 pacientů primárně přihojilo štěp a nehematologická toxicita nepřesáhla stupeň I. U 9 nemocných (38%) došlo k rozvoji akutní GvHD. Chronická GvHD byla pozorována u 10 z 23 hodnotitelných příjemců (43%). 21 nemocných (88%) dosáhlo kompletní remise (KR), 2 (8%) parciální remise (PR) a 1 (4%) stabilizace choroby. Bylo zaznamenáno 6 (25%) relapsů a 1 (4%) progresse lymfomu. 6 příjemců (25%) zemřelo na potransplantační komplikace a 3 (13%) na progresi základního onemocnění. Předpokládané pětileté přežití bez progresse choroby (PFS) a celkové přežití (OS) bylo 34%, resp. 43%. Závěr: Imunosupresivní kombinace fludarabinu s cyklofosfamidem (+/- ATG) zajišťují, bez závažnější orgánové toxicity, stabilní přihojení dárčovských buněk u nemocných s lymfomy. U významné části příjemců pak dárčovské imunokompetentní buňky umožní dlouhodobou kontrolu a úplnou eliminaci jinak chemorefrakterního nádoru. Podpořeno Výzkumným záměrem MŠMT MSM-6198959205.

#### 1481.

##### **Význam 18F-FDG PET/CT pro stážování ne-hodgkinových lymfomů: významné zlepšení v detekci postižení lymfatických uzlin a mimouzlinových orgánů**

Papajík Tomáš, Mysliveček Miroslav, Šedová Zuzana, Mociková Heidi, Magdalena Skopalová, Koza Vladimír, Malán Alexander, Procházka Vít, Buriánková Eva, Chroust Karel, Trněný Marek, Indrák Karel (*HOK FN a LF UP, Olomouc; 1. interní klinika VFN a 1. LF UK, Praha; PET Centrum, Nemocnice Na Homolce, Praha; Hematologicko-onkologické oddělení, FN, Plzeň; Oddělení nukleární medicíny, FN, Plzeň; IBA MU, Brno*)

Přesné hodnocení rozsahu onemocnění u ne-hodgkinových lymfomů (NHL) má zásadní význam pro jejich optimální léčbu a prognózu. 18F-fluorodeoxyglukózová (18F-FDG) pozitronová emisní tomografie (PET) kombinovaná s výpočetní tomografií (CT) se v tomto směru jeví jako slibná zobrazovací technika, která kombinuje metabolická a morfologická data. Výsledný obraz tak může zlepšit přesnost detekce nádorových ložisek. Cílem naší multicentrické prospektivní studie bylo porovnání PET, CT a PET/CT nálezů u pacientů s nově diagnostikovaným, neléčeným NHL, analýza četnosti diskrepantních obrazů a zjištění vlivu PET/CT na změnu stádia onemocnění. Do studie bylo zahrnuto 118 pacientů s histologicky potvrzeným NHL (53 DLBCL, 22 FL, 13 T-NHL, 11 MCL, 8 MZL, 3 SLL, 3 LBL, 5 B-NHL NS), u kterých bylo před zahájením léčby provedeno celotělové PET/CT. PET a CT snímky byly hodnoceny nezávisle lékařem nukleární medicíny a radiologem, kteří pak konsenzuálně hodnotili PET/CT snímky. Celkem bylo zhodnoceno 9516 anatomických lokalit na

PET, CT a PET/CT skenech. Se znalostí PET/CT nálezu, histopatologických, laboratorních a klinických dat bylo hematologem určeno stádium choroby dle Ann Arbor klasifikace. Jen 1 nemocný byl hodnocen jako PET-negativní (18F-FDG ne-avidní) případ. U 21 pacientů (18%) byla nalezena PET-negativní lymfadenomegalie dle kritérií CT. Naopak u 15 pacientů (13%) byla detekována PET-pozitivní uzlina normální velikosti dle CT. 29 pacientů (25%) mělo PET-negativní organomegalii a 22 nemocných (19%) zase PET-pozitivní lézi v morfologicky normálním orgánu. V porovnání s CT objevilo PET vyšetření výrazné změny u 73 pacientů (62%). Tato informace ale vedla ke změně stádia jen u 13 z nich (11%). 18F-FDG PET/CT vyšetření významně zlepšuje přesnost iniciálního stážování nemocných s NHL a metoda 18F-FDG PET je výrazně citlivější v zobrazení uzlinových i mimouzlinových ložisek lymfomu v porovnání s CT. Tato informace má však jen omezený vliv na změnu stádia choroby. Podpořeno grantem IGA MZ CR No. NR/9502-3.

#### 1381.

##### **Integrated 18F-FDG PET/CT may predict the outcome of patients with T-cell lymphomas**

Procházka Vít, Kubová Zuzana, Papajík Tomáš, Indrák Karel, Mysliveček Miroslav, Kučerová Ladislava, Buriánková Eva (*Department of Hemato-Oncology, PET/CT Centre, Department of Nuclear Medicine, Institute of pathology, Faculty Hospital and Medical Faculty Palacky University, Olomouc*)

18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography (PET) is a highly sensitive method for imaging of lymphomas. A recently developed integrated PET/CT system provides both anatomical and functional imaging at the same position. Achieving PET negativity after therapy has a strong prognostic impact. Predictive power of PET/CT imaging in T-cell lymphomas is still poorly studied. Aim: To evaluate the predictive role of PET negativity using integrated FDG PET/CT restaging in population of patients with newly diagnosed T-cell lymphoma. Method: We studied a cohort of 20 patients (pts), who had PET-avid T-cell lymphoma at the time of diagnosis. Histological subtypes were: peripheral T-cell lymphoma, unspecified (n=11), anaplastic large cell lymphoma (ALK-1-pos. n=1, ALK-1-neg. n=5), enteropathy-associated T-cell lymphoma (n=2), angioimmunoblastic lymphoma (n=1), Sézary syndrome (n=1). All pts were examined with PET/CT at the time of diagnosis and after first-line therapy. The PET scan was defined as positive if higher than mediastinal or background activity was observed. The CT scans were assessed according to the conventional criteria (Cheson, 1999). Results: After first-line therapy, PET negativity was achieved in 8 pts (40%), whereas 12 (60%) remained PET-positive. Treatment response (CT) was as follows: CR/CRu n=8 (PET-negative n=7, PET-positive n=1), PR n=4 (PET-negative n=1, PET-positive n=3), SD n=3 and PD n=5 (all SD and PD cases PET-positive). At

the time of follow-up, only 1/8 (12.5%) of the PET-negative pts died and 2/8 (25%) relapsed or progressed. Of the 12 PET-positive pts, 8 (66.6%) died and 6 (50%) relapsed or progressed. The overall survival (OS) at 2 years reached 46% (95% CI 0.16-0.75); progression-free survival was 17% (95% CI 0.00-0.45). While the 2-year OS in the PET-negative subgroup was 67% (95% CI 0.13-1.00), it dropped to 30% (95% CI 0.00-0.62) in the PET-positive subgroup (log rank 0.033). Summary: The overall prognosis of patients with T-cell lymphomas is still poor. Our pilot data show that PET positivity after first-line therapy is frequently associated with chemoresistant, rapidly progressive disease and extremely low survival. On the other hand, patients with PET-negative CR have a chance of longer survival. The value of interim PET/CT assessment as a method for early identification of poor responders should be further clarified. Supported by the Czech Ministry of Health (IGA NR/9502-3).

#### 1588.

##### **Nádorové duplicity jako vedlejší 18 FDG - PET/CT nálezy u našich pacientů s diagnózou non-Hodgkinův lymfom**

Šedová Zuzana, Starostka David, Mysliveček Miroslav, Mikula Peter, Kučerová Ladislava, Kubová Zuzana, Buriánková Eva, Papajík Tomáš (HOK, Klinika nukleární medicíny, Ústav patologie FN a LF UP, Olomouc; Oddělení klinické hematologie, Havířov)

Úvod: Základem vstupního stážování a určení rozsahu non-hodgkinových lymfomů (NHL) se stalo vyšetření 18 FDG – PET/CT. 18 FDG – PET pozitivní tkáň nemusí vždy znamenat lymfom, ale vyšší metabolismus glukózy vykazují také buňky jiných, především solitárních, nádorů. Cílem naší práce je poukázat prostřednictvím 4 kazuistik na možnost výskytu nádorové 18 FDG-PET pozitivní extranodální duplicity při iniciačních 18FDG-PET/CT vyšetřeních u nově diagnostikovaných NHL. Výsledky: Ve spolupráci s Klinikou nukleární medicíny FNOL a OKH v Havířově jsme od roku 2007 zaznamenali 4 případy nádorové duplicity. Všichni pacienti měli v rámci iniciačního 18 FDG-PET/CT pro nově diagnostikovaného NHL, pozitivní extranodální ložisko, ve kterém následně byl histologicky potvrzen jiný maligní nádor. U první pacientky byl prokázán současný výskyt folikulárního lymfomu a adenokarcinomu plic. Výsledky transbronchiální punkce byly na začátku kultivačně i cytologicky negativní. V důsledku perzistence ložiska po vysokodávkované imunochemoterapii byla provedena parciální lobektomie, které odhalila nádorovou duplicitu. U druhé pacientky šlo o současný nálezy difúzního velkobuněčného lymfomu a medulárního karcinomu štítné žlázy, výrazná 18 FDG-PET pozitivita v ložisku štítné žlázy při iniciačním vyšetření vedla k histologické verifikaci zmíněné duplicity. Obdobně i u třetí pacientky s diagnózou difúzního velkobuněčného lymfomu iniciační 18 FDG-PET/CT odhalilo ložisko v levém prsu, histolo-

gický nálezy poté prokázal duktální invazivní karcinom. Posledním případem byl pacient s tumorem CNS, v rámci diagnostického šetření bylo provedeno 18 FDG – PET/CT vyšetření s nálezem 18 FDG-PET pozitivní ložisko v rektu. Případ byl uzavřen jako nádorová duplicita - adenokarcinom in situ v adenomatózním polypu rekta u pacienta s primárním lymfomem CNS. Závěr: Výskyt duplicitního maligního onemocnění u pacientů s NHL, ještě před zahájením chemoterapie, není tak častý jako sekundární malignity po léčbě. Ve většině případů se jedná o náhodný nálezy v rámci 18 FDG – PET/CT při stážování NHL. Nádorová duplicita často nebývá na počátku odhalena, neboť není bez řádného histologického vyšetření od lymfomové tkáně odlišitelná a navíc často nemá specifické klinické projevy. Na našich případech bychom rádi demonstrovali nutnost pečlivého hodnocení každého 18 FDG-PET pozitivního ložiska, a v případech podezření na nádorovou duplicitu, nezbytnost jeho histologické verifikace. Podpořeno grantem IGA MZ ČR č. NR/9502-3.

#### 1527.

##### **Polymorfizmy a mutace DNA reparačních genů u non-Hodgkinských lymfomů**

Havránek Ondřej, Kleibl Zdeněk, Souček Pavel, Trněný Marek (1. interní klinika - klinika hematologie 1. LF UK a VFN, Praha; Ústav biochemie a experimentální onkologie 1. LF UK, Praha; Laboratoř toxikogenomiky SZU, Praha)

Hledání genetických faktorů ovlivňujících riziko vzniku a prognózu non-Hodgkinských lymfomů (NHL) je rozsáhle studovaným tématem. Atraktivním cílem jsou geny kódující proteiny působící v DNA reparačních procesech. Předpokládá se, že poruchy těchto genů se podílejí na patogenezi onemocnění a způsobují častější výskyt chromozomálních aberací typických pro NHL. Studie prokázaly zvýšení rizika vzniku folikulárního lymfomu (OR 1,3; 95%CI 1,03-1,64) u nosičů mutace c.427A>G (p.I143V) genu MGMT (O-6-metylguanin-DNA-metyltransferáza) kódujícího enzym uplatňující se při reparaci alkylačního poškození. Zvýšené riziko vzniku NHL bylo nalezeno také u nosičů mutace c.657del5 genu NBS1 (Nijmegen breakage syndrome 1), jehož proteinový produkt se podílí na rozpoznávání dvouřetězcových zlomů DNA. Z dalších genů bylo popsáno zvýšené riziko NHL pro některé varianty genů H2AX (histon 2AX) a MRE11 (meiotic recombination 11) kódující proteiny regulující reparaci dvouřetězcových zlomů DNA. Studium lymfomových nádorových buněk prokázalo rovněž častý výskyt somatických mutací postihujících DNA reparační geny. Mutace tumor supresorového genu p53 byly nalezeny v 10-20% difúzních velkobuněčných B-lymfomů (DLBCL). U pacientů s těmito nádory bylo prokázáno zhoršení celkového přežití (1,9 x zvýšené riziko úmrtí spojené s DLBCL). Podobné výsledky byly publikovány pro mutace p53 ve folikulárních lymfomech a mantle cell lymfomech. V experimentální práci jsme se zaměřili na mutační analýzu dědičných alterací ge-



nu CHEK2 u pacientů s NHL. Produktem CHEK2 genu je proteinkináza podílející se na přenosu a amplifikaci signálu při opravách dvouřetězcových zlomů DNA. Z našich dosavadních výsledků vyplývá, že místem s nejvyšším výskytem alterací v genu CHEK2 [c.470T>C (p.I157T), c.538C>T (p.R180C), c.542G>A (p.R181H), IVS1-5T>A, IVS2+1G>T, IVS2+24C>T] je oblast zahrnující vysoce konzervativní FHA (fork head-associated) doménu (exony 2 a 3). Četnost alterací v exonu 2 a 3 se u pacientů s NHL (5,31%, 19/358) signifikantně lišila od četnosti u kontrolní populace (2,78%; 19/683; OR 2,01; 95%CI 1,05-3,86; p=0,03). Další alterace genu CHEK2 jsou vzácné [c.122C>T (p.S41F), IVS10+28A>G], nebo se jedná o polymorfizmy, jejichž četnost se mezi populacemi nelišila [c.252A>G (p.E84E), IVS1+39dupA, IVS4-78\_100dup23]. Publikované studie potvrzují, že se vybrané alterace DNA reparačních genů podílejí na patogenezi NHL a ovlivňují riziko vzniku a prognózu onemocnění. Podpořeno GAUK33508 a VZ MŠMT MSM0021620808.

#### 1456.

##### **Molekulární diagnostika lymfomu z buněk pláště (MCL) extranodální lokalizace**

Břízová Helena, Kalinová Markéta (*Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN Motol, Praha*)

Lymfom z buněk pláště (MCL) je onemocnění s nepříznivou prognózou, rychlou progresí a odolností ke konvenční terapii B- buněčných non-Hodkinovských lymfomů (B-NHL). Z toho důvodu je významná správná iniciační diagnóza a molekulární sledování onemocnění. Pro MCL je charakteristická přítomnost translokace t(11;14). Důsledkem je přesun genu pro cyklin D1 pod kontrolu „enhancerů“ těžkých řetězců imunoglobulinů na chromosomu 14 a transkripční deregulace genu pro cyklin D1. Overexprese cyklinu D1 v důsledku translokace t(11;14) je molekulárním markerem MCL, protože cyklin D1 není v B lymfocytech exprimován. Na pracovišti provádíme kvantitativní sledování hladiny exprese cyklinu D1 pomocí PCR v reálném čase. Konvenční stanovení s využitím normalizace k housekeeping genu poskytuje spolehlivý nástroj diferenciální diagnostiky pouze B-NHL uzlinové lokalizace. Diferenciální diagnostika extranodálních lymfomů je komplikována přítomností epiteliálních a endoteliálních buněk s fyziologickou expresí cyklinu D1, která zkrusluje analýzu v nádorové populaci. Pro diagnostiku extranodálních lymfomů jsme zavedli stanovení dalších normalizačních transkriptů, CD19- molekula specifická pro B lymfocyty a cyklin D2, cyklin D3- molekuly fyziologické regulace buněčného cyklu B lymfocytů. Expresi CD19 jsme vyšetřili u 80 vzorků MCL, 21 mucosa associated lymphoma tissue (MALT) lymfomů a 12 ostatních NHL, cyklinu D2 u 74 MCL, 18 MALT lymfomů a 8 NHL, cyklinu D3 u 70 MCL, 16 MALT lymfomů a 8 NHL. Hladinu cyklinu D1 jsme normalizovali k možným kombinacím hladiny beta2-mikroglobulinu, CD19, cyklinu D2 a cyklinu D3. Ja-

ko nejučinnější jsme prokázali normalizaci ke kombinaci exprese cyklinu D2 a D3, která umožnila stanovit spolehlivý „cut-off“ limit fyziologické exprese cyklinu D1 a správně zařadit 93/94 (99%) lymfomů. Overexpresi cyklinu D1 nad fyziologickou hladinu jsme detekovali u všech 70 MCL, žádného z ostatních NHL, kromě 1/16 extranodálních MALT lymfomů, u kterého jsme následně pomocí FISH zjistili 3 signály pro lokus cyklinu D1, což zvyšuje genovou dávku cyklinu D1 a vede k detekci zvýšené hladiny mRNA. Použitím dalších normalizačních transkriptů cyklinu D2 a cyklinu D3 jsme dosáhli výrazného zpřesnění detekce hladiny exprese cyklinu D1, která není ovlivněna nespecifickou expresí cyklinu D1 nelymfocytárními buňkami ve vzorku. Zavedli jsme přístup, který umožnil se 100% spolehlivostí diferenciální diagnózu MCL, včetně lymfomů extranodální lokalizace. Podpořeno MZ ČR 00064203.

## ANÉMIE / EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE 1

#### 1559.

##### **Atypické formy anémií v České republice aneb co přináší imigrace**

Pospíšilová Dagmar, Divoká Martina, Ludíková Barbora, Houda Jiří, Lapčíková Anna, Gregůrková Jana, Novák Zbyněk, Prečová Monika, Kolářková Monika, Kalandrová Eliška, Indrák Karel, Mihál Vlado (*DK FN, Olomouc; HOK FN, Olomouc; Ústav biologie LF UP, Olomouc*)

Úvod. Výskyt některých druhů anémií je zcela typický pro různé části světa. Z důvodu narůstající migrace obyvatelstva je však nutno rozšířit naše diferenciálně-diagnostické úsilí i o anémie, které se v našich geografických podmínkách vyskytují ojediněle. Na případu dvou dětí demonstrujeme diagnostické postupy při vyšetření anémií v rodinách imigrantů. Pacienti a metody. První pacient je šestiletý chlapec z Nigérie přijatý k hospitalizaci pro středně těžkou normocytární anémii s podezřením na anémii chronických chorob. Druhou pacientkou je dvouleté batole z Moldávie vyšetřené pro těžkou mikrocytární anémii, která nereagovala na léčbu železem. U obou pacientů byly vyšetřeny: krevní obraz, markery metabolismu železa (volné železo v séru, transferin, solubilní transferinový receptor – sTf, celková vazebná kapacita železa) a další speciální hematologické testy, jako elektroforéza hemoglobinu (ELFO Hb), izopropanolový test, test na Heinzova tělíska, test kryohemolýzy a sekvencování globinových genů. Výsledky. První pacient měl normocytární anémii (Hb 81 g/l), retikulocytózu (9,7 %), vysokou hladinu sTfR (27,7 mg/l) a hyperbilirubinémii. ELFO Hb ukázalo majoritní podíl HbS a minoritní podíl HbF. Molekulárně-genetické testy potvrdily, že pacient je homozygot pro mutaci v kodonu 6 β-globinového genu vedoucí k srpkovité anémii. Dívka měla těžkou mikrocytární anémii (Hb 69 g/l, MCV 74,5 fl) s retikulocytózou (4,9 %), měla vysokou hladinu železa v séru (47,4 μmol/l), zvýšenou hladinu ferritinu (351

ng/ml) a zvýšený sTfR (34,7 mg/l). ELFO Hb prokázala pouze frakci HbF. Test kryohemolýzy byl negativní. Restriční a sekvenční PCR analýzou bylo potvrzeno, že dívka je dvojitý heterozygot pro mutace  $\beta$ -globinového genu CD 39 (C-T) a CD 8 (-AA), vedoucí k  $\beta$ -talasemii major. Srpkovité resp. terčovité erythrocyty, typické pro tuto nemocnění, byly patrné v nátěrech periferní krve. Závěr. Oba typy anémie jsou zcela ojedinělými nálezy u dětí v České republice. Na srpkovitou anémii a talasemii major je v našich podmínkách nutno pomýšlet především u dětí imigrantů s těžkými projevy vrozené anémie. Podpořeno granty NS9935-3 (MZ ČR) a MSM6198959205 (MŠMT).

**1524.**

#### **Incidence anémie u dětských pacientů s Crohnovou chorobou**

Pospíšilová Dagmar, Houda Jiří, Vymětalová Z., Petrželová L., Karásková E., Mihál V. (*Dětská klinika LF UP a FN, Olomouc*)

Úvod. Crohnova choroba (CD) patří mezi nespecifické střevní záněty, které jsou u dětí méně časté než u dospělých. Její incidence v posledních letech však výrazně narůstá. I přes pokroky v diagnostice a léčbě má toto nemocnění stále značnou morbiditu. Jedním z faktorů, které mohou významně ovlivnit kvalitu života dětských pacientů, je přítomnost anémie. Cílem práce je zhodnotit výskyt a tíži anémie v době diagnózy v souboru dětských pacientů s Crohnovou chorobou. Pacienti a metody. Soubor pacientů tvoří 56 dětí s CD, kteří jsou sledováni v gastroenterologické ordinaci Dětské kliniky Fakultní nemocnice v Olomouci. Jedná se o 34 chlapců (61%) a 22 dívek (39%) ve věku 6 - 20 let (průměr 16,17 roku). Věk diagnózy CD je 4 - 18 let (průměr 12,75 let). Byly hodnoceny tyto údaje: výskyt anémie u pacientů v době stanovení diagnózy a její základní charakteristiky: hodnota hemoglobinu, středního objemu erythrocytů (MCV), střední koncentrace Hb (MCH), hladina železa, feritinu a transferinového receptoru v séru, frekvence podání transfúzí, vliv anémie na fyzickou aktivitu pacienta. Výsledky. Anémie v době diagnózy byla přítomna u 40 pacientů (71,42%), anémie s hodnotou hemoglobinu pod 100g/l byla zjištěna u 9 pacientů souboru (16,07%). 44,64% pacientů mělo sníženou hodnotu MCV a 71,43% pacientů mělo sníženou hodnotu MCH. Transfúze erythrocytární masy byla podána pouze jedné pacientce. Fyzická aktivita byla anémií ovlivněna u 6 pacientů (10,71%). Hladina železa byla snížena u 44 pacientů (78,6%), hladina feritinu byla snížena pouze u 10 pacientů (17,86%), hladina transferinového receptoru byla zvýšena u 10 pacientů (17,86%). Závěr. Anémie u dítěte může být počátečním příznakem závažného onemocnění a její odhalení bývá prvním důvodem k pátrání po vážném systémovém onemocnění, které může být dosud klinicky němé. U dětí s bolestmi břicha by přítomnost anémie, která splňuje charakteristiku anémie chronických chorob, měla být imperativem pro diagnostické vyloučení Crohnovy choroby.

Detailní analýza parametrů anémie s cílem odlišit skutečný nedostatek železa v klidové fázi nemoci od anémie doprovázející aktivní zánět je nezbytná ke stanovení správného způsobu léčby. Práce byla sponzorována výzkumným záměrem MŠMT: MSM 6198959205.

**1465.**

#### **Mutace v genu pro erytroidně specifickou syntetázu delta-aminolevulové kyseliny (ALAS2) jako příčina sideroblastické anémie rezpozivní na léčbu pyridoxinem**

Jana Kučerová, Horváthová Monika, Bělohlávková Petra, Vrbacký Filip, Vondráková Jana, Malý Jaroslav, Divoký Vladimír (*Ústav Biologie LF UP, Olomouc; II. interní klinika OKH FN, Hradec Králové; HOK FN, Olomouc*)

Vrozené sideroblastické anémie patří mezi vzácné příčiny hypochromních mikrocytárních anémií. Přítomnost prstenčitých sideroblastů ve dřeni naznačuje poruchu hemové syntézy v mitochondriích. V naší laboratoři jsme vyšetřovali 22-letého nemocného, který byl od dětství sledován pro mikrocytární anémii a nedávno předán k dispenzarizaci na Oddělení klinické hematologie FN v Hradci Králové. Laboratorní parametry nemocného byly následující: Hb 83 g/l; MCV 54,5 fl; retikulocyty 0,0115; normální elektroforéza Hb a vysoká hodnota feritinu 1855 ug/l. V provedeném myelogramu bylo nalezeno 40 % prstenčitých sideroblastů. Protože byl v rodinné anamnéze pozitivní nález sideroblastické anémie, a to u pacientova dědečka a dědečkova bratra, kteří zemřeli na kardiální komplikace z přetížení železem ve 49 a 33 letech, bylo vysloveno podezření na sideroblastickou anémii vázanou na X chromozóm. Byla zahájena léčba vysokými dávkami Pyridoxinu v kombinaci s chelátorem Exjadem (deferasirox) v dávce 1000 mg/denně. Po třech měsících došlo k poklesu feritinu na 653 ug/l se současným vzestupem hodnoty Hb (107 g/l) a mírným nárůstem MCV (59,9 fl). Nejčastější příčinou X-vázané sideroblastické anémie rezpozivní na pyridoxin jsou mutace v genu pro erytroidně specifickou syntetázu delta-aminolevulové kyseliny (ALAS2). U pacienta byla proto provedena sekvenční analýza všech exonů a promotorové oblasti tohoto genu. V pátém exonu ALAS2 byla nalezena hemizygotní mutace A>G způsobující záměnu aminokyseliny Lys > Glu v kodonu 156. Tato mutace zatím nebyla popsána a z její pozice lze předpokládat, že vede ke snížení aktivity enzymu. Mutace vytváří nové štěpící místo pro restriční endonukleázu MnlI, která bude použita pro analýzu přítomnosti mutace u dalších členů rodiny, především pro potvrzení přenašečství u pacientovy zdravé matky. Správně stanovená diagnóza vrozené sideroblastické anémie je důležitá především z hlediska volby léčebných přístupů, které mohou zabránit rozvoji závažných komplikací plynoucích z přetížení železem.

1533.

**Evidence for a molecular mechanism of  $\beta$ -thalassemia caused by insertion of an L1 element into the intron-2 of the  $\beta$ -globin gene**Piterková Lucie, Kučerová Jana, Takáčová Sylvia, Divoký Vladimír (*Institute of Biology, Medical Faculty Palacky University, Olomouc*)

We have reported a novel etiology of  $\beta$ -thalassemia caused by insertion of a transposable element into the  $\beta$ -globin gene (Divoky et al, *Blood*. 1996;88:580; Kimberland, Divoky, et al, *Hum Mol Genet*. 1999;8:1557-1560). The full-length (6 kb) retrotransposon (long interspread nuclear element, LINE-1 or L1) was inserted in the antisense orientation into the intron-2 of the  $\beta$ -globin gene, thereby leading to aberrant  $\beta$ -globinL1 gene. Expression of the  $\beta$ -globinL1 gene was severely reduced and consisted of full-length, correctly processed  $\beta$ -globin gene transcript and a minute amount of three aberrantly spliced transcripts. The exact mechanism by which the intronic insertion of transposable element attenuates gene expression is not known. The environment of the  $\beta$ -globin gene rises possibility of potential disruption of the interaction between  $\beta$ -globin gene promoter and a 3' flanking control region with enhancer activity by the 6 kb long L1. Since we observed the  $\beta$ -globinL1 3' enhancer sequence was methylated, we asked whether this methylation contributes to decreased  $\beta$ -globin gene expression of the  $\beta$ -globinL1 gene. Cell hybrids containing the affected chromosome 11 were treated with demethylating agent 5-azacitidine and/or trichostatin, a histone deacetylase inhibitor. This treatment lead to increased expression of  $\alpha$ -globin gene (as expected), but did not increase the expression of  $\beta$ -globin of the  $\beta$ -globinL1 gene. Based on these preliminary experiments we hypothesize the methylation of the  $\beta$ -globinL1 3' enhancer sequence is secondary event associated with enhancer displacement. There are also several published in vitro findings indicating, that through a combination of transcriptional elongation inhibition and premature polyadenylation, L1 insertions in either orientation can affect the RNA production of endogenous genes, both quantitatively and qualitatively. These hypotheses could also significantly contribute to the final elucidation of the molecular mechanism leading to the thalassemia phenotype caused by  $\beta$ -globinL1. Supported by MZ ČR grant NS9935-3 and by MSM 6198959205.

1575.

**Péče o pacienty s nemocí chladových protilátek, kryoglobulinémií a kryofibrinogenémií před kardiologickými zákroky**Gumulec Jaromír, Brát R., Kolek M., Chrástková B., Kořístka M., Čermáková Z., Nováčková L., Šáchová L., Chasáková K., Ranochová A., Ryzí M., Zuchnická J., Bodzásová C., Plonková H., Matuška M. (*ÚKH FN, Ostrava; Kardiologické centrum FN, Ostrava; Krevní centrum FN, Ostrava; Ústav klinické biochemie FN, Ostrava*)

Na příkladu pacienta s průkazem nemoci chladových aglutininů, který podstoupil kardiologický výkon v hypotermii, prezentujeme známou skutečnost, že chladové aglutininy v chladu indukují hemolýzu erytrocytů a kryoglobuliny nebo kryofibrinogeny mohou po expozici chladu během operačních výkonů prováděných v hypotermii precipitovat nebo gelifikovat a tak zvyšovat viskozitu plazmy a poškodit mikrocirkulaci. Podrobné imunohematologické vyšetřování všech pacientů připravovaných ke kardiologickým výkonům s rizikem rozvoje hypotermie není vzhledem k nízkému výskytu pacientů s klinickým a laboratorním obrazem nemoci chladových aglutininů, autoimunní hemolytické anemie nebo paroxysmální chladovou hemoglobinurií zcela přínosné, navíc nemusí zachytit ani kryoglobulinemii ani kryofibrinogenemii. Jedním z možných řešení je vyhledávání rizikových pacientů podle varovných signálů z anamnézy, fyzikálního a základního laboratorního vyšetření a poté doplnění konfirmačních testů, které by měly podezření na tyto jednotky potvrdit a přesně je definovat. Podle výsledků těchto testů by měla být upravena strategie kardiologického výkonu a perioperační péče. Pro dosažení úspěchu je nezbytná promyšlená, nacvičená a fungující kooperace kliniků s laboratorními pracovníky.

1434.

**Endothelial cells (EC) and Endothelial precursor cells (EPC) kinetics in haematological patients undergoing chemotherapy or autologous stem cell transplantation (ASCT)**Kideryová Linda, Pytlík Robert, Benešová Kateřina, Rychtrmccová Hana, Veselá Romana, Karban Josef, Treněný Marek (*Laboratory of Experimental Cellular Therapy, 1. Department of Internal Medicine, VFN, Praha; Institute of Hematology and Blood Transfusion, Praha*)

Background. Circulating endothelial cells (EC) and endothelial precursor cells (EPC) may reflect tumour load, vessel injury and endothelial healing capacity. Their kinetics during treatment of cancer patients is unknown. Aims. To study the kinetics of circulating endothelial cells (EC) and endothelial precursor cells (EPC) in haematological patients during chemotherapy and autologous stem cell transplant (ASCT). Methods. 18 newly diagnosed patients and 17 patients undergoing ASCT were studied and compared to healthy controls. ECs were evaluated as CD146+CD31+Lin- cells, while EPCs were evaluated as CD34+CD133+Lin- or CD34+VEGFR2+Lin- cells or CFU-En colony forming units. Numbers of these cells were evaluated before and after treatment, and, in patients treated with ASCT, during mobilization of haematopoietic progenitors. Results. Both newly diagnosed patients and patients before ASCT had significantly higher number of CD146+CD31+Lin- cells and significantly lower number of CFU-En colonies than healthy controls. These parameters did not return to normal for at least 3 months after chemotherapy or ASCT. Numbers of CFU-En did not correlated neither



with numbers of CD34+CD133+Lin- cells nor with numbers of CD 34+VEGFR2+Lin- cells, but they correlated with numbers of CD4+ lymphocytes and NK cells. Summary/Conclusions. Haematological patients have higher number of EC and lower numbers of CFU-En than healthy controls. These parameters do not return to normal after treatment, probably as a result of endothelial damage caused by chemotherapy and of ongoing immunological dysfunction. Supported by: VZ 0021620808, GAUK 33/2006, IGA 8754\_3 2006.

1487.

#### Expresní profily miRNA v buněčných liniích pupečnickové krve

Merkerová Michaela, Vašíková Alžběta, Beličková Monika, Bruchová Hana (ÚHK, Praha)

MicroRNA (miRNA) jsou malé nekódující molekuly RNA, které regulují genovou expresi na post-transkripční úrovni. MiRNA jsou důležitými regulátory buněčných procesů jako diferenciace, proliferace či apoptóza. Také hrají významné role při regulaci hematopoézy; bylo prokázáno, že v různých typech krevních buněk a stádiích jejich diferenciace mají miRNA rozdílné expresní profily. V posledních letech vzrůstá zájem o pupečnickovou krev (UCB) jakožto bohatý zdroj kmenových buněk. Od buněk periferní krve (PB) a kostní dřeně (BM) se pupečnicková krev odlišuje nezralou hematopoézou a jiným buněčným zastoupením, přičemž lze očekávat, že tyto rozdíly se odrazí mimo jiné i v odlišné expresi miRNA. Abychom pomohli pochopit molekulární pozadí fenotypových rozdílů u zralé a nezralé krvetvorby, stanovili jsme pomocí TaqMan Low Density Arrays expresní profily miRNA u různých buněčných linií UCB (CD34+ buňky, T-lymfocyty, monocyty a granulocyty) a porovnali je s hladinami miRNA u stejných typů buněk PB a BM. Dále jsme korelovali hladiny diferenciálně exprimovaných miRNA s hladinami jejich cílových genů určenými pomocí expresních microarrays. V CD34+ buňkách UCB jsme detekovali nízkou expresi miR-148a, jejíž hladina inverzně korelovala s hladinou cílového genu DNA methyltransferázou 3B; miR-148a může mít tedy vliv na de novo metylaci v hematopoetických kmenových buňkách (HSC). Prodloužené přežívání HSC může být ovlivněno nízkou expresí miR-143 a miR-145 a následnou up-regulací jejich downstreamových molekul (zvýšená exprese onkogenů c-MYC a miR-17-92 a následná represe tumor supresoru TGFBR2). Dále jsme v HSC pupečnickové krve detekovali zvýšenou expresi 8 miRNA, které jsou prokázanými regulátory HOX genů. Na nezralost imunitního systému UCB by mohla mít vliv miR-146b, jejíž exprese byla zvýšena u granulocytů a T-lymfocytů UCB oproti buňkám PB. U CD34+ buněk UCB jsme detekovali (oproti CD34+ buňkám BM) odlišnou hladinu exprese u 13 miRNA (up-regulace miR-517c, miR-518a, miR-519d a miR-520h; down-regulace let-7b, miR-1, miR-34a, miR-195, miR-203, miR-214, miR-545 a miR-548d). Například o miR-

520h je známo, že podporuje diferenciaci HSC (možná pomocí suprese ID1 a ID3), a miR-214 ovlivňuje apoptickou aktivitu buněk. Souhrnně lze konstatovat, že buňky pupečnickové krve mají specifické expresní profily miRNA, což ukazuje na odlišnou regulaci těchto buněk ve srovnání se zralými buňkami periferní krve a kostní dřeně. Podpořeno grantem NR/9236-3 IGA MZ ČR.

## CLL 1

1571.

#### Zmnožení krátkých ramen chromosomu 2 je nová rekurentní změna prognostického významu u CLL

Jarošová Marie, Urbánková Helena, Holzerová Milena, Plachý Radek, Papajík Tomáš, Balcárková Jana, Kučerová Ludmila, Pikalová Zuzana, Indrák Karel (HOK FN a LF UP, Olomouc; Ústav patologie FN a LF UP, Olomouc)

Chronická lymfatická leukemie (CLL) je geneticky i klinicky heterogenní onemocnění. Rutinní cytogenetické a FISH vyšetření dovoluje odlišit podskupiny nemocných s nepříznivou prognosou, jako jsou nemocní s delecí na chromosomech 11q a 17p, zahrnující geny ATM a TP53. K určení dalších prognosticky významných změn je možné použít další metody molekulární biologie. Pro odhalení nových genetických změn jsme použili metody Multiplex Ligation Probe Amplification (MLPA), CGH a arrayCGH. Metodou MLPA bylo vyšetřeno 95 nemocných s CLL. Genetické změny byly nalezeny u 76 (80%) nemocných. U 7 (7,3%) nemocných bylo nalezeno zmnožení NMYC genu. Celkem 5 nemocných s touto změnou zemřelo s mediánem OS 56 měsíců. Vzhledem k nepříznivé prognóze těchto nemocných jsme se rozhodli provést retrospektivní studii s cílem určit a charakterizovat tuto změnu detailněji pomocí metod CGH a arrayCGH. Metodou CGH bylo analyzováno dalších 95 nemocných a metodou arrayCGH 38 nemocných. V sestavě 133 nemocných jsme zmnožení oblasti chromosomu 2p našli u 9 nemocných. V této práci budeme analyzovat výsledky 16 nemocných s novou, rekurentní změnou chromosomu 2p. Soubor 16 nemocných tvořilo 15 mužů a jedna žena, medián věku byl 59 let (34-70). Jeden nemocný byl v klinickém stádiu Binet A, 8 ve stádiu B a 7 ve stádiu C. Nemutovaný stav IGVH genu byl potvrzen u 14 nemocných, dva nemocní byli mutovaní, z nich jeden v subgenu VH3-21. Celkem 5 nemocných mělo zmnožení 2p již v době diagnózy, 11 nemocných bylo vyšetřeno v průběhu onemocnění. Zmnožení chromosomu 2p nebylo u žádného nemocného jedinou genetickou změnou. Nejčastější rekurentní genetické změny spojené se zmnožením 2p byly: delecce 6q (n=2), 11q (n=9), 13q (n=13) a 17p(n=2). Metoda CGH a arrayCGH určila minimálně zmnoženou oblast, v níž byly metodou FISH potvrzeny duplikace i triplikace genů REL, NMYC a ALK a odhaleno zahrnutí zmnožené oblasti 2p do různých chromosomových změn. Novou rekurentní aberací, dosud u CLL nepopsanou, byl dicentrický chromosom dic(2;18),

nalezený u 4/16 vyšetřených nemocných. Naše výsledky charakterizují novou rekurentní změnu, zmnožení 2p, která se vyskytuje jak v diagnóze, tak v průběhu onemocnění, je spojena s nemutovaným stavem IGVH a nepříznivou prognosou nemocných. Vzhledem k četnosti jejího výskytu, která je shodná s četností delece TP53, navrhuje zahrnutí scríningu této oblasti do rutinního FISH vyšetření u CLL. Práce je podporována granty IGA 9484 a MSMT 6198959205.

**1485.**

**Charakterizace delece 22q11 u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií**

Malinová Karla, Tichý Boris, Malčíková Jitka, Staňo Kozubík, Mráz Marek, Doubek Michael, Mayer Jiří, Pospíšilová Šárka (*Centrum molekulární biologie a genové terapie, IHOK FN a LF MU, Brno; IHOK FN a LF MU, Brno*)

Přítomnost genomických aberací je u chronické lymfocytární leukémie (CLL) významným prognostickým faktorem. Mezi nejvýznamnější patří delece 13q14, 17p13, 11q22 a trizomie 12, které se vyskytují v 80 % případů. Kromě čtyř zmíněných abnormalit obsahuje genom pacientů často další změny, k jejichž studiu jsme využili genomickou komparativní hybridizaci na čipu (arrayCGH). Zaměřili jsme se na hledání dosud nepopsaných či málo prostudovaných aberací CLL genomu s možným prognostickým významem. Do studie bylo zařazeno 40 pacientů, u kterých byly dostupné výsledky molekulárních prognostických markerů a cytogenetická data (FISH a CpG/IL-2 indukovaná metafázní cytogenetika). Do souboru byli zařazeni pacienti, kteří nesli alespoň jednu genomickou aberaci. Byly shromážděny vzorky periferní krve pacientů, DNA izolovaná z lymfocytů byla hybridizována na Human Genome CGH Microarray 4x44K (Agilent) a srovnána s komerčně dostupnou DNA referencí. Detekce klonálních rekombinací v imunoglobulinech podle BIOMED-2 protokolu a sekvenování posloužily pro podrobnou analýzu delece v oblasti 22q11. V 87,5% (35/40) případů byly nalezeny kromě aberací potvrzených cytogenetickými metodami další aberace s náhodným výskytem. V 7 případech (17,5%) jsme pozorovali rekurentní deleci 22q11, jejíž možný prognostický význam byl popsán autory Gunn et al. (2008), přičemž u dvou pacientů byla delece bilaterální. 22q11 kóduje subgeny lehkého imunoglobulinového řetězce lambda (IgL), ale také další geny - VPB1, PRAME, ZNF280A, ZNF280B, miR-650 a další, lokalizované mezi IgL subgeny. Gunn et al. stanovili rozsah minimální deletované oblasti 22q11 na 0,34 Mb, gen PRAME byl označen za potenciálně významný pro prognózu CLL. Detekce klonálních imunoglobulinových přestaveb pomocí PCR a sekvenování umožnilo přesnější stanovení rozsahu delece a ukázalo, že rozsah delece odpovídá přestavbě variabilní části IgL. Touto metodou jsme dále potvrdili, že dalších 6 pacientů má přestavbu IgL, a tedy menší deleci, než bylo publikováno. Dohromady mělo 30 % pacientů (13/40)

přestavbu IgL. Delece genů ležících v oblasti 22q11 závisí na využitím IgL subgeny. U 50% pacientů z této skupiny byl deletován PRAME, u 92% byl deletován gen pro microRNA miR-650. Na základě našich výsledků předpokládáme fyziologický původ delece 22q11 pocházející z IgL přestavby. Přesto prognostický význam delece PRAME či miR-650 není vyloučen a vyžaduje další studium. Podporováno z IGA MZ ČR NR9293-3/2007, MSMT LC06027 a MSM0021622430.

**1554.**

**Charakterizace exprese microRNA u CLL pacientů s delecemi 17p13 a 22q11**

Mráz Marek, Malinová Karla, Tichý Boris, Staňo Kozubík Kateřina, Mayer Jiří, Pospíšilová Šárka (*Interní hematologická klinika FN Brno a Lékařská fakulta MU, Brno*)

MicroRNA (miRNA) molekuly mají zásadní funkce v buněčné diferenciaci, proliferaci a apoptóze. Potvrzením významu miRNA u CLL bylo zjištění o lokalizaci miR-15a-16-1 v deletované oblasti 13q14. Exprese miRNA byla asociována i s dalšími známými prognostickými markery (ZAP70±, status IgVH). V naší práci jsme se zaměřili na charakterizaci exprese miRNA u agresivního subtypu CLL s delecí 17p13/mutací genu p53. Dále jsme studovali charakter delece v lokusu 22q11 nedávno popsán u části CLL pacientů, kde se kromě subgenů pro lambda lehký řetězec Ig nachází i několik protein kódujících genů a miR-650. Exprese miRNA byla stanovena pomocí micro-array (LNA sondy pro 470 miRNA) a RT-PCR (ABI TagMan miRNA Assays, 35 vybraných miRNA). Pro zjištění rozsahu delece 22q11 byl použit Agilent Human Genome CGH Microarray 4x44K (n=40) a pro přesnou charakterizaci VJC přestaveb IgL bylo provedeno jejich sekvenování. Pomocí micro-array bylo identifikováno 14 miRNA se sníženou expresí u pacientů s delecí/mutací p53 (del/mut TP53 n=6, wt TP53 n=5). Pomocí qRT-PCR byla zjištěna snížená exprese tří miRNA—miR-34a, miR-29c a miR-17-5p—u pacientů s p53 abnormalitou (del/mut TP53 n=12, wt TP53 n=18). Tyto miRNA regulují proteiny často studované v souvislosti s patogenezi CLL. miR-34a reguluje expresi Bcl2 proteinu a miR-29c reguluje proto-onkogeny Tc11 a Mcl1, jejichž abnormální exprese je známa z myších modelů vzniku CLL. miR-17-5p je regulována c-myc (klastr miR-17-92) a řídí expresi E2F1, p21, cyklinu D1. miR-650 byla deletována u 92% pacientů s přestavbou VJC v oblasti 22q11, ale její exprese byla velmi nízká ve všech vzorcích bez ohledu na přítomnost této přestavby. Potenciálním vysvětlením nízké exprese u pacientů bez přestavby lambda řetězce na 22q11 je alelická exkluze na tomto lokusu při použití kappa lehkého řetězce Ig (2p12). Výjimkou z tohoto pozorování byl pacient, jehož přestavba lambda VJC segmentů nevedla k delecí miR-650, přičemž exprese této miRNA zde byla ~100 násobně vyšší ve srovnání s ostatními pacienty (n=15). Předpokládanými cíli této miRNA jsou například MDM2, VPB3 (Pre-B lymfocyte protein3), NFkB, MAP2K2,

FGFR2, RAR $\alpha$ , PARP3, PARP10, Caspase-3 precursor, BCL6B, což naznačuje potenciální velký význam miR-650 v patogenezi CLL a dalších onemocnění. MicroRNA znamenají novou úroveň regulace genové exprese a rozdíly v expresi miR-34a, miR-29c, miR-17-5p a miR-650 mohou mít významné v patogenezi/progresi subtypů CLL. IGAMZ ČR NR-9293-3/2007 a MŠMT MSM-0021622430.

1515.

**Cytogenetická metafázní analýza B-CLL buněk po imunostimulaci CpG oligonukleotidem a interleukinem 2**

Hrubá Martina, Dvořák Pavel, Harmáčková Ladislav, Pittrová Monika, Čechová Lucie, Šubrt Ivan (*ÚLG LF UK a FN, Plzeň*)

Překonání slabou spontánní mitotickou aktivitu buněk B-CLL a s tím související nízkou úspěšnost cytogenetického metafázního vyšetření lze při kultivaci in vitro jejich stimulací vhodnými mitogeny. Jednou z možných metod je nedávno publikovaná imunostimulace CpG oligonukleotidem DSP30 v kombinaci s interleukinem 2 (2006, 2007 Haferlach et al.). V cytogenetické laboratoři ÚLG LF UK a FN Plzeň je uvedena stimulace B-CLL buněk používána od začátku roku 2008 a dosud byla provedena u 88 vzorků B-CLL a rovněž vyzkoušena u 6 vzorků jiných B-NHL s infiltrační kostní dřeně (z toho 2 x MCL, 1x FCL). Převaha pacientů (66) byla vyšetřena před léčbou (53 při zachytu onemocnění, 13 bezprostředně před zahájením léčby) a dalších 28 pacientů v relapsu a/nebo progresi po léčbě. Úspěšná kultivace s dostatkem hodnotitelných mitóz (medián počtu hodnocených mitóz G pruhováním i metafázní FISH byl 15) se podařila u 91 % vzorků (86/94). Patologické změny karyotypu G pruhováním byly zachyceny u 66 % (57/86) úspěšně kultivovaných vzorků a u dalších 22 % (19/86) byla metafázní FISH detekována kryptická intersticiální delecce 13q14 jako samostatná změna karyotypu. Ve všech patologických karyotypech byly nalezeny nebalancované změny ve smyslu ztráty či zmnožení genetického materiálu. Oproti běžně prováděné interfázní FISH (delecce 13q14, delecce genů ATM, p53, trizomie 12, delecce 6q, popř. přestavby IGH) zevrubná metafázní analýza přinesla u 33,5 % (29/86) vzorků informace o dalších přítomných změnách karyotypu, u zbylých 54,5 % (47/86) pacientů pak podrobnosti o typu a mechanismu vzniku aberace (intersticiální, terminální delecce, nebalancovaná translokace, identifikace partnerského chromozómu u translokací apod.). Pro statistickou analýzu byl soubor rozdělen do dvou skupin – skupina A (pacienti před léčbou, n=59) a skupina B (pacienti s progresí po léčbě, n=27). Ve skupině B byly významně častěji nacházeny nebalancované translokace (B: 16/27, tj. 59 % oproti A: 15/59, tj. 26 %, P=0,004) a komplexní změny karyotypu (B: 13/27, tj. 48 % oproti A: 11/59, tj. 19 %, P=0,009). Intersticiální, příp. terminální delecce jako jediné změny karyotypu byly naopak nacházeny více ve skupině A (A: 27/59, tj. 46 % oproti B: 4/27, tj. 15 %, P=0,007). Pro-

grese choroby je tedy charakterizována vyšším výskytem nebalancovaných translokací a komplexních změn karyotypu; zda však přítomnost těchto změn již při zachytu predikuje blízkou progresi onemocnění, ukáže až sledování pacientů v delším období.

1549.

**Expres ZAP-70 u nemocných s chronickou lymfocytární leukémií se může významně měnit v čase**  
Smolej Lukáš, Vroblová Vladimíra, Hrudková Monika, Krejsek Jan, Malý Jaroslav (*II. interní klinika, OKH, FN a LF UK, Hradec Králové; Ústav klinické imunologie a alergologie, FN a LF UK, Hradec Králové*)

Úvod: Expres proteinu ZAP-70 patří mezi nejdiskutovanější prognostické faktory u chronické lymfocytární leukémie (CLL). Velmi málo dat je však k dispozici s ohledem na možnou změnu exprese ZAP-70 v čase (podobně jako bylo publikováno u CD38). Dosud převládá názor, že exprese ZAP-70 se v čase nemění. Z tohoto důvodu jsme se v naší pilotní studii zaměřili na opakované vyšetřování ZAP-70 a hodnocení ve vztahu k ostatním prognostickým faktorům. Nemocní a metodiky: V databázi nemocných s CLL vyšetřených na našem pracovišti v letech 2005-2009 jsme identifikovali 31 nemocných, u kterých byla exprese ZAP-70 vyšetřována alespoň dvakrát. Expres ZAP-70 byla stanovena průtokovou cytometrií s použitím monoklonální protilátky konjugované s fykoerytrinem (PE), klon 1E7.2 (Caltag, USA). Expres ZAP-70 byla hodnocena ve vztahu k izotypové kontrole a hodnota 20 % pozitivních buněk byla považována za pozitivní výsledek. Výsledky: Ke významné změně exprese ZAP-70 (definované jako překročení hranice 20 %, tedy změna do pozitivivity či negativity) došlo u 10 z 31 nemocných. Pět ze šesti nemocných, u kterých došlo k změně ZAP-70 z negativity do pozitivivity, měli nemutované IgVH geny; u těchto nemocných byla pozitivizace ZAP-70 zaznamenána při progresi onemocnění. Naproti tomu 3 ze 4 nemocných, kde došlo ke snížení ZAP-70 pod 20 %, měli IgVH geny mutované. Ani u jednoho z těchto nemocných nedošlo k progresi. Závěr: V naší pilotní studii jsme zjistili významnou změnu exprese ZAP-70 u třetiny vyšetřovaných nemocných. Zatímco změna z pozitivivity do negativity byla zaznamenána jen u klinicky stabilních nemocných, pozitivizace byla spojena s progresí onemocnění. Zajímavou se jeví souvislost pozitivizace ZAP-70 s nemutovanými IgVH geny, což by mohlo být v důsledku klonálního vývoje popisovaného u těchto nemocných. Jsou zapotřebí rozsáhlejší studie k dalšímu objasnění této problematiky, nicméně na základě našich výsledků se jeví jako vhodné znovu vyšetřit expresi ZAP-70 u původně ZAP-negativního nemocného v době progresu onemocnění. Podpořeno výzkumným záměrem MZO 00179906 Ministerstva zdravotnictví České republiky.



## MDS

1419.

**Stanovení expresních profilů u pacientů s myelodysplastickým syndromem pomocí celogenomových čipů**Vašíková Alžběta, Belíčková Monika, Budínská Eva, Čermák Jaroslav (*ÚHKT, Praha; Institut biostatistiky a analýz, Brno*)

Myelodysplastický syndrom (MDS) je klonální onemocnění kmenové buňky charakterizované neefektivní hematopoézou, cytopenií v periferní krvi a zvýšeným rizikem transformace v akutní myeloidní leukemii (AML). Molekulární pozadí MDS není stále objasněno, i když bylo vysloveno několik různých teorií. Jedna z nich klade důraz na abnormální apoptózu jako jeden z hlavních mechanismů patogeneze MDS. Jiná teorie počítá s genetikými či epigenetickými změnami na úrovni transkripčních faktorů, regulátorů transkripce či DNA opravných mechanismů. Naše studie se zaměřila na stanovení diferenciální genové exprese mezi 51 pacienty s MDS či AML s MLD vzniklé z MDS a 7 kontrolami pomocí celogenomových expresních mikročipů firmy Illumina. Dalším cílem bylo identifikovat geny specificky exprimované v jednotlivých subtypech MDS dle WHO klasifikace. Jako výchozí materiál jsme použili frakci CD34+ progenitorových buněk, z nichž byla izolována celková RNA, která byla dále převedena na cRNA, značena a hybridizována na mikročipy. Srovnání expresních profilů pacientů a kontrol definovalo 825 statisticky signifikantních genů. V rámci těchto genu jsme funkční anotací identifikovali několik deregulovaných buněčných procesů: buněčná diferenciace, regulace genové exprese, odpověď na stres, apoptóza a její regulace pro geny se sníženou expresí u pacientů. Nižší hladiny transkriptů byly pozorovány též pro geny podílejících se myeloidní diferenciací a zrání B-buněk, což může signalizovat poruchu vývoje jak myeloidní, tak lymfoidní řady. Naopak geny s vyššími hladinami transkriptů byly zapojeny do genové exprese, metabolismu proteinů či indukce apoptózy. Analýza diferenciální genové exprese mezi jednotlivými subtypech MDS poskytla soubor 246 významných genů. Pomocí hierarchického shlukování byli pacienti rozděleni do 2 základních shluků: 1) časných form MDS spolu s pacienty s RAEB-1 a 2) pacienty s RAEB-2 a AML s MLD. Výrazné zvýšení exprese u časných MDS bylo pozorováno pro geny zapojené do buněčného dělení a oprav DNA, zatímco jejich exprese byla snížena u pacientů s RAEB-2 a AML s MLD. Opačný expresní vzorec byl nalezen pro geny, které se účastní přenosu signálu (MERTK aj.) či regulace genové exprese (BMI-1). Naše výsledky ukazují na řadu deregulovaných biologických procesů, které mohou být zapojeny do patogeneze MDS. Dále jsme detekovali geny s odlišnou expresí u časných a pozdních forem MDS, u nichž lze předpokládat účast při leukemické transformaci MDS. Podpořeno grantem IGA NR9235.

1504.

**Příspěvek k diagnostickému významu a patogeneze dysplastické megakaryopoézy a zvýšené tvorby destiček u MDS s delecí dlouhého ramene 5. chromosomu (del5q)**Neuwirtová Radana, Bruchová Hana, Jonášová Anna, Čermák Jaroslav, Vondráková Jana, Šišková Magda, Hochová Ivana, Jungová Alexandra, Bělohávková Petra, Kadlčková Eva, Černá Olga, Libiger Petr, Polonyová Eva, Seifertová Naděžda, Kyra Michalová, Mikulenkova Dana (*VFN, Praha; ÚHKT, Praha; HOK FN, Olomouc; FN Motol, Praha; FN, Plzeň; FN, Hradec Králové; Nemocnice, Zlín; Nemocnice, Ústí n. L.; Nemocnice, Karlovy Vary; Nemocnice, České Budějovice*)

Úvod: Makrocytární anemie, ve většině případů normální nebo vyšší počet destiček a ve dřeni typické dyspl. megakaryocyty (MGC) je typický nález pro MDS pacienty (pac) s del5q, ať už jde o 5q-syndrom (5q-sy) nebo o pac, kteří nesplňují všechny znaky 5q-sy. Pokoušíme se odpovědět na otázky, zda jsou dyspl. MGC specifické pro del5q a které faktory, lokalizované na úseku 5q31-33, resp. jejich chybění vede ke změnám megakaryopoézy? Výsledky a diskuse: Rozdělili jsme 72 pac s del5q do 4 skupin: pac s 5q-sy a normálním počtem destiček-A nebo s trombocytemií-B. Pac splňující jen některé znaky 5q-sy byli zařazeni do skupiny C. Ve skupině D měli nemocní ještě další chromosomální aberace. Ve dřeních nemocných s 5q-sy nacházíme typické dyspl. MGC s 1 nebo 2 kulatými jádry a granulovanou růžovo-fialovou plasmou bez patrné tvorby destiček. Ve skupině A a B jsme nacházeli průměrně 60% těchto MGC, ve skupině C 24%. Ve skupině D bylo těchto MGC nejvíce 75%. V kontrolní skupině 30 MDS pac beze změn 5. chromosomu jsme tyto MGC nenacházeli vůbec nebo v méně než 10%. Zdá se tedy, že tato forma MGC je vysoce specifická pro del5q. Diamond-Blackfan anemie (DBA) je ve své patogeneze příbuzná s 5q-sy. Nejnověji příčina anemie u obou chorob souvisí s defektem genů pro ribosomální proteiny. U DBA však nejsou přítomny dyspl. MGC. Příčinu dyspl. megakaryopoézy a efektivní tvorby destiček je nutno hledat v jiném defektu než v aberantní ribosomální biogenezi. Přistoupili jsme proto k vyšetření jiných faktorů, lokalizovaných na úseku 5q31-33, jejichž chybění by mohlo být příčinou dyspl. megakaryopoézy. Mohlo by jít o mikroRNA 145 a 146 protože u null myši bez uvedených mikroRNA Starczynowski a spol. našli typické dyspl. MGC a trombocytemii. MikroRNA jsme vyšetřovali v destičkách u pac s del5q, v malé skupině pac s RARS s trombocytemií a v kontrolní skupině pac s MDS s normálním 5. chromosomem. Vyšetření těchto mikroRNA probíhá. Závěr: Nález dyspl. MGC je vysoce specifický pro MDS s izolovanou del5q i pro případy se současnými jinými chromosomálními aberacemi. Předběžné výsledky nevyklučují význam chybění mikroRNA pro dysplast. megakaryopoézu i u del5q.

1418.

**Studie PAILETTE - incidence přetížení železem u polytransfundovaných nemocných v ČR**

Čermák Jaroslav, Nováková Ludmila, Jonášová Anna (ÚHK, Praha; 1. interní klinika VFN, Praha; Česká MDS kooperativní skupina)

V měsících září – listopad 2008 proběhla na hematologických pracovištích v České republice studie PAILETTE. Cílem studie byla retrospektivní analýza dat týkajících se chronicky transfundovaných nemocných, kteří jsou ohroženi nadbytkem železa v organismu. Studie se zúčastnilo 72 hematologů a byla získána data od 405 nemocných. Průměrný věk nemocných byl 60,7 let, přičemž více než 50% nemocných bylo starších 60 let. Nejčastější diagnózou u nemocných byl myelodysplastický syndrom (59% sledovaných nemocných), dále vrozené či získané anemie s nutností četných transfuzí (20%) a chronické myeloproliferace. Průměrný počet obdržovaných transfuzí činil 50,6 TU, přičemž 79,4 % nemocných obdrželo více než 20 TU erytrocytů, tedy množství při jehož dosažení se doporučuje započít s chelatační léčbou. Ve skutečnosti však byla chelatace zahájena jen u 27,9% nemocných. Průměrná hodnota ferritinu v séru byla 1845,3  $\alpha\text{g/l}$ , přičemž 41,6% nemocných mělo hladinu ferritinu > 2000  $\alpha\text{g/l}$ , 22,6% mělo hladinu > 3000  $\alpha\text{g/l}$  a 16,4% mělo hladinu > 5000  $\alpha\text{g/l}$ . Nejčastěji užívanými chelátory byl deferiprone (58,4%) a deferasirox (43,4%), deferioxamine byl podán jen menšině nemocných (11,5%). Chelatační léčba vedla při trvající zátěži transfuzemi k poklesu hladiny ferritinu v séru jen u necelé poloviny nemocných (46,5%), u třetiny nemocných (34,7%) byl naopak pozorován nárůst hodnoty ferritinu v séru i přes podávání chelatační léčby, vesměs šlo o nemocné transfundované po více než 2 roky, s vysokou iniciální hladinou ferritinu v séru a trvající výraznou závislostí na transfuzích. Při hodnocení všech nemocných nedošlo během chelatační léčby k významnější změně hodnoty ferritinu v séru (+ 70,3  $\alpha\text{g/l}$ ). Výsledky studie ukazují na poměrně vysokou incidenci stavů s přetížením železem, jejichž výskyt nebyl dosud systematicky sledován a na vysoké procento nemocných indikovaných k chelatační léčbě, jež je však dosud prováděna jen u menšiny nemocných a s nedostatečnou efektivitou. Studie byla provedena ve spolupráci s firmou NOVARTIS s.r.o. a statisticky zpracována firmou Cegedim Strategic Data.

1568.

**Zkušenosti České MDS skupiny s novým perorálním chelátorem Exjadem u polytransfundovaných nemocných**

Jonášová Anna, Čermák Jaroslav, Bělohávková Petra, Vondráková Jana, Nováková Ludmila, Walterová Lenka, Vozobulová Věra (1. interní klinika hematologie, 1. LF UK a VFN, Praha; ÚHK, Praha; hematologie FN, Hradec Králové; hematologie FN, Olomouc; Hematologie, Liberec; hematologie FN, Plzeň)

Úvod. Chelatační terapie je nedílnou součástí léčby nemocných s Myelodysplastickým syndromem (MDS) s nízkým rizikem dle IPSS, závislých na transfuzích s přetížením železem (Fe). V minulém roce byl u nás uveden nový chelátor deferasirox (Exjade). Jde o perorální chelátor s prodlouženým plazmatickým poločasem umožňujícím aplikaci 1x denně. Má vysokou afinitu k železu. Dle výsledků dosavadních studií se jeví jako účinný relativně dobře snášený preparát. Presentujeme zkušenosti České MDS skupiny s tímto lékem. Pacienti a výsledky. Celkem jsme získali data od 55 pts léčených Exjadem od ledna 2008 do března 2009. Jde o polytransfundované nemocné s MDS s nízkým rizikem (19 RCMD, 13 5q-, 2 RARS, 2 RA), dále 8 AA/PNH, 2 RAEB II, 2 MPD, 2 s vrozenými anemiemi a 3 s dalšími diagnosami. Medián věku je 66 let. Průměrně byli nemocní léčeni 6 měsíci (1-14). Medián trvání transfuzní závislosti byl 33 měsíců (3-552), medián celkového počtu TU 52 (6-624). 31 nemocných bylo léčeno jinými chelátory před zahájením Exjadu (23 Ferriproxem, 8 Desferalem). Data týkající se dávek a vedlejších účinků byla získána od 47 pts. Pouze 11 nemocných dosáhlo a bylo trvale léčeno  $\geq 30\text{mg/kg/den}$ , ostatní pouze  $\leq 20\text{mg/kg/den}$ . Hodnota ferritinu před terapií byla 2740  $\mu\text{g/l}$  (medián). Po (v průměru) 6 měsících terapie u celé skupiny došlo k poklesu ferritinu na 1704  $\mu\text{g/l}$  (o 1036  $\mu\text{g/l}$ ). U pts s dávkou  $\leq 20\text{mg/kg/den}$  byla změna před a po terapii pouze 371  $\mu\text{g/l}$ . U pts s dávkou  $\geq 30\text{mg/kg/den}$  došlo k poklesu o 1350, 4  $\mu\text{g/l}$ . U nemocných s předchozí chelatací (výchozí ferritin 3917  $\mu\text{g/l}$ ) došlo k poklesu o 1509  $\mu\text{g/l}$ . Vedlejší účinky se vyskytly u 22 pts (46%). Z toho pouze u 6 (12,8%) byly natolik závažné, že vedly k ukončení terapie. U 11 (23%) byla terapie přerušena či snížena dávka pro vedlejší účinky. Nejčastější byly gastrointestinální obtíže 14 (průjem, dyspepsie), 5 pts mělo zn. nefrotoxicity, 3 exantém a 1 otoky. Medián věku se závažnějšímu nežádoucími účinky byl vyšší 75 let. Závěr. I po zatím krátké době sledování (průměrná doba terapie 6 měsíců) se jeví Exjade jako velice účinný lék s únosnými nežádoucími účinky. Nejdůležitější z faktorů, které měly vliv na efekt terapie byla dostatečná terapeutická dávka (dle naší studie  $\geq 30\text{mg/kg/den}$ ). Efekt nebyl tak závislý na délce transfuzní závislosti, počtu podaných transfuzí, výchozí hladině ferritinu, diagnose a věku. Exjade byl účinný i u nemocných, kde předchozí chelatací nebylo dosaženo dostatečného efektu.

1476.

**Naše zkušenosti s léčbou nemocných s MDS hypometylačními látkami**

Čermák Jaroslav, Nováková Ludmila, Šponerová Dana, Maaloufová-Soukupová Jacqueline, Čaniga Miroslav, Marková Markéta, Válková Veronika, Ryšavá Jana (ÚHK, Praha)

Cílem studie bylo zhodnocení efektu podávání hypometylačních látek (azacytidine, decitabine) 15 nemocným

(8 mužů, 7 žen) s pokročilými stádii MDS (5 x RAEB >10% blastů, 4 x RAEB-T dle FAB) nebo akutní myeloidní leukémií (> 30% blastů dle FAB) vzniklou z MDS (6 nemocných). Azacytidine byl podáván 7 nemocným v dávce 75 mg/m<sup>2</sup> 7 dní, decitabine byl podáván 8 nemocným v dávce 20 mg/m<sup>2</sup> 5 dní či 45 mg/m<sup>2</sup> 3 dny. Průměrný věk nemocných byl 67,9 roku /60-78 let/, průměrný počet podaných cyklů činil 6,3 cyklu /1-23 cyklů/. Léčebný efekt hodnocený dosažením kompletní či parciální remise (CR, PR) či hematologického zlepšení (HI) byl dosažen u 60% nemocných (20%CR, 13%PR, 27%HI), přičemž průměrný počet cyklů nutných k dosažení maximálního léčebného efektu byl 3,3 cyklu. Průměrná doba přežití činila 9,6 měsíce (9 nemocných žije, z toho 8 v léčbě), pravděpodobnost přežití 1 rok a 3 roky byla 40%, resp. 13% (přežití bez známek choroby 1 rok - 15%). Pravidelným vedlejším účinkem léčby byla trombocytopenie (PLT < 30x10<sup>9</sup>/l u 93% nemocných) a granulocytopenie (NS < 0,5x10<sup>9</sup>/l u 87% nemocných), krvácivé projevy se vyskytly u 40% nemocných, febrilní neutropenie byla přítomna u 13% nemocných, dokumentovaná infekce se vyskytla u 9 nemocných (60%), z toho ve 4 případech (27%) byl její průběh závažný až život ohrožující s nutností hospitalizace. Podávání hypometylačních látek představuje jednoznačný terapeutický přínos pro nemocné s pokročilými formami MDS, kteří nejsou indikováni k intenzivní chemoterapii a k transplantaci krvetvorných buněk, pravděpodobnost přežití 3 roky byla u těchto nemocných vyšší než u obdobné skupiny nemocných léčených pouze kombinovanou chemoterapií (4%) či nízkými dávkami cytosin arabinosidu (11%). Nicméně i tento typ léčby je spojen s řadou často závažných vedlejších účinků a vyžaduje intenzivní monitoraci nemocných v hematologickém centru.

## EDUKAČNÍ BLOK / EDUCATION

### Developments in haematopoietic stem cell transplantation

Linch David (*London-UK*)

### The classification of large B cell lymphoma

Delabie Jan (*Oslo-Norway*)

### Novel discoveries of genetic subtypes of childhood acute lymphoblastic leukemia - clinical significance

Izraeli Shai (*Tel Aviv-Israel*)

1495.

### WHO classification 2008 of myeloproliferative neoplasms: the changes in the nomenclature and diagnostic approaches

Marcinek Juraj, Lukáš Plank, Peter Szépe (*Department of Pathology and National Consultation Centre of Hematopathology, Comenius University, Jessenius Faculty of Medicine and Faculty Hospital in Martin, Slovakia*)

The WHO classification of myeloid neoplasms published in 2008 (WHO-2008) is based on clinically verified and accepted criteria of WHO classification 2001. It relies on tumor cell morphology evaluated in bone marrow (BM) biopsy and/or aspirate or in peripheral blood (PB) smears in correlation with clinical and laboratory (incl. genetic) data. The nomenclature „myeloproliferative disorders“ has been replaced by „myeloproliferative neoplasms“ to accent their malignant potential and the genetic approach has been introduced into MPN diagnostics. The myeloid neoplasms with eosinophilia and platelet derived- or fibroblast growth factor receptor mutation are distinguished from chronic eosinophilic leukaemia. The neoplastic mast cells proliferations (mastocytoses) are included in the MPN category, however without change of their subclassification. In the CML category the only change involves the need to reevaluate criteria of accelerated phase. The most important innovation is the implementation of specific Janus 2 tyrosine kinas mutation (JAK2V617F) into the diagnostic criteria of chronic Ph1- MPN. Presence of this mutation or of activating JAK2 exon 12 mutations represents a typical finding in polycythemia vera (PV) patients, what together with typical clinical and laboratory data leads to PV diagnosis even in the absence of BM biopsy. WHO-2008 refers to initial stages of PV with borderline increase of hemoglobin and/or thrombocytosis in PB (clinically resembling essential thrombocythemia /ET/) and emphasizes the PV progress from initial to polycythemic phase with polycythemia and final transformation to terminal „spent phase“ with distinct BM fibrosis and pancytopenia. Further nomenclature change involves chronic idiopathic myelofibrosis which has been changed to „primary myelofibrosis“ (PMF). The key role in the PMF diagnosis is represented by BM biopsy (characteristic BM morphology) as well as by demonstration of the clonality of the disease (JAK2V617F or thrombopoietin receptor mutations). WHO-2008 clearly defines the prefibrotic and fibrotic stages of PMF with significantly different patients survival rates. For ET diagnosis the arbitrary level of PB thrombocytes was lowered from previous 600 to 450x10<sup>9</sup>/L. In contrast to previous classification requiring ET diagnosis per exclusion of other MPN, WHO-2008 introduces the positive diagnostic ET criteria (JAK2V617F or characteristic BM morphology). Supported by Comenius University in Bratislava Grant 67/2009.

## WIEDERMANNOVA PŘEDNÁŠKA / WIEDERMANN LECTURE

### Recent advances in classification of acute myeloid leukemia and therapeutic implications

Clara Bloomfield (*Columbus-Ohio, USA*)



## ITP – EDUKACE

1595.

**Epidemiologie a diagnostika ITP**Červinek Libor, Mayer Jiří (*IHOK FN, Brno*)

Úvod. Roční incidence ITP dospělých je ve světě přibližně 5,8 - 6,6 případů na 100 000 osob, incidence u dětí je cca 4 - 5 případů na 100 000 osob. Přesná incidence ITP v České republice nebyla dosud známa. Diagnostika a léčba ITP se historicky opírá především o doporučení odborných společností či expertů a není z mnoha důvodů plně standardizovaná. Abychom zjistili, jaká je incidence a prevalence ITP a jak je tato nemoc na různých pracovištích léčena, naplánovali jsme dotazníkovou studii týkající se ITP u dospělých v Jihomoravském kraji. V našem dotazníku jsme se zaměřili na získání dat ohledně prevalence ITP, a zároveň jsme zjišťovali diagnostické a léčebné preference lékařů. Metody. Dotazníky jsme rozeslali na všechna hematologická pracoviště v regionu Jihomoravského kraje, který měl při posledním sčítání lidu 1127718 obyvatel. Všichni hematologové dotazníky vyplnili. Výsledky. K datu analýzy bylo v Jihomoravském kraji dispenzarizováno 564 dospělých nemocných s ITP, (406 pacientů s chronickou ITP, 68 nově diagnostikovaných pacientů/rok, 69 pacientů s chronickou rezistentní formou ITP, 18 pacientů s Evansovým syndromem). Podle toho čísla je tedy prevalence nemoci u lidí starších 18 let 50,3 případů na 100 000 obyvatel. Námi zjištěná incidence činí 6 případů na 100 000 obyvatel nad 18 let, což odpovídá celosvětovým údajům. V naší studii jsme nezaznamenali úmrtí na krvácivé projevy způsobené ITP. Získaná data ukazují, že diagnostika ITP v našem regionu stojí především na vyloučení jiných hematologických onemocnění, diagnostiku per exculsionem uvedlo 88% lékařů, 47% lékařů paušálně vyšetřuje kostní dřev, vyšetření přežívání destiček před plánovanou splenektomií indikuje 53% lékařů. Standardními pilíře léčby ITP jsou kortikoidy a splenektomie, u těhotných aplikace IVIG. V léčbě chronické ITP jsme zaznamenali především významné zastoupení cyklosporinu A (35%) a překvapivě i cyklofosfamidu (29%). Naopak použití danazolu, rituximabu či mykofenolátu mofetilu bylo omezeno jen na jedno ústřední hematologické centrum v kraji. Závěr. Získaná epidemiologická data o ITP potvrzují celosvětové údaje. Diagnostické a terapeutické postupy lékařů hematologických ambulancí v našem regionu odráží značnou nejednotnost diagnostiky a léčby především u pacientů s chronickou formou ITP, což je ale dáno i poměrnou benigností onemocnění.

1594.

**Patofyziologie imunní trombocytopenické purpury**Čermák Jaroslav (*Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha*)

Za základní patogenetický moment v rozvoji imunní trombocytopenické purpury (ITP) je považována porucha

některého z mechanismu uplatňujících se v navození procesu autotolerance. Velmi častým mechanismem je působení noxy jako antigenního podnětu či jako tzv. ko-stimulační molekuly zprostředkující vazbu antigenu na povrch destičky, následně dochází k aktivaci trombocytu a předání antigenu pomocí antigen prezentující buňky lymfocytům s následnou tvorbou protilátek proti některým destičkovým antigenům (např. GPIIIa či GP IbIX). Takto se předpokládá vznik ITP např. v souvislosti s virovými infekty či při infekci *Helicobacter pylori*. Samozřejmě, že důležitou roli v celém procesu hraje počet a funkce T lymfocytů uplatňujících se v procesu imunní odpovědi, zejména poměr mezi Th1 a Th2 lymfocyty či absolutní pokles periferních Th2 lymfocytů nebo snížení počtu či alterace funkce CD4+CD25+Foxp3+ lymfocytů hrajících roli v procesu imunní suprese. Dalším mechanismem je porucha tzv. centrální tolerance, kdy dochází k poruše apoptozy T a B lymfocytů při mutacích postihujících geny pro tvorbu Fas a Fas ligand (Fas-L). Zvýšená exprese Fas ligand T lymfocytů může vést k aktivaci systému kaspáz po jeho vazbě na Fas receptor B lymfocytů a k jejich vystupňované apoptoze, naopak deficit Fas či Fas-L může vést k lymfoproliferaci s projevy autoimunity. Přesný mechanismus vzájemných vztahů mezi aktivací či útlumem procesu apoptozy lymfocytů a stimulací tvorby protilátek však není znám obdobně jako u chronické lymfatické leukémie, kde bývá u nemocných se současně probíhající ITP pozorována vysoká frekvence nemutovaných IgVH genů. Nicméně, jednoznačný průkaz toho, že by maligní klon byl u nemocných s CLL zodpovědný za produkci protilátek, zatím podán nebyl. V neposlední řadě byly u nemocných s ITP popsána i aktivace některých cytotoxických genů (granzyme A, granzyme B, perforin) v subpopulaci T lymfocytů a současně i zvýšená produkce některých cytokinů, jež se mohou uplatňovat v cytotoxickém účinku na destičky (INF $\alpha$ ) a defektní exprese tzv. killer cell imunoglobulin like receptoru (KIR) na povrchu CD3+ T lymfocytů, jež antagonizuje odpověď cytotoxických T lymfocytů a NK buněk. Uvedené nálezy ukazují na komplexní patogenezu ITP, jež zahrnuje řadu faktorů a jež je velmi pravděpodobně odlišná u primární ITP a různých forem sekundární ITP provázející jiná onemocnění.

1579.

**AITP/ITP – Autoimunitná (idiopatická) trombocytopenia**Lipšic Tomáš (*HTO, Klinika laboratórnej medicíny - OÚSA, LFUK, VŠZaSP, Bratislava*)

Autoimunita je prítomná v určitom rozsahu v každom zdravom organizme ale tieto "zakázané" aktivity sú kontrolované systémom tolerancie. Autoimunitné ochorenie je definované progresiou benígnej autoimunity do patologickej. AITP je ochorenie spôsobené poruchou imunity. Ide o dva druhy mechanizmov - poškodenie produkcie a zvýšenie deštrukcie trombocytov (Tr), ktoré sa individuálne kombinujú. Deštrukcia je primárne spôsobená protilátka-

mi mediovanou fagocytózou Tr makrofágmi v slezine a je stále viac dôkazov že na deštrukcii sa podieľa aj celulárna zložka prostredníctvom T-Ly mediovaného mechanizmu. Bunkové sekvencie spôsobujúce syntézu anti-Tr protilátok a anti-Tr T-Ly nie sú úplne známe, je ale dokázané že sa na nich podieľajú T-helper a T-regulačné bunky. Patofyziológia AITP je kombináciou pôsobenia B a T-buniek na celú vývojovú líniu Tr s výsledným znížením produkcie, zvýšením deštrukcie a následnou trombocytopéniou. Kombinácie humorálnej a celulárnej zložky, miest ich pôsobenia a intenzity, sú rôzne medzi jedincami aj v čase, v závislosti na stave imunitného ale aj iných systémov. Počínajúc definovaním ITP až do súčasnosti je diagnóza AITP stanovovaná "per exclusionem" - prítomnosťou znakov niektorých a neprítomnosťou znakov iných porúch spôsobujúcich trombocytopéniu. V priebehu času sa počet diagnostických nástrojov zvyšoval, žiaľ nie dostatočne vo zmysle špecificity, citlivosti a dostupnosti. Preto sa presadzovala tendencia redukcie diagnostických postupov a kritérií pre AITP, zdá sa ale, že dochádza k návratu od diagnostického simplicizmu k viac komplexným diagnostickým schémam. Priebeh AITP je variabilný, preto jediný univerzálny liečebný prístup nie je možný. Prvá línia terapie sú kortikoidy a imunoglobulíny. Druhou líniou sú vysokodávkované kortikoidy a imunglobulíny, pre menej urgentné stavy imunosupresíva. Splenektómia (SE) je vetvou v druhej línii terapie. Imunosupresívna terapia s anti-CD20 je nádejná, menovite ako alternatíva odloženia, obdienia SE, ale dlhodobé pozitívne aj negatívne účinky nie sú známe. Väčšina liečebných postupov druhej línie nie je dostatočne testovaná a overená. Terapia rastovými faktormi - mimetikami Trombopoetínu je nádejná a preukázala želatelný efekt, ale jej miesto v schéme liečenia nie je ešte jasne určené. Indikácia liečby je závislá na počte Tr, symptómoch a na pridružených ochoreniach. Stále pretrvávajú potreba viac cielených diagnostických a liečebných postupov.

## 1592.

### AMG 531 v liečbe ITP

Kozák Tomáš (OKH, FN Královské Vinohrady a 3. LF Univerzity Karlovy, Praha)

Romiplostim je proteín o molekulárnej hmotnosti 60 kDa, ktorý sa väže k receptoru pro trombopoetin (TPO) Mpl, ale nemá žiadnu štruktúrnu podobnosť s endogénnym TPO. Výsledky klinických štúdií fáze I s romiplostimom u pacientů s chronickou refrakternou ITP byly publikovány v roce 2006. V prvni z nich byl romiplostim podáván subkutánně v g/kg. Dobádávkách vázaných na kilogram váhy pacienta: 0.2 - 10 sledování po aplikaci byla 78 dní. Cílového počtu destiček bylo g/kg.dosaženo u 4 z 12 pacientů, kteří byli léčeni dávkami 3, 6 a 10. Odpověď trombocytů byla závislá na dávce. Ve studii fáze II, dvojitě zaslepené, placebem kontrolované, byli pacienti s chronickou ITP (67% pacientů po splenektomii) randomizováni k léčbě romiplostimem v g/kg nebo do ramene

s placebem. Cílový počet hladinách 1, 3 a 6 g/kg a u 5 z osmi destiček byl dosažen u 7 z osmi pacientů v hladině 1 g/kg. V roce 2008 byly publikovány výsledky dvou pacientů v hladině 3 paralelně probíhajících randomizovaných studií fáze III. Bylo zařazeno 125 pacientů s chronickou ITP (63 po splenektomii, 62 bez předchozí splenektomie), randomizace vůči placebu byla prováděna v poměru 2:1, romiplostim byl podáván jednou týdně s.c. po dobu 24 týdnů, počáteční g/kg s.c. Dlouhodobé odpovědi dosáhlo 38% pacientů dávka byla 1 léčených romiplostimem vůči 0% pacientů s placebem ve skupině splenektomovaných (p=0.0013). Celková odpověď byla ve studii se splenektomovanými 79% a ve skupině bez splenektomie 88%. Nejčastějším vedlejším účinkem byla v obou studiích cefalea a únava. U jednoho pacienta, po splenektomii, který na léčbu romiplostimem neodpověděl, byla zaznamenána zvýšená přechodná přítomnost retikulínu v kostní dřeni. Výše uvedené studie mají pokračování v otevřené studii, do níž měli možnost vstoupit všichni pacienti z posledně uvedených randomizovaných studií. Celkem bylo zahrnuto 137 pacientů, 112 z nich (82%) na léčbu odpovědělo. Třicet pacientů vstoupilo do studie se současnou jinou terapií ITP, u 13 z nich bylo možno tuto léčbu vysadit, u 6 dalších byla dávka konvenční léčby zredukována o více než 25%. Závěr: Romiplostim je trombopoetinu stimulující látka, která má příznivý toxický profil a která prokázala svůj efekt v léčbě chronické ITP již ve dvou randomizovaných studiích.

## 1593.

### Imunitní trombocytopenická purpura u dětí: epidemiologie, diagnostika, klinický obraz a léčba

Pospíšilová Dagmar (Dětská klinika LF UP a Fakultní nemocnice, Olomouc)

Imunitní trombocytopenická purpura (ITP) je nejčastějším typem trombocytopenie v dětském věku. Její incidence je 4-8/100000 dětí/rok. Jde většinou o onemocnění s dobrou prognózou, které trvá týdny až měsíce a odezní bez následků. U části dětí však může být přítomno závažné krvácení. Nejobávanejší komplikací je krvácení do CNS. Asi u 15-20% dětí se vyvíjí chronická trombocytopenie různé závažnosti. Maximum výskytu ITP je popisováno ve věkové skupině dětí mezi 2-8 lety. 80% pacientů v anamnéze uvádí většinou lehce probíhající infekci horních dýchacích cest v období 2-6 týdnů před manifestací trombocytopenie. Vznik ITP je popisován i v souvislosti s očkováním živými vakcínami. U části pacientů se může ITP manifestovat v přímé souvislosti s virovou infekcí jako jsou zarděnky, varicella, infekční mononukleóza, infekce parvovirem B19 nebo HIV. Pro dětský věk je typická akutní forma ITP, která je charakterizována většinou velmi rychlým nástupem krvácivých projevů, U dítěte se s odstupem 2-4 týdnů po lehce probíhající infekci horních dýchacích cest začne objevovat krvácení do kůže a sliznic dutiny ústní ve formě hematomů, petechií a sufuzí. Vzácněji se může objevit epistaxe, krvácení do

spojivky, hematemaza, meléna, hematurie nebo menoragie. Krvácení do CNS je popisováno u 0,2-0,9% nemocných. O chronické formě ITP hovoříme tehdy, pokud onemocnění trvá déle než 6 měsíců. U dětí se chronická forma onemocnění rozvíjí v 10-15% případů. Větší sklon k rozvoji ITP mají děti mladší 2 let a starší 10 let, u kterých je popisována i horší odpověď na léčbu. Jednoznačná predikce přechodu do chronické formy však není jednoznačně možná. Může se objevit i období různě dlouho trvajících remisí s následnými exacerbacemi. Jde o typický model chronického autoimunního onemocnění, jehož léčba je velmi problematická. Při vyšetření krevního obrazu nacházíme u ITP izolované snížení počtu trombocytů, může být přítomna relativní nebo absolutní lymfocytóza nebo eozinofilie. Pokles počtu trombocytů je většinou výrazný, u 70-60% dětí až k hodnotám pod  $20 \times 10^9/l$ , často i pod  $10 \times 10^9/l$ . Při dalších patologických nálezích v krevním obrazu (anémie, leukocytóza, leukopenie, známky hemolýzy, změny morfologie krevních elementů) je nutno pátrat po jiné příčině trombocytopenie.

### LYMPHOID MALIGNANCIES (2<sup>ND</sup> SYMPOSIUM ON ADVANCES IN MOLECULAR HEMATOLOGY)

1572.

#### Genetics of Malt Lymphomas

Wlodarska Iwona (Center for Human Genetics, Catholic University, Leuven – Belgium)

Mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma is a low grade B cell neoplasm which commonly develops from a background of chronic inflammatory or auto-immune disorder. Approximately 25% of MALT lymphoma cases is hallmarked by characteristic and mutually exclusive chromosomal translocations including,  $t(11;18)(q21;q21)/API2-MALT1$ ,  $t(1;14)(p22;q32)/IGH-BCL10$ ,  $t(14;18)(q32;q21)/IGH-MALT1$  and  $t(3;14)(p14;q32)/IGH-FOXP1$ . The oncogenic products of the first three translocations target the NFkB pathway which plays an important role in cell survival and proliferation. Recently, we identified a novel IGH-involving  $t(X;14)(p11;q32)$  in three patients with MALT lymphoma and one with aggressive gastric DLBCL. Two of them had a previous history of Sjögren's syndrome, one of leukocytoclastic vasculitis, and the patient with gastric DLBCL had a chronic gastritis. All patients received an initial therapy and three are alive after 7-86 months from diagnosis. Extensive FISH analysis of  $t(X;14)$  mapped the Xp11.4 breakpoint in the intron 5 of CASK which houses GPR34 and GPR82, two gene coding for orphan G-protein coupled receptors. To identify the target of  $t(X;14)$ , we performed qRT-PCR analysis of five genes located distally to the Xp11.4 breakpoint (GPR82, GPR34, CASK, DDX3X, USP9X). Only one of these genes, GPR34, showed to be highly upregulated (>50 fold) in both analyzed cases. IHC showed expression of the GPR34 protein in all three MALT lymphomas. So far, in-

volvement of GPR34 in tumorigenesis has not been reported. To examine molecular consequences of an aberrant expression of GPR34 in lymphoma, we analyzed the status of NFkB and MAP kinase pathways by Western blotting with antibodies against P-Ik-Ba and P-ERK1. In both analyzed cases a phosphorylated Ik-Ba protein was detected. The cytogenetic finding of a subclonal gain of der(14) in two cases suggests that an extra dosage of the IGH-GPR34 product may provide a growth advantage for tumor cells. Agilent aCGH did not identify any cryptic microdeletion of the known tumor suppressor loci in the index cases. In summary, the novel  $t(X;14)(p11.4;q32.33)$  showed to be predominantly associated with MALT lymphoma. The translocation targets GPR34 which is upregulated due to its juxtaposition with strong regulatory elements of IGH. The finding of NFkB activation by  $t(X;14)/IGH-GPR34$  further strengthens the important role of this pathway in the development of MALT lymphoma.

1584.

#### Delta EX6, the novel transactivation-defective splicing variant of TP53, is differentially expressed in patients with Chronic Lymphocytic Leukemia and confers accented proliferative phenotype *in vitro*

Peková Soňa, Mazal Oldřich, Čmejla Radek, Kozák Tomáš, Smolej Lukáš, Špaček Martin (Laboratory for Molecular Diagnostics; Laboratories CHAMBON a.s., Praha; 3rd Medical Faculty, Department of Clinical Hematology, University Hospital Kralovske Vinohrady, Prague; Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague; Department of Clinical Hematology, 2nd Department of Internal Medicine, University Hospital and Medical School, Hradec Kralove)

Background: The regulation of TP53 is substantially controlled at the transcriptional level. Nine different splicing variants of TP53 have been described so far, with distinct biological characteristics, resulting from combinations of an alternative splicing of intron 2, 9 and/or aberrant transcription, starting at so-far unrecognized cryptic promoter in intron 4. We have recently identified a novel splicing variant of TP53 gene, termed delta ex6, lacking the whole coding sequence of exon 6 and harboring an insertion at the exon9/10 boundary. The delta ex6 variant is differentially expressed in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) as compared to healthy donors. Delta ex6 variant is devoid of transactivational activity as determined *in vitro* by FASAY (Functional Analysis of Separated Alleles in Yeast). Aims: The goal of the work was to test the biological properties of the novel TP53 transcript variant delta ex6 *in vitro*, using a TP53 double-knock-out model cell line H1299 with a stable integrated Tetracycline repressor (H1299TetR). Methods: We have cloned the whole delta ex6 coding sequence into a Tet-ON pcDNA4/TO vector and transfected the H1299TetR cell line to produce stable integrants. Four stable delta ex6 producing H1299TetR cell lines, as well



as control cell lines (parental H1299TetR harboring the pcDNA4/TO cloning vector, and H1299TetR stably transfected with wild type TP53) were subjected to the Affymetrix GeneChip Human Exon 1.0 ST whole genome expression analysis. Results: Stable H1299TetR cell lines expressing the delta ex6 variant were distinguished by a remarkable loss of intercellular contacts and semi-suspension growth properties, in contrast to the strictly adherent growth of the parental cells and mock-transfected cells. The microarray data corroborated accentuated and proliferative phenotype as observed in vitro: overexpression of a number of cyclins (A1, G1, G2, F, I, B2, A2, T2), matrix metalloproteinases, hyaluronidases and caspase inhibitors; and downregulation of adhesion molecules and molecules of the intercellular matrix. Summary: Our data on the presence of the delta ex6 TP53 variant in CLL patients supports the recent evidence on dysregulation of TP53 splicing pattern in malignancies. Moreover, as assessed in vitro, overexpression of the delta ex6 variant leads to an accentuated and proliferative phenotype, a finding further supporting the biological role of the novel delta ex6 TP53 variant in vivo.

#### 1509.

##### **PU.1 and E-box proteins cooperate to regulate BIC gene encoding microRNA-155**

Čuřík Nikola, Burda Pavel, Vargová Karin, Bašová Petra, Kokavec Juraj, Zavadil Jiří, Stopka Tomáš (*Institute of Pathological Physiology, First Faculty of Medicine, Charles University, Praha*)

Expression of hematopoietic genes is tightly regulated by oncogenic and tumor suppressor transcription factors and dysregulation of this process may cause leukemias. Among many genes involved in hematopoiesis and leukemogenesis are also genes encoding small inhibitory molecules called microRNAs. Regulation of microRNAs, including regulation of oncogenic miR-155 that is significantly overexpressed in chronic lymphocytic leukemia (CLL), represents important task in current hematology. We have identified CpG island upstream BIC gene encoding miR-155. This BIC CpG contains DNA binding motifs of tumor suppressor transcription factor PU.1 and also contains motifs for binding of E-box transcription factors (MYC and MYB) that are known hematopoietic oncogenes. We have prepared two reporter constructs to test effects of transcription factors MYC/MYB and PU.1 on BIC CpG island. The first CpG reporter contained the BIC sequence containing PU.1 binding site and lacking E-box DNA binding motifs (CpG-P) and the second reporter contained complete BIC sequence of the CpG (CpG-EP), both coupled with Luciferase. Manipulation of PU.1 and MYC and MYB on these reporter vectors resulted in the following: PU.1 activates CpG island of BIC gene and both MYC and MYB inhibit this effect by directly inhibiting PU.1 on DNA (CpG-P). In contrast, both MYC and MYB stimulate the BIC CpG by directly recognizing their E-box DNA binding motif albeit in the pre-

sence of PU.1 (CpG-EP). We suggest that transcription of BIC gene may be negatively regulated through E-box proteins interacting with PU.1 in protein-protein manner and positively regulated by E-box proteins in presence of PU.1 by their co-activation effects on DNA (IGAČR: NR9021-4, MŠMT: 2B06077, 0021620806, LC 06044).

#### 1510.

##### **Active chromatin structure upstream human BIC gene encoding microRNA-155 in chronic lymphocytic leukemia (CLL)**

Burda Pavel, Čuřík Nikola, Bašová Petra, Kokavec Juraj, Zikmund Tomáš, Zavadil Jiří, Stopka Tomáš (*Institute of Pathological Physiology, First Faculty of Medicine, Charles University, Praha*)

Epigenetics marks such as posttranslational modification of histone proteins near key hematopoietic genes may represent important factor in the course of diagnosis, prognosis and therapy of leukemias. As described previously oncogenic microRNA miR-155 is significantly overexpressed in CLL (Fulci 2007, Marton 2008) and we have focused on mechanisms regulating miR-155 levels. MiR-155 represents a small 21-nt spliced variant of BIC non-coding mRNA. Transcription factor PU.1 represents key hematopoietic differentiation regulator of myelo-lymphoid lineage development (Scott 1994, McKercher 1996) that is directly inhibited in CLL by microRNA miR-155. In this study, using quantitative chromatin immunoprecipitation on peripheral blood mononuclear cells from CLL patients (N=6) we identified transcriptionally active chromatin mark: acetylation of histone H3K9 at the CpG rich region upstream BIC transcription start site supporting hypothesis of epigenetic mechanism involved in upregulation of miR-155 levels in CLL. The evaluation of chromatin structure in patients with CLL has drawn our interest in the use of epigenetic therapy (IGAČR: NR9021-4, MŠMT: 2B06077, 0021620806, LC 06044).

#### 1429.

##### **Myeloma – specific T-cell clones can eliminate tumor cells and their long-term correlate with clinical outcomes in patients with multiple myeloma**

Michálek Jaroslav, Matějková Eva, Foltánková Veronika, Slabý Ondřej, Horváth Radek, Hájek Roman, Vitetta Ellen S. (*UCIC Brno, University Hospital Brno, Cancer Immunobiology Center, University of Texas at Dallas – USA*)

Despite novel treatment strategies, multiple myeloma remains incurable disease with low immunogenicity and multiple immune defects. In this study, we developed an ex vivo strategy for inducing myeloma-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) and demonstrating the possibility for identification and long-term in vivo monitoring of individual myeloma-specific T cell clones by the most sensitive clonotypic assay that is able to detect low frequency (1 clo-

notypic cell in 106 cells) T cell clones. Ten patients with multiple myeloma were examined for the presence of tumor-reactive T cells using dendritic cells loaded with autologous tumor cells. Their 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 $\gamma$ + T cells, T cell receptor beta locus anchored reverse transcription-PCR, and clonotypic quantitative PCR. All patients had detectable myeloma-reactive T cells in vitro. Expanded myeloma-reactive T cells demonstrated specific cytotoxic effect against autologous tumor cells in vitro (median 39.6% at the effector-target ratio of 40:1). The cytotoxicity was HLA class I-dependent mediated by CD8+ CTLs. In 8 patients the clonality of myeloma-specific T cells was studied with clonotypic assay and demonstrated oligoclonal or monoclonal populations of myeloma-specific T cells. The most immunodominant myeloma-specific T cell clones were CD8+ CTLs. Five patients were further monitored for a long-term presence of immunodominant myeloma-specific T cells. Clinical responses were closely associated with the in vivo expansion and long-term persistence of individual CD8+ T cell clones in three patients with partial remission or stable disease with low but detectable clonotype frequencies of 10<sup>-6</sup> to 10<sup>-3</sup> of all circulating CD3+ T cells. Two patients with progressive disease experienced no or temporary presence of circulating myeloma-specific T cell clones. In conclusion, circulating immunodominant myeloma-specific CD8+ CTL clones closely correlate with clinical outcome in patients with multiple myeloma and the clonotypic assay is the most sensitive tool for immunomonitoring low frequency T cells. Supported by MŠMT NPVII 2B06058 and IGA MZ 1A/8709-5.

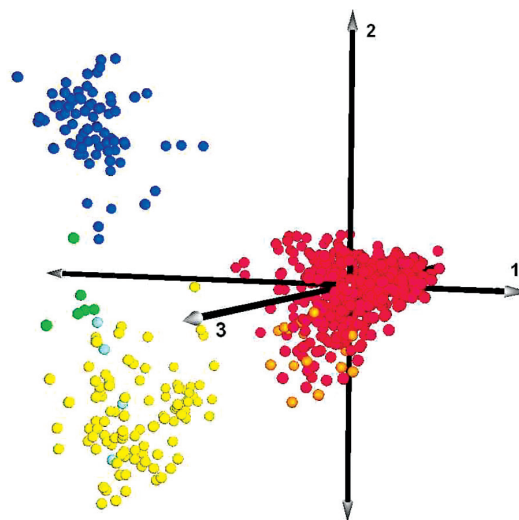
## 1512.

### Acute hybrid leukemia and the new WHO classification

Mejstříková Ester, Volejníková Jana, Froňková Eva, Zdráhalová Kateřina, Kalina Tomáš, Štěrba Jaroslav, Jabali Yahia, Mihál Vladimír, Blažek Bohumír, Černá Zdena, Procházková Daniela, Hak Jiří, Sedláček Petr, Zemanová Zuzana, Jarošová Marie, Oltová Alexandra, Zuna Jan, Schwarz Jiří, Trka Jan, Starý Jan, Hrušák Ondřej (Praha, Brno, České Budějovice, Olomouc, Ostrava, Plzeň, Ústí nad Labem, Hradec Králové)

Acute hybrid leukemia (AHL) patients represent a diagnostic and therapeutic dilemma. European Group for the Immunological Classification of Leukemias (EGIL) scoring system unambiguously defines AHL expressing aberrant lineage markers. Discussions surrounding it have focused on scoring details, and information is limited regarding its biological, clinical and prognostic significance. In a new version of WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues published in 2008 a new definition of hybride leukemias is proposed and these leukemias are called newly as mixed phenotype acute leukemia

(MPAL). AHL according EGIL classification and MPALs are not fully the same leukemias. Results of molecular genetics, namely presence of BCR/ABL fusion gene or MLL rearrangement is integrated into the definition of MPAL subcategory. In this population-based study, incidences of EGIL-scorepositive AHL were 28/582 and 4/107 for ALL and AML, respectively. Immunophenotypic principal component analysis (PCA) showed that hybrid T-ALL form a distinct cluster located between non-hybrid T-ALL and AML cases while hybrid B-cell precursor (BCP) ALL and hybrid AML were included in the respective non-hybrid PCA clusters. Analogously, immunoglobulin/T-cell receptor gene rearrangements followed the expected pattern in AML (non-rearranged, 4/4) and BCP-ALL (rearranged, 20/20), but were missing in 3/5 analyzed. hybrid T-ALL. While 5-year event-free survival (EFS) is comparable in the hybrid versus non-hybrid T-ALL on ALL treatment (80 $\pm$ 18% versus 72 $\pm$ 5.3%) as well as in the hybrid versus non-hybrid AML receiving AML therapy (25 $\pm$ 22% versus 48 $\pm$ 5.1%), ALL-directed treatment has significantly poorer results in hybrid compared to non-hybrid BCP-ALL patients (EFS 45 $\pm$ 11% versus 77 $\pm$ 2.1%, p=0.0008). However, comparison of our data to published cohorts did not justify the general use of current AML-based therapy in these patients. Supported by IGA NS/9997-4; IGA NR/9531-3, MZCR 000064203, MSM0021620813, NPV 2B06064.



## MNOHOČETNÝ MYELOM I

## 1561.

### Novinky v diagnostické části guidelines MM 2009

Maisnar Vladimír, Ballová Veronika (Česká myelomová skupina, II. interní klinika - OKH, FN a LF UK, Hradec Králové; Slovenská myelomová spoločnosť, NOÚ Bratislava)

Na podzim tohoto roku je připraveno další vydání Guidelines pro diagnostiku a léčbu mnohočetného myelomu (MM). Cílem našeho sdělení je rekapitulace novinek v jejich diagnostické části při srovnání s posledním vydáním Guidelines z roku 2005. Přestože se paleta vy-

šetření používaná k stanovení diagnózy MM od posledního vydání guidelines podstatně nezměnila, došlo k celé řadě změn týkajících se jak klasifikace onemocnění, tak i hodnocení léčebné odpovědi. Od roku 2006 je platné nové mezinárodní hodnocení léčebných odpovědí a stanovení dlouhodobých intervalů pro jejich vyhodnocení a následné porovnání, jehož autorem je The International Myeloma Working Group (IMWG). Všechny tyto změny souvisí s využíváním tzv. „nových léků“ v léčbě mnohočetného myelomu od počátku tohoto století. Ty mají dnes za následek dříve těžko představitelné léčebné výsledky, kdy se u nemocných kombinovanou léčbou daří dosahovat až 50% kompletních remisí (CR) bez toho, že by byla použita vysokodávková léčba následovaná autologní transplantací. Proto je nutné léčbu nemocných zahájit včas a současně dosáhnout, co nejlepší léčebné odpovědi. Časná diagnostika je jedním ze stěžejních programů CMG, která za tímto účelem iniciovala spuštění celonárodního projektu CRAB. Z důvodu zlepšení léčebných výsledků byly nově do hodnocení dosažené léčebné odpovědi zavedeny kategorie „stringent“ a molekulární kompletní CR, využívající k hodnocení reziduální choroby nově vyšetření lehkých řetězců, imunofenotypizaci resp. vyšetření kostní dřene pomocí PCR. Dalším zásadním problémem, který si vyžádal a do budoucna jistě vyžádá ještě řadu dalších změn v diagnostických postupech MM, je skutečnost, že řada dosavadních prognostických markerů MM ztratila při použití nových léků svoji prognostickou sílu. Za dobrý příklad zde může posloužit studie VISTA, kdy použití režimu MPV (Melfalan, Prednison, Velcade) vedlo k potlačení negativního vlivu věku, přítomnosti selhání ledvin resp. vybraných chromozomálních aberací. Proto dnes platí obecná zásada, že při použití každého nového léku musí být stávající prognostické markery znovu validovány a musí být potvrzena jejich prognostická síla v nových podmínkách. Nové léky tedy iniciovaly i naši revizi guidelines pro diagnostiku a léčbu MM v České i Slovenské republice, se kterými se ještě v průběhu tohoto roku budete moci seznámit.

**1486.**

#### **Imunofenotypizace plazmocytů u mnohočetného myelomu**

Kovářová Lucie, Burešová Ivana, Suská Renata, Perutka Tomáš, Muthu Raja Karthick Raja, Zarbochová Pavla, Penka Miroslav, Hájek Roman (*OKH-LEHABI, FN, Brno; URC-CMG, LF MU, Brno; PŘF MU, Brno; IHOK, FN Brno*)

Úvod: Mnohočetný myelom (MM) je druhé nejčastější krevní nádorové onemocnění vyznačující se infiltrací kostní dřene klonálními plazmocyty (PC). Analýza PC pomocí multiparametrické průtokové cytometrie se stává standardním vyšetřením, které má své místo v diferenciální diagnostice monoklonálních gamapatií a může sloužit k odlišení nádorových klonálních PC od jejich fyziologických

protějšků. Prognostický význam markerů exprimovaných na patologických PC je stále upřesňován. Cílem práce je vstupní analýza fenotypu PC u pacientů s MM a stanovení jeho souvislosti s prognózou pacientů. Soubor nemocných a metody: Celkem bylo zhodnoceno 112 nově diagnostikovaných pacientů s MM, medián věku 68 let (42-86). Vzoroky kostní dřene byly analyzovány pomocí průtokové cytometrie, kdy PC byly indentifikovány jako CD38+CD138+ buňky a na těchto PC byla analyzována exprese povrchových markerů CD19, CD27, CD28, CD56 a CD117. Výsledky: Medián zastoupení CD38+CD138+ PC byl v celé skupině pacientů 7,9% (0,2-75,3). Medián exprese znaku CD19 byl 0,4% (0,0-64,0); CD19+ PC byly nalezeny u 5 pacientů (4,5%) a pouze v 1 případě se jednalo o klonální PC, v ostatních případech byly prokázány reziduální normální PC. Pomocí znaku CD56 byly detekovány patologické PC, kdy medián exprese byl 96,2% (0,3-100,0); což odpovídá naprosté převaze patologických PC ve dřeni pacientů. Expresí CD56 na PC nebyla zcela homogenní, u 24 pacientů (21,4%) byla dokonce nižší než 10% a tyto patologické PC pak byly vesměs CD19-CD56-. U znaků CD20, CD27, CD28 a CD117 byl také zjištěn jistý stupeň heterogenity exprese, jako pozitivní PC byly stanoveny pouze ty, které daný marker exprimovaly ve více než 20%. Expresí CD20 pak byla prokázána u 8 pacientů (7,1%) a u 5 pacientů se pojila s CD56- fenotypem. Znak CD27 byl detekován na PC u 51 pacientů (45,5%), CD28 u 34 pacientů (30,4%) a CD117 u 39 pacientů (34,8%), přičemž nejčastější kombinací byla koexpresí CD27 a CD28 nalezená u 13 pacientů (11,6%). Závěr: Z výsledků je patrné, že většina PC je fenotypu CD19-CD56+, avšak detailní analýza ukázala další fenotypové odlišnosti, což je ve shodě s heterogenitou tohoto onemocnění. Studium exprese vybraných markerů by mohlo přinést nové informace ve vztahu k různému biologickému chování myelomu a následně k prognóze pacientů s MM, kdy hlavním cílem bude určení pacientů s nízkým či vysokým rizikem progresu onemocnění. Podpořeno projekty: GAČR 301/09/P457, MŠMT LC06027 a MSM0021622434.

**1560.**

#### **Genomová profilace myelomových pacientů s nepříznivými cytogenetickými markery pomocí oligonukleotidové array-CGH**

Zaoralová Romana, Smetana Jan, Vránová Vladimíra, Němec Pavel, Grešliková Henrieta, Kyjovská Drahomíra, Sáblíková Barbora, Kupská Renata, Kuglík Petr, Hájek Roman (*MU, Univerzitní výzkumné centrum - Česká myelomová skupina, Brno; MU PŘF, Oddělení genetiky a molekulární biologie, Brno; MU LF, IHOK FN, Brno; OKH FN, Brno*)

Mnohočetný myelom (MM) je onemocnění způsobené maligní transformací B-lymfocytu, jeho klonální proliferací a akumulací v kostní dřeni. Prognostický význam cytogenetických abnormalit definovaný v éře konvenční chemoterapie je v současnosti ověřován v éře vysoce účinných lé-



ků (bortezomib, thalidomid, lenalidomid). Komparativní genomová hybridizace s využitím platformy DNA čipu (array-CGH) je metoda celogenomového screeningu, která zároveň umožňuje citlivou identifikaci zisků a ztrát sekvencí DNA na úrovni jednotlivých genů. V naší studii jsme provedli 19 vyšetření pomocí oligonukleotidové array-CGH s vysokým rozlišením (Agilent, čip 44k) u 18 pacientů s různými aberacemi, které jsme dříve našli metodou FISH. Osm vzorků bylo hyperdiploidních, 7 se ziskem 1q21. U 8 vzorků byla DNA izolovaná z plně kostní dřevě, ostatní vzorky byly ze separovaných buněk (MACS). U čtyř vzorků byla array-CGH neúspěšná z důvodu nízkého počtu MM buněk v kostní dřevě. Z 11 úspěšně vyšetřených vzorků bylo od relabujících pacientů, 4 od nově diagnostikovaných pacientů. V našich vzorcích jsme pozorovali celkem 52 různých ztrát a 26 zisků. Ve všech případech jsme metodou array-CGH potvrdili předchozí nálezy z FISH, a kromě těchto změn (-13, -17p, +1q) jsme našli další aberace přítomné nejméně ve čtyřech vzorcích: ztráty 8p, 16q, 1p13, 6q25 a zisk +19. U dvou pacientů jsme pozorovali bi-alelickou delecí v oblasti 11q22. Dále jsme pozorovali rozdíl mezi profily hyperdiploidních (H, N=8) a nonhyperdiploidních (NH, N=7) vzorků. V H vzorcích převládaly velké delece, které se opakovaly u několika pacientů (19 oblastí, z toho 10 nejméně u tří H pacientů, vs. 6 oblastí, jedna u tří NH pacientů). U NH vzorků byly nejčastější změnou drobné individuální delece (>30 u NH vs. 17 u H). Ve všech případech, kde byl metodou FISH nalezen zisk 1q21, jsme metodou aCGH pozorovali zisk celého ramene 1q. Srovnání skupin vzorků se ziskem 1q a bez něj ukázalo také rozdíl v počtu malých delecí (42 u skupiny +1q vs. 17), ale ne v počtu zisků celých ramen nebo chromozómů (15 vs. 16 změn). Tyto výsledky naznačují rozdíl mezi genomovým profilem pacientů s negativním prognostickým faktorem (zisk 1q, NH) a bez něj. Další analýza rozdílů v genomových profilech může vést k nalezení významných markerů pro pacienty léčené novými léky, přesnější stratifikaci MM, a pro stanovení optimální léčby pro konkrétní pacienty. Podporováno granty a projekty LC06027, VZMSM0021622434, VZMSM0021622415 a IGA NR9317.

**1542.**

#### **Centrosome amplification in plasma cells and B-cells of multiple myeloma**

Dementyeva Elena, Muthu Raja Karthick Raja, Kryukov Fedor, Němec Pavel, Smetana Jan, Zaoralová Romana, Kupská Renata, Kyjovská Drahomíra, Kuglík Petr, Hájek Roman (*University Research Centre - CMG, Faculty of Medicine, MU, Brno; University Cell Immunotherapy Center, Faculty of Medicine, MU, Brno; Internal Haemato-oncology Clinic, Faculty Hospital Brno, Faculty of Medicine, MU, Brno; Department of Genetics and Molecular Biology, Institute of Experimental Biology, Faculty of Science, MU, Brno*)

Centrosome amplification in plasma cells and B-cells of multiple myeloma. Introduction: Centrosome amplifi-

cation has been frequently observed in haematologic malignancies, and is linked to tumorigenesis and aneuploidy. In contrast with normal cells, most tumor cells contain multiple centrosomes, associated with the formation of multipolar mitotic spindles and chromosome segregation defects. Centrosome amplification presents in all stages of monoclonal gammopathies and the percentage of plasma cells with centrosome amplification increased progressively from MGUS to multiple myeloma (MM). The initial steps of malignant transformation can occur in earlier stages of B cell development, which are able to divide and that is why can duplicate centrosomes. These cells may be represent some clonally related pre-switch growing populations responsible for progression. There is also open theory of multiple myeloma stem cells which could be hidden in these subset of clonal cells. Patients and methods: Immunofluorescent staining method was optimized on plasma cells and CD 19+ cells of MM patients. Plasma cells were evaluated by immunolabeling on cytopsin slides of bone marrow. CD 19 + cells were sorted directly on slides from CD138- fraction by fluorescence-activated cell sorting (FACS). The target of immunofluorescent staining was structural centrosome protein – centrin as an integral centrosome protein associated with and required for the duplication of centrioles. Total of 33 samples of plasma cells and 13 samples of CD 19 + cells were analyzed in this pilot experiment. Results: Centrosome amplification was seen in 76% of typical clonal plasma cells with median of centrosome amplification 5% (range 1%-26%). More important fact consists in finding that CD 19 + cells contains centrosome amplification in 100% of cells with median 8% (range 1%-18%). Preliminary data will be updated in presentation. Conclusion: Optimized method of centrosome amplification detection on B-cells gives us opportunity to find mitotic disruption on earlier stages of plasma cell development. This could clarify some first steps of plasma cell oncogenesis. Supported by VZ LC 06027, MŠMT ČR (MSM-0021622415) and IGA NR 9317.

**1404.**

#### **T regulatory cells and its influence on monoclonal gammopathy disorders**

Muthu Raja Karthick Raja, Zahradova Lenka, Kovarova Lucie, Buresova Ivana, Mikulkova Zuzana, Peturka Tomas, Kryukov Fedor, Hajek Roman, Michalek Jaroslav (*ILBIT A3, Masaryk University, Brno; Internal Hemato-oncology Department, Faculty Hospital, Brno; University Cell Immunotherapy Center MU Brno; URC-CMG, MU, Brno*)

Multiple myeloma (MM) is an incurable B-cell malignancy, characterized by uncontrolled growth of plasma cells (PCs). We analysed T regulatory cells (Treg) by staining for surface antigens CD4, CD25, CD127 and intracellular staining for FoxP3 in peripheral blood (PB) and bone marrow (BM) of 33 patients with monoclonal gam-

mapathy disorders (MGUS-6, SMM-4, and MM-23). The median age of the patient group was 66 years. Twenty MM patients were followed for 3 cycles of treatment with CTD (Cyclophosphamide Thalidomide and Dexamethasone). Patients < 65 were treated with high dose of CTD (C 500mg I.V Day 1 and 15, T 200mg daily, D 40mg Day 1-4 and 15-18) and patients > the age of 65 were treated with low dose (C 50mg P.O daily, T 100mg daily and D 20mg Day 1-4 and 15-18). 53% of patients were characterized for >30g/L of serum monoclonal protein (SMP) and 47% of patients found to have <30g/L of (SMP). According to plasma infiltration in the bone marrow (BMPCs), 31% of patients had >10 % of PCs and 69% of patients had <10% of PCs. We studied the frequency of Treg cells between 7 healthy controls and monoclonal gammopathy patients. We were able to demonstrate significantly increased levels of Treg in PB of MM patients in comparison with healthy controls ( $p=0.004$ ). There was no significant difference found between the level of PB Treg and BM Treg of MGUS ( $p=0.068$ ), SMM ( $p=0.068$ ) and MM patients ( $p=0.287$ ). We observed a trend of Treg increase in peripheral blood and bone marrow of patients with >10 % of PCs and >30g/L of SMP but it did not reach statistical significance [PCs ( $p=0.18$ ,  $p=0.37$ ) and SMP ( $p=0.09$ ,  $p=0.86$ )]. The level of Treg in PB of MM patients increased following the 2-nd treatment cycle ( $p=0.003$ ). No difference in Treg cells was noticed between the high dose CTD group and low dose CTD group during 3 treatment cycles. In conclusion, profound differences in Treg population were noticed in patients with monoclonal gammopathy disorders. The CTD therapy can further enhance Treg cells which might also have indirect role on hindering the effective tumor response. Supported by MSMT NPV11 2B06058, MSMT LC06027 and MSM0021622434.

#### 1462.

##### Postižení srdce při AL – amyloidóze

Pika Tomáš, Vymětal Jiří (III. interní klinika, LF UP a FN, Olomouc)

Úvod: Primární systémová (AL) amyloidóza je systémové hematologické onemocnění patřící do skupiny monoklonálních gamapatií, charakterizované extracelulární depozicí insolubilních fibril tvořených fragmenty nebo kompletními molekulami lehkých řetězců imunoglobulinu produkovaných klonální plazmocelulární populací, vedoucí k následné tkáňové dezorganizaci a poruše funkce postižených orgánů. Postižení srdce je přítomno přibližně u poloviny nemocných a jedná se o nejvýznamnější prognostický ukazatel u této nemoci. Cíl: Cílem studie byla detekce přítomnosti kardiálního postižení s pomocí laboratorních a neinvazivních paraklinických metod ve skupině 10 nemocných s AL amyloidózou vyšetřených v době diagnózy onemocnění. Metody: Soubor tvořilo 10 nemocných s histologicky verifikovanou AL amyloidózou (8x AL, 2x asociovaná s mnohočetným myelomem),

všichni nemocní byli vyšetřeni v době diagnózy pomocí EKG, echokardiografie, byly stanoveny hladiny NT-proBNP, Troponinu T a výběrově byla provedena magnetická rezonance myokardu (MRI). Výsledky: Z 10 nemocných 6 (60%) pacientů splňovalo „Tours 2004“ kritéria postižení srdce amyloidózou dle echokardiografie, u všech těchto nemocných byla přítomna diastolická porucha a rovněž EKG vyšetření vykazovalo charakteristické známky; u 5 těchto nemocných byla zaznamenána pozitivita Troponinu T. Hladiny NT-proBNP byly zvýšeny celkem u 9 nemocných, z toho u 7 nemocných nad 1000ng/l. U 4 nemocných byla provedena MRI srdce, s pozitivním nálezem u 2 nemocných, kteří již měli echokardiografické známky kardiálního postižení. U 2 nemocných s negativním nálezem na MRI nebyly EKG ani echokardiografické známky srdečního postižení. Závěr: Předběžné pozorování potvrzuje velmi dobře zavedený algoritmus vyšetření u nemocných s AL amyloidózou, kombinace zobrazovacích metod, serologických ukazatelů a spolu s „Tours 2004“ kritérii se jeví jako optimální přístup k diagnostice a monitorování nemocných s postižením srdce. K objasnění role MRI v diagnostice a zejména sledování léčebné odpovědi je nutné rozšíření doposud omezeného souboru nemocných. S podporou VVZ MSM 619895205.

#### MYELOID LEUKEMIA / SIGNALING (2<sup>ND</sup> SYMPOSIUM ON ADVANCES IN MOLECULAR HEMATOLOGY)

#### 1505.

##### Evidence for an anti-cancer barrier in a mixed lineage leukemia mouse model *in vivo*

Takacova Sylvia, Bartek Jiri, Slany Robert, Divoky Vladimir (Department of Biology, Faculty of Medicine, Palacky University Olomouc; Institute of Cancer Biology, Danish Cancer Society Copenhagen - Denmark; Department of Genetics, University Erlangen – Germany)

Mixed Lineage Leukemia (MLL) mutations identify a unique group of acute leukemias with distinct biological and clinical features. Although the role of MLL in leukemogenesis has been extensively studied, a precise mechanism of leukemia development is not known. We generated a switchable MLL-ENL-ERTm mouse model, in which the MLL-ENL-ERTm oncogene is expressed at physiological levels, and its activity is dependent on continuous provision of tamoxifen. The MLL-ENL-ERTm mice have developed a myeloproliferative disorder (MPD) characterized by mature neutrophilia after 484,5 +/- 75,68 days of latency on a tamoxifen diet, in association with high white cell counts in peripheral blood and splenomegaly. Blood smears showed large numbers of mature myeloid elements consisting of 40-80% neutrophils (band forms in abundance) with a myeloid left shift and polychromasia. The phenotype of MPD occasionally involved myelomonocytic proliferation with

35% immature monocytic cells and severe anemia. High penetrance and long latency of the phenotype in our model permits the study of early leukemia development. At the initial phase of MLL-ENL-driven cell transformation (preleukemia), bone marrow smears revealed expansion of neutrophils indicating reactivation of self-renewal/proliferation properties in committed progenitors. We observed that a myeloid cell population mainly consisting of band neutrophil elements and showing a CD34-CD43+Mac-1+Gr-1+CD16/32+ immunophenotype, infiltrates the spleen at the very early stage of the disease. Infiltration of spleen correlates with increased proliferation rate measured by 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrDU) incorporation in vivo compared to wild-type matched control. Interestingly, the preleukemic bone marrow showed subsequent decline in BrDU incorporation associated with increased expression of p21CIP1 and p16INK4A and activation of senescence-associated  $\beta$ -galactosidase activity typical for cellular senescence. Paralelly, we also detected apoptosis using the TUNEL assay in the preleukemic bone marrow. Our results suggest activation of a potential tumor suppressor mechanism in response to activated MLL-ENL – induced aberrant proliferation in early stages of cellular transformation. We are currently investigating potential tumor suppressor pathways that might provide a barrier to malignant progression in MLL. Supported by grants MSM6198959205 and NPV2B06077 from the Ministry of Education, Youth and Sports, Czech Republic.

**1578.**

**Cytokine signaling after genotoxic stress**

Hubáčková Soňa, Nováková Zora, Košář Martin, Jandrová-Rossmeislová Lenka, Dobrovolná Jana, Vašicová Pavla, Hořejší Zuzana, Bartek Jiří, Hodný Zdeněk (*Institute of Molecular Genetic, Department of Genome Integrity, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague; Biology of Reproduction Department, Institute of Animal Science; Department of Sports Medicine, 3rd Faculty of Medicine, Charles University, Prague; Hospital for Special Surgery, Department of Microbiology and Immunology, Weill Medical College of Cornell University, New York – USA ; Laboratory of Cell Reproduction, Institute of Microbiology, v.v.i., Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague; DNA Damage Response Laboratory, Cancer Research UK, Clare Hall Laboratories, UK; Department of Cell Cycle and Cancer, and Centre for Genotoxic Stress Research, Institute of Cancer Biology, Danish Cancer Society, Denmark*)

Cellular senescence guards against cancer and modulates aging, however the underlying mechanisms remain poorly understood. Here we show that long-term administration of genotoxic drugs capable of inducing premature senescence in normal and cancer cells, such as 5-bromo-2'-deoxyuridine, distamycin A, aphidicolin and hydroxyurea, persistently activates JAK/STAT signaling (mo-

nitored by STAT1-Tyr701/Ser727 phosphorylation) and expression of interferon-stimulated genes, such as MX1, OAS, ISG15, STAT1, PML, IRF1 and IRF7 in several human cancer cell lines. Activating ligands of the and IL6 were, IFN $\gamma$ /STAT pathway such as IL-10, IL-20, IL-24, IFN also expressed by senescent cells supporting autocrine/paracrine route of JAK1/STAT activation. Furthermore, additional genes coding cytokines including pro-inflammatory species of IL1, TNF and TGF families were highly expressed. The role of JAK1 in expression of interferon-stimulated genes was confirmed using RNA interference, which resulted in down-regulation of STAT1 activation and suppression of mRNA levels of several ISGs. Among the drugs used, 5-bromo-2'-deoxyuridine combined with distamycin A were the strongest inducers of JAK/STAT signaling and cytokine production, which correlated with their synergy to promote senescence. This study displays the complexity of cytokine network activated by genotoxic stress leading to premature senescence, and may inspire search for clinically applicable senescence-promoting compounds and their combinations.

**1583.**

**Molecular variability of FLT3/ITD mutants and their impact on the differentiation program of 32D cells: implications for the biological properties of AML blasts**

Peková Soňa, Dvořák Michal (*Laboratory for Molecular Diagnostics Laboratories CHAMBON a.s., Praha; Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*)

Background: FLT3 is the most frequently mutated gene in AML – up to 40% of AML harbor an activating mutation within FLT3 gene. Though AML is a relatively rare disease, such a high mutability rate, as observed with FLT3 gene, is striking. Aims and Methods: To elucidate the molecular background of this phenomenon, we have established nine unique FLT3/ITD - carrying 32D cell lines and a set of controls, and subjected them to Affymetrix whole genome expression profiling and 2DE LC/MS proteomics. Results: Data obtained on this large set of ITD mutants indicates that FLT3/ITD positive cells exhibit less mature expression profiles resembling ST-HSC and MkEP/CMP/LMPP progenitors. FLT3/ITD-positive 32D cells overexpress a combination of genes of pluripotency (Etv5, endoglin, EpoR, Mpl, Trfr2, GATA.2, Hemgn, Myb, Dok2, Gli1, Pim3, PML, Ikaros, Pum1, Dlx4, Hox-c8, HoxB9, Runx1, c-Myc, Shh, FL) and early erythroid precursors (EpoR, Trfr2, GATA.1, Klfl1), implicating their less mature expression profile than 32D cell lines harboring wild type FLT3 or 32D controls. Conclusion: We hypothesize that FLT3/ITD might contribute not only to the proliferative advantage of FLT3/ITD positive cells, but also to their reprogramming towards less differentiated stages, thus strengthening their malignant properties. This finding might explain the pronounced mu-



tation rate of the aberrantly expressed FLT3 gene in AML, and, also, the inferior prognosis of FLT3/ITD positive AML patients. Moreover, the microarray data has revealed biological differences among individual ITD variants – a finding supporting the recent clinical data on the prognostic impact of the size of individual ITDs.

**1552.**

**Transcription factors PU.1 and EGR2 inhibit the oncogenic microRNA cluster Mir-17-92 during myeloid differentiation - implications for pathobiology of acute myeloid leukemia**

Pospíšil Vít, Vargova Karin, Kokavec Juraj, Rybarova Jana, Burda Pavel, Necas Emanuel, Zavadil Jiri, Stopka Tomas (*Pathological Physiology and Center of Experimental Hematology, First Faculty of Medicine, Charles University, First Medical Department, General Faculty Hospital, Prague, Czech Republic*)

MicroRNAs are a novel class of potent post-transcriptional regulators of gene expression implicated in basic cellular processes as metabolism, differentiation, development and carcinogenesis. miR-17~92 cluster known as well as Oncomir1 is cluster of seven related microRNA associated with cell proliferation, apoptosis and development that is overexpressed in number of diverse malignancies, including chronic myeloid leukemia. In developing macrophages miR-17~92 cluster is downregulated during differentiation and its sustained expression is associated with the differentiation block (Fontana 2007). We identified mechanism of downregulation of miR-17 ~ 92 clusters in differentiating myeloid progenitors. Myeloid transcriptional factor PU.1 positively regulates another transcription factor Egr2, established propagator of macrophage transcriptional program and putative repressor of miR-17-92. Egr2 binds to miR-17~92 cluster promoter and recruits histone demethylase Jarid1b resulting in histone H3K4 demethylation of the CpG island near miR-17~92 cluster promoter leading to downregulation of expression of miR~17-92 cluster. Further experiments revealed that miR-17~92 cluster has potential to downregulate its repressor Egr2, creating mutual regulatory circuit. We have tested this newly identified mechanism whether it is involved in leukemic blockade. Peripheral blood mononuclear cells isolated from acute myeloid leukemia (AML) patients (N=17) were used and 9 of 17 patients had significantly downregulated transcriptional factors PU.1 and Egr2 and simultaneously elevated levels of miR-17 ~ 92 cluster. In addition, in these AML patients decreased levels of the established miR-17-92 targets: p21 and BIM were also observed. We conclude that PU.1 regulates transcription of the miR-17~92 cluster by inducing Egr2 and demonstrate this mechanism in differentiating macrophages and its suspected disruption in AML cells. (IGAČR: NR9021-4, MŠMT: 2B06077, 0021620806, LC 06044).

**1508.**

**Ctcf interacts with Smarca5: implications for epigenetic regulation in leukemia**

Kapalová Martina, Čuřík Nikola, Vargová Jarmila, Kokavec Juraj, Burda Pavel, Stopka Tomáš (*Institute of Pathological Physiology, First Faculty of Medicine, Charles University, Praha*)

Regulation of gene expression represents important task for tumor biology especially in leukemogenesis where gene expression profile of differentiation block and accelerated proliferation is presumably dependent on epigenetic regulation. Transcription factor Ctcf (CCCTC-binding factor) represents major regulatory component of epigenetic regulation by recognizing its unmethylated DNA binding sites to activate and respectively inhibit transcription of the neighboring genes. Ctcf has been described in transgenerational genetic imprinting and very little has been so far known about its role in leukemias. Since mechanisms of how Ctcf regulates gene transcription are largely unknown we have tested whether Ctcf may recruit chromatin remodeling proteins. Since acute leukemias are marked by elevated levels of chromatin remodeling ATPase Smarca5 (Snf2h, MomeD4) (Stopka 2000) we have firstly tested expression of Ctcf and Smarca5 in murine erythroleukemia cells and found that these proteins are abundantly expressed in these cells by Western blotting analysis. Secondly, we found that Ctcf and Smarca5 share nuclear compartments determined by confocal scanning microscopy. Finally, we have tested Ctcf and Smarca5 by coimmunoprecipitation in MEL cells and found that Ctcf and Smarca5 interact in vivo. Our data collectively suggest that Smarca5 may be recruited by Ctcf on DNA at specific gene regulatory regions; detailed experiments by using chromatin immunoprecipitation are currently ongoing (IGAČR: NR9021-4, MŠMT: 2B06077, 0021620806, LC 06044).

**1497.**

**MiR-150 expression in diagnosis and progressed phases of CML is downregulated**

Lopotová Tereza, Vlčanová Kateřina, Moravcová Jana, Stopka Tomáš, Klamová Hana, Machová Poláková Kateřina (*Institute of Hematology and Blood Transfusion, Institute of Pathological Physiology, First Faculty of Medicine, Charles University, Praha*)

Despite highly effective treatment of chronic myeloid leukemia (CML) with imatinib inhibiting BCR-ABL tyrosine kinase activity, there are still patients resistant to this therapy. Mechanisms of resistance to imatinib are still imperfectly understood. We herein determined expression of specific miRNAs in different phases of CML treated with imatinib. We analysed miRNAs in CML leukocytes at 1. Major molecular response (MMR, n=5), 2. Suboptimal response/therapy failure (not achieved cytogenetic response after 12 months of imatinib, without relapse, SR/TF, n=5); 3. Start of hematological relapse (Hr, n=5); 4. Blast crisis (BC,

n=4) and 5. Diagnosis (Dg, n=5). Leukocytes from peripheral blood of patients in each group were pooled for microarray analysis (PIQORTM miRXplore arrays, Miltenyi Biotech). A pool of total leukocytes from 13 healthy donors was used as a control. Real-time PCR was applied for microarray data confirmation (both pools and individual samples were measured) and for expression analyses of selected miRNA targets. Most differentially expressed miRNAs were found in BC (miR-181a, miR-222, miR-106a, miR-221, miR-17-92 cluster). Interestingly, expression of miR-150 was downregulated in Dg, Hr and BC; normal levels were found in MMR and SR/TF. To further investigate the role of miR-150 in CML, we analysed expression of its predicted targets PU.1 and EGR2, transcription factors regulating lineage differentiation during hemopoiesis, and of MYB and MYCN that regulate proliferation. As expected, MYB and MYCN were upregulated possibly due to low miR-150 levels. Unexpectedly, PU.1 and EGR2 were downregulated indicating involvement of other inhibitory molecules. Further experiments to resolve inhibitory mechanisms between miR-150 and MYB and MYCN in CML are ongoing. Supported by GACR GA301/08/P154 and MZCR 00023736.

## MNOHOČETNÝ MYELOM 2

1445.

**Nové léky & nová guidelines myelomové sekce České hematologické společnosti, České myelomové skupiny a Slovenskej myelómovej spoločnosti**

Hájek Roman, Ballová Veronika (*IHO K FN a LF Brno a CMG, Brno, NOÚ Bratislava a SMS, Bratislava*)

Již třetí re-edice guidelines „Diagnostika a léčba mnohočetného myelomu“ byla připravena pro rok 2009. Předmětem sdělení jsou klíčové změny v léčbě mnohočetného myelomu (MM). Prognóza na dlouhodobé přežití nemocných s MM se během posledních deseti let dramaticky zlepšila. Šanci na přežití v 10 letech od zahájení léčby má více než 1/3 správně léčených nemocných. Pokrok je jednoznačně spojen se zavedením tří velmi účinných léků do rutinní praxe - thalidomidu, bortezomibu a nejnověji lenalidomidu. Režimy s účinnými léky musí být upřednostněny v rutinní praxi. Podstatné pro zlepšení celkových výsledků je jejich celorepubliková dostupnost v České republice a Slovenské republice. Jen tak může dojít ke zlepšení nejdůležitějšího parametru – celkového přežití. „Tři mušketýři“ mají jako jediné léky proti MM takovou účinnost, že i v monoterapii dosahují léčebné odpovědi asi u 1/3 nemocných refrakterních nemocných na léčbu. V kombinaci s glukokortikoidy pak dosahují asi 50% léčebných odpovědí a po přidání konvenčního cytostatika do trojkombinace dosahují léčebné odpovědi až u 80-100 % nepředléčených nemocných nebo 2/3 předléčených nemocných. A to i u refrakterních nemocných MM s rezistencí na jinou dostupnou léčbu. Dlouhodobé výsledky z randomizovaných klinických studií jsou již známé a jasně pozitivní ve prospěch

thalidomidu a bortezomibu v primoléčbě, v případě lenalidomidu jsou výsledky pozitivní zatím v relapsu onemocnění. Dostupné analýzy ze světa i naše vlastní v ČR potvrzují zásadní prodloužení dlouhodobého přežití nemocných s MM. Účinné léky u mnohočetného myelomu jsou dnes dostupné a hrazené ZP v primoléčbě (thalidomid, bortezomib) i v relapsu MM (včetně lenalidomidu). Jejich optimální začlenění do léčebných strategií je zásadní pro další zlepšování léčebných výsledků u mnohočetného myelomu. Úkolem nás lékařů, je naučit se nové léky správně indikovat a správně používat ve prospěch nemocných.

1591.

**Režim CTD v primoléčbě mnohočetného myelomu**

Ščudla Vlastimil, Hájek Roman, Gregora Evžen, Maisnar Vladimír, Pika Tomáš, Bačovský Jaroslav, Adam Zdeněk (*III. interní klinika LF UP a FN, Olomouc, Hematoonkologická klinika FN, Brno; Hematologické oddělení FN Královské Vinohrady, Praha; Hematoonkologická klinika FN, Hradec Králové*)

*Abstrakt nedodán*

1490.

**Záchrana ledvin kombinací bortezomib-doxorubicin-dexametazon (BDD) u nemocných s mnohočetným myelomem a vstupním akutním selháním ledvin. Výsledky klinické studie fáze II**

Adam Zdeněk, Zojer N., Greil R., Keil F., Thaler J., Lang A., Pour L., Krejčí M., Hájek R., Ludwig H. (*Interní hematoonkologická klinika LF MU a FN, Brno; Department of Medicine I, Wilhelminenspital, Vienna – Austria; Department of Internal Medicine III, Hospital Salzburg, Salzburg – Austria; Department of Internal Medicine and Intensive Care, Hospital Leoben, Leoben – Austria; Department of Internal Medicine IV, Hospital of Mercy Sisters, Wels – Austria; Department of Internal Medicine, Hospital Feldkirch, Feldkirch – Austria*)

Monoklonální imunoglobulin může způsobit akutní selhání ledvin. V počátku jsou změny v ledvině reverzibilní, rychlé snížení tvorby volných lehkých řetězců může zastavit další poškození ledviny a reparační pochody mohou částečně obnovit narušené funkce. Bortezomib v kombinaci s dexametazonem a adriamycinem mají velmi rychlý nástup léčebného účinku, pokles koncentrace monoklonálního imunoglobulinu bývá velmi strmý. Výhodou uvedené kombinace je také fakt, že farmakokinetika bortezomibu, dexametazonu a doxorubicinu není signifikantně závislá na funkci ledvin. V plánu klinické studie fáze II bylo zařadit celkem 70 pacientů. Při posledním hodnocení byly k dispozici údaje o 55 nemocných, renální léčebnou odpověď bylo možno vyhodnotit u 47 z nich. Celkem 79 % dostalo uvedenou léčbu v rámci léčby nově diagnostikovaného onemocnění, ostatní kombinaci BDD dostali v rámci léčby relapsu. Léčebná renální

odpověď byla definována na základě stadií funkce ledvin (glomerulární filtrace -GF) jak je definuje National Kidney Foundation (St. I = GF > 1,5 ml/sec, st. II = GF 1 – 1,49 ml/s, st. III = GF 0,5-0,99 ml/sec. st. IV = GF 0,25-0,49 ml/sec, st.V = GF < 0,25 ml/sec.) Renální CR byla definována dosažením GF > 1 ml/sec. Renální PR byla definována zlepšením GF o dva stupně, tedy ze stupně V do stupně III a ze stupně IV do stupně II. Renální MR byla definována jako zlepšení funkce ledvin o jeden stupeň. Jedenáct pacientů mělo selhání ledvin III st., z nich 6 (55 %) dosáhlo renální CR a 5 (45 %) renální PR. Dvacet tři pacientů mělo renální selhání IV. st., z nich 8 (35 %) dosáhlo renální CR, 8 (35 %) renální PR a 7 (30 %) renální MR. Třináct pacientů mělo renální selhání V. st., z nich 1 (8 %), dosáhl renální CR, 3 (23 %) renální PR a 3 (23 %) renální MR. Tři z 8 dialyzovaných nemocných se stali nezávislými na dialýze. Celkové přežití bylo ve 2 letech 72 % (intent to treat analysis) a 78 % ve skutečně hodnocené sestavě nemocných. U pacientů, kteří dosáhli renální CR, byl celkové přežití ve dvou letech 86 %, u pacientů, kteří nedosáhli renální CR, bylo celkové přežití ve dvou letech jen 76 %. Uvedená data dokumentují jednak velmi dobrý léčebný účinek této kombinace na bázi bortezomibu. Rovněž fakt, že renální léčebná odpověď je závislá na míře vstupního poškození. Výsledky potvrzují pozitivní přínos dosažení renální CR pro délku přežití. Klíčová slova: mnohočetný myelom, renální selhání, bortezomib.

1492.

#### **Optimalizace kombinovaných režimů s bortezomibem u starších pacientů s relabujícím mnohočetným myelomem v České republice**

Zahradová Lenka, Pour Luděk, Adam Zdeněk, Gregora Evžen, Schützová Miroslava, Koza Vladimír, Pavlíček Petr, Krejčí Marta, Sandecká Viera, Křivanová Andrea, Budková Jana, Buchtová Iva, Pelcová Jana, Králová Dana, Hájek Roman (*IHOK FN a LF MU, Brno; OKH FN Královské Vinohrady, Praha; Hematoonkologické oddělení FN, Plzeň; Česká myelomová skupina; Univerzitní výzkumné centrum – Česká myelomová skupina, MU, Brno*)

Úvod: Léčebné režimy založené na bortezomibu znamenají pro nemocné s mnohočetným myelomem větší šanci na dlouhodobé přežití. Zejména starší pacienti a nebo pacienti v horším klinickém stavu však často netolerují plné dávky bortezomibu a je nutné předčasně ukončit léčbu. V ČR jsme proto odzkoušeli režimy CVD (Cyklofosamid-Velcade(bortezomib)-Dexametazon) s redukovanou intenzitou pro nemocné starší 65 let nebo v horším klinickém stavu (CVD senior) a výsledky byly porovnány s režimem se standardní intenzitou pro nemocné mladší 65 let (CVD junior). Soubor pacientů a metody: Do analýzy bylo zahrnuto 71 pacientů (30xCVD senior, 41xCVD junior) léčených od února 2007 do prosince 2008 ve 3 centrech v ČR, kteří obdrželi alespoň 4 cykly léčby. Ve skupině CVD senior byl ve srovnání s CVD

junior vyšší věk pacientů – medián 71,1 (49,5-81,7) vs 60,0 let (44,3-77,7),  $p < 0,001$ ; trend k vyšší předlécenosti – počet předchozích léčebných linií: 1 linie-13,3% vs 31,7%/2 linie-63,3% vs 53,7%/3 a více linií -23,3% vs 14,6% ( $p=0,165$ ); trend k nižšímu Karnofski status (80 vs 90%,  $p=0,109$ ); trend k vyšší četnosti klinického stádia 3 dle ISS (37,5% vs 20,6%;  $p=0,118$ ). Medián follow-upu od začátku léčby byl 13,9 vs 9,1 měsíců ( $p=0,030$ ). Výsledky: Pro režimy CVD senior vs CVD junior byly základní výsledky následující: celková léčebná odpověď (ORR=CR+PR) 39,9% vs 64,9% ( $p=0,027$ ) zahrnující CR (3,6 vs 13,5%), VGPR (14,3 vs 16,2%) a PR (21,4 vs 25,1%); léčebná odpověď SD 53,6% vs 21,6%, progresse 7,1% vs 13,5%. V mediánech parametrů přežití nebyl prokázán významný rozdíl (TTP/PFS 8,9 vs 11,3 měsíců, OS od začátku léčby 12,3 vs 16,3 měsíců, DOR 7vs10,3 měsíců). Počet nežádoucích účinků st. 3-4 nebyl odlišný ( $p=0,301$ ), ale ve skupině CVD senior nebyly pozorovány NÚ st. 4 (0 vs 18,5%). Dávka bortezomibu byla ve skupině CVD senior redukována méně (6,7% (2/30) vs 26,8% (11/41)), počet podaných cyklů byl obdobný (medián 5.2 vs 5.1;  $p=0,86$ ). Závěr: Tolerance CVD režimu s redukovanou intenzitou staršími pacienty je obdobná jako jako tolerance režimu v plných dávkách mladšími pacienty. Ve skupině CVD senior však nebyly pozorovány nejzávažnější NÚ stupně 4. Léčebná účinnost 40% u významně předlécených nemocných je uspokojivá. Je zjevné, že i starší nemocní s horším status performance mohou mít z nových léků přínos, intenzita původních režimů však musí být vhodně modulovaná. Redukovaný režim CVD senior je takovou léčebnou možností s vyváženým poměrem účinnosti a toxicity. Podpořeno grantem IGA NR9225-3.

1543.

#### **Dosavadní zkušenosti s léčbou lenalidomidem v České republice**

Pour Luděk, ŠtudlaVlastimil, Maisnar Vladimír, Gregora Evžen, Schützová Miroslava, Špička Ivan, Holánek Michal, Bačovský Jaroslav, Straub Jan, Adam Zdenek, Hájek Roman (*IHOK FN, Brno; III. Interní klinika FN, Olomouc; OKH FN, Hradec Králové; OKH FN Královské Vinohrady, Praha; OKH FN, Plzeň; I. Interní klinika VFN, Praha*)

Úvod: Lenalidomid (Revlimid) patří mezi imunomodulační látky známé jako IMiDy, látky strukturou příbuzné thalidomidu. Limitující toxicitou při léčbě lenalidomidem je myelosuprese, avšak lék nezpůsobuje nepříjemnou neuropatii na rozdíl od thalidomidu a bortezomibu. U nemocných s mnohočetným myelomem (MM) byla v klinických studiích prokázána vysoká účinnost tohoto léku v primoléčbě i u relabovaných nemocných. V České republice je lenalidomid používán u relabovaných nemocných mimo klinické studie od roku 2008. Tato práce přináší analýzu léčebné účinnosti a nežádoucích účinků u nemocných s MM léčených lenalidomidem v prvním roce jeho používání v šesti referenčních centrech CMG



v České republice (Brno, Hradec Králové, Olomouc, Plzeň, Praha VFN a FN KV). Soubor pacientů: Od května 2008 do konce roku 2008 léčeno v ČR kombinovaným režimem s lenalidomidem a kortikoidy celkem 36 nemocných. Jednalo se o 23 mužů a 13 žen, průměrný věk nemocných při zahájení léčby činil 66 let. Nemocní byli významně předléčení (2-4 relaps), část nemocných byla refrakterních na dostupnou léčbu a všichni nemocní byli předléčení bortezomibem (Velcade). Výsledky: Data jsou předčasná a pro potřebu prezentace budou analyzována data pacientů léčených do konce roku 2008 se sledováním k 31.3.2009. Jde o významně předléčené nemocné a u řady z nich byla pozorována menší tolerance a především větší hematologická toxicita než bylo pozorováno v klinických studiích. Přestože se v našem souboru pacientů jedná o prognosticky velmi nepříznivé nemocné s de facto vyčerpanými léčebnými možnostmi při použití do té doby dostupné terapie, byla pozorováno vysoké procento léčebných odpovědí. Závěr: Lenalidomid (Revlimid) se zařadil díky své účinnosti mezi tři nejpotřebnější léky u mnohočetného myelomu v současnosti. Naše zkušenosti potvrzují jeho vysokou účinnost u relabovaných těžce předléčených nemocných s MM.

### 1391.

#### **Terapie fulminantní progresse mnohočetného myelomu: up-front melfalan 100 mg/m<sup>2</sup> s podporou autologního štěpu a konsolidace novými léky**

Krejčí Marta, Adam Zdeněk, Křivanová Andrea, Pour Luděk, Zahradová Lenka, Sandecká Viera, Mayer Jiří, Vorlíček Jiří, Hájek Roman (*Interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice, Brno*)

Úvod: Pacienti s fulminantní progresí (FPG) mnohočetného myelomu (MM) po autologní transplantaci mají špatnou prognózu. Často je přítomna pancytopenie, dále renální insuficience či extramedulární relaps; léčebné možnosti jsou limitovány. Jednou z terapeutických alternativ u nemocných, kteří mají k dispozici štěp autologních krvetvorných buněk (AKB), je podání melfalanu 100 mg/m<sup>2</sup> (MEL 100) s podporou AKB jako záchranného režimu, který může pozastavit rychlou progresi MM a vytvořit tak časový prostor pro konsolidaci kombinovaným režimem s novými léky (thalidomid nebo bortezomib). Metody: Retrospektivně bylo zhodnoceno 31 pacientů s fulminantní progresí MM, kteří byli léčeni MEL 100 s podporou AKB a následně konsolidační chemoterapií s novými léky (thalidomid + cyklofosfamid + dexametason v 16 případech, bortezomib + cyklofosfamid + dexametason u 15 pacientů). Fulminantní progresse MM byla specifikována jako rychlá progresse MM během 4-8 týdnů s jedním z těchto rysů: periferní pancytopenie při myelomové infiltraci kostní dřeně, nově přítomnost extramedulární nemoci, nově renální insuficience. Základní charakteristiky pacientů byly následující: medián věku 58 let; medián předchozích linií terapie 1 (rozpětí 1-3); klinická stádia dle ISS: stádium 1 – 22 % (7/31), stá-

dium 2 -39 % (12/31), stádium 3 – 39 % (12/31). Extramedulární progresse MM byla přítomna u 32 % nemocných (10/31), renální insuficience u 22 % (7/31), výrazná infiltrace kostní dřeně s periferní pancytopenií u 52 % (16/31). Výsledky: Nebylo zaznamenáno žádné úmrtí v souvislosti s podáním MEL 100. Medián doby do vstupu neutrofilů nad 0,5 x 10<sup>9</sup>/l byl 11 dní. Mukositida stupně 3-4 byla přítomna u 29 % nemocných (9/31), febrilní neutropenie byla zaznamenána u 39 % pacientů (12/31). Celková léčebná odpověď (ORR) byla 58 % (18/31), z toho CR 3 % (1/31), VGPR 26 % (8/31), PR 29 % (9/31). Medián počtu podaných cyklů konsolidační chemoterapie byl 4 (rozpětí 1-6). Rychlá progresse MM do tří měsíců od podání MEL 100 se objevila u 35 % pacientů (11/31). Medián doby do progresse (TTP) byl 5 měsíců (rozpětí 2-15), medián celkového přežití (OS) byl 8 měsíců (rozpětí 3-23). Závěr: Fulminantní progresse MM má obvykle fatální průběh. MEL 100 up-front je bezpečný záchranný režim s dobrou efektivitou (ORR 58 %) a akceptovatelnou toxicitou. Tato léčebná strategie v kombinaci s konsolidační obsahující nové léky může prodloužit celkové přežití nad 12 měsíců u 33 % pacientů s tímto nepříznivým typem MM.

### 1375.

#### **Perkutánní kyfoplastika v léčbě osteolytického postižení obratlů u pacientů s mnohočetným myelomem**

Šmardová Lenka, Neubauer Jiří, Pour Luděk, Veselá Martina, Navrátil Milan, Chaloupka Richard, Adam Zdeněk, Hájek Roman, Válek Vlastimil, Mayer Jiří (*Interní hematologická klinika FN a LF MU, Brno; Radiologická klinika FN a LF MU, Brno; Ortopedická klinika FN a LF MU, Brno*)

Úvod: Perkutánní kyfoplastika (PK) je minimálně invazivní intervenční výkon, mezi jehož hlavní indikace patří osteoporotická zlomenina nebo nádorové postižení obratle. Principem metody je aplikace hutného kostního cementu (polymethylmetakrylát) do obratlového těla po vytvoření kavity speciálním instrumentáři. Vedle zpevnění struktury obratlového těla dochází k rychlému analgetickému efektu a metoda tak představuje vhodné doplnění systémové léčby. Cíl: Retrospektivní zhodnocení postavení perkutánní kyfoplastiky v léčbě osteolytického postižení obratlů u pacientů s mnohočetným myelomem. Materiál a metody: Od 5/2005 do 8/2008 jsme ve spolupráci s RDK FN Brno ošetřili perkutánní kyfoplastikou 14 obratlových těl postižených kompresivní frakturou u celkem 8 pacientů s mnohočetným myelomem. Medián věku pacientů byl 61 let (53-67). Výkon byl proveden v celkové anestézii v pronační poloze pod skiaskopickou kontrolou. U vyšetřovaného souboru jsme sledovali analgetický efekt metody pomocí subjektivního hodnocení (vizuální analogová škála - VAS v rozmezí 0-10) a obnovení výšky obratle jsme hodnotili měřením přední, střední a zadní části jeho těla na prostém snímku páteře před, po výkonu a za 6 měsíců. Výsledky: U všech paci-

entů došlo ke statisticky signifikantnímu ( $p < 0,01$ ) ústupu bolesti se snížením VAS z průměrné maximální hodnoty 5,6 předoperačně na 2,5 za 3 měsíce resp. 1,2 za 6 měsíců od výkonu. Zvednutí výšky obratlového těla bylo dosaženo u 12 ze 14 ošetření (85,7%). Pouze u velikosti střední části obratle došlo k signifikantnímu zvýšení ( $p < 0,05$ ), v průměru o 5 mm. U všech pacientů byla snížena potřeba analgetik a to téměř bezprostředně po výkonu. Jedinou komplikací byl asymptomatický únik kostního cementu během 4 výkonů (28,6%), při mediánu doby sledování celého souboru 20,5 měsíců jsme nezaznamenali žádnou pozdní komplikaci. Závěr: Naše zkušenosti podporují analgetickou účinnost a bezpečnost provedení perkutánní kyfoplastiky u pacientů s mnohočetným myelomem.

**STEM CELLS/CELL CYCLE/  
/DIFFERENTIATION  
(2<sup>ND</sup> SYMPOSIUM ON ADVANCES  
IN MOLECULAR HEMATOLOGY)**

**1569.**

**Consequences of amplified centrosomes  
in mice and men**

Krämer Alwin, Marhold Joachim, Miyazaki Tatsuhiko, Heilig Christoph, Gröne Hermann-Josef, Jauch Anna, Löffler Harald (*Clinical Cooperation Unit Molecular Hematology/Oncology, German Cancer Research Center and Department of Internal Medicine V, University of Heidelberg, Heidelberg – Germany; Department of Cellular and Molecular Pathology, German Cancer Research Center, Germany; Institute of Human Genetics, University of Heidelberg, Heidelberg – Germany*)

Centrosomes are the major microtubule organizing centers of animal cells and facilitate the formation of bipolar mitotic spindles. Centrosome aberrations occur in virtually all human malignancies and have been associated with clinical aggressiveness of the tumors and genomic instability due to aberrant cell division. Since about 100 years ago Theodor Boveri initially proposed that centrosome amplification leads to tumor formation, it has been a constant matter of debate whether centrosomal aberrations are a cause or a consequence of malignant transformation. To study the contribution of centrosome abnormalities in vivo, we generated mice overexpressing pericentrin, a pericentriolar matrix protein whose overexpression results in centrosome amplification and mitotic spindle defects in vitro. We show that overexpression of pericentrin in mice leads to centrosome amplification, mitotic aberrations and chromosomal instability in vivo. Notably, these mice develop a fatal hematological disorder recapitulating human myelodysplastic syndrome (MDS), including peripheral blood cytopenias, bone marrow dysplasia, and apoptosis. At an age of four months the mice start to die from severe anemia and leucopenia as a result of progressive MDS. Myeloid progenitor cells from

the bone marrow of these mice display numerical chromosome aberrations and a high level of apoptosis. Mouse embryonic fibroblasts from pericentrin transgenic mice harbour supernumerary centrosomes and display mitotic spindle aberrations. Importantly, centrosome aberrations have been described to occur in both human MDS and AML cells and correlate with karyotype abnormalities and prognosis in these disorders. Moreover, we have found that chromosomal instability, defined as an elevated rate of the occurrence of novel chromosomal aberrations, in human CD34+ hematopoietic progenitor cells correlates with poor outcome and progression to AML in patients with MDS. In addition to the bone marrow findings, gross testicular abnormalities including aberrant cell divisions, multinuclearity and apoptosis were found in pericentrin overexpressing mice. Taken together, these findings demonstrate that pericentrin overexpression induces mitotic spindle abnormalities and chromosomal instability in rapidly dividing tissues in vivo, suggesting a mechanism leading to ineffective haematopoiesis and implicating centrosomal and mitotic spindle aberrations in tumorigenesis and MDS pathogenesis.

**1589.**

**Abnormal metabolism of centrosomes – risk to  
genomic stability of human embryonic stem cells**

Hampl Aleš, Holubcová Zuzana, Sedláčková Miroslava, Dvořák Petr (*Institute of Biology, Institute of histology and embryology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno*)

Human embryonic stem cells (hESC) are immature cells derived from human blastocyst-stage embryos that can be indefinitely propagated in culture and can also differentiate into all mature cell types with special function. Due to such properties these pluripotent cells represent promising tool for cell replacement therapy of wide variety of human diseases. Importantly, several studies have recently reported accumulation of various types of alterations to DNA of hESC including gross chromosomal abnormalities, which are prospective obstacles to any use of hESC in regenerative medicine. Chromosomal instability of various cancer cell lines is believed to be linked to centrosomal defects, as extra centrosomes may organize multipolar mitotic spindles that lead to chromosome missegregation. We have recently found that non-differentiated hESC cultured in vitro display high frequency of numerical centrosomal abnormalities compared to their differentiated counterparts. Incidence of multi-centrosomal mitoses becomes reduced upon prolonged cultivation and/or entry into differentiation pathway, as well as by enhanced quality of culture surface. Frequency of extra centrosomes becomes also reduced upon chemical inhibition of unrestrained activity of CDK2, key molecule for initiation of centrosomal duplication. Since all examined overamplified centrosomes comprise complete pair of centrioles, we suggest that extra centrosomes

originate from multiple rounds of duplication rather than centrosomal fragmentation and/or failure of cytokinesis. As Aurora A, the kinase that is normally responsible for centrosome separation, mitotic entry, and spindle pole assembly, is overabundant in hESC, we hypothesize that highly active Aurora A forces overamplified centrosomes to form defective mitotic spindles. 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. Supported by: 204/09/2044, MSM0021622430, AV0Z50390512, AV0Z50390703, 1M0538, LC06077, LSHG-CT-2006-018739.

**1450.**

**DNA damage-induced Cdc25A degradation in mouse embryonic stem cells is regulated by glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ )**

Koledová Zuzana, Rašková-Kafková Leona, Krämer Alwin, Divoký Vladimír (*Department of Biology, Faculty of Medicine, Palacky University, Olomouc; Clinical Cooperation Unit for Molecular Hematology/Oncology, German Cancer Research Center (DKFZ) and Department of Internal Medicine V, University of Heidelberg, Heidelberg – Germany; Department of Biology, Faculty of Medicine, Palacky University and Department of Hemato-oncology, Palacky University and University Hospital, Olomouc*)

Embryonic stem cells (ESCs) are rapidly proliferating cells derived from inner cell mass of mammalian blastocysts. Besides their pluripotency and immortality, they have a unique cell cycle structure with a very short G1 phase without functional G1 checkpoint. Last year, at this meeting, we presented results of our study of G1 checkpoint non-functionality in mouse (m) ESCs. We showed that mESCs do not arrest in G1 after DNA damage because of persistent activity of cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2). Furthermore, we suggested that Cdk2 activity might be refractory to changes of activity of its regulator Cdc25A phosphatase due to their spatial separation, with Cdk2 being sequestered on centrosomes. Our study of Cdk2 and its regulator Cdc25A in mESCs has continued. It revealed that Cdc25A is not regulated by Chk1 and Chk2, as it is in somatic cells, because of centrosomal sequestration of these kinases. Using a chemical inhibition approach we show that Cdc25A degradation in mESCs after DNA damage is regulated by glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ). In summary, we propose a novel mechanism of cell cycle regulation by aberrant localization of cell cycle regulatory proteins and a novel role for GSK-3 $\beta$  in G1 checkpoint. This work was supported by grants NR/9508 (Ministry of Health), MSM 6198959205 and 2B06077 (Ministry of Education, Youth and Sport, Czech Republic) and by the Deutsche Krebshilfe.

**1376.**

**Computer assisted image nucleolar and cytoplasmic RNA densitometry**

Smetana Karel, Jirásková I., Mikulenková H., Klamová H. (*Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague*)

Since quantitative information on the nucleolar and cytoplasmic RNA concentration in differentiating and maturing blood cells is very limited, the present study was undertaken to provide additional data on that topic in differentiating cells of the erythroid lineage in situ. The satisfactory number of erythroblasts in bone marrow of patients suffering from the chronic phase of chronic myeloid leukaemia without a large increase in the granulocytic to erythroid ratio facilitated computer assisted image RNA density measurements in both nucleoli and cytoplasm at the single cell level. As expected, the measurements indicated a significant decrease of the nucleolar and cytoplasmic RNA concentration only in advanced stages of erythroblast differentiation. The resulting ratio of the nucleolar to cytoplasmic RNA concentration was very stable and did not change during differentiation, being similar in the early and advanced stages of erythroblastic development. Thus the marked similarity of the nucleolar to cytoplasmic RNA concentration indicated a “symmetric decrease” of the RNA concentration during the erythroblastic differentiation. Such phenomenon might be related not only to the nucleolar RNA transcription but also to its transport and cytoplasmic consumption. However, no such symmetry of the nucleolar and cytoplasmic RNA decreasing concentration in differentiating cells has been reported and apparent on the basis of quantitative computer assisted image densitometry at the single cell level. Other approaches for the study of differentiating human erythroblasts in bone marrow biopsies would be very difficult or impossible. In addition, the marked decrease in the nucleolar diameter in differentiating erythroblasts and the stability of the nucleolar RNA concentration suggest that the amount of RNA in the nucleolus of differentiating erythroblasts is closely associated with nucleolar size rather than with its concentration within the nucleolar body.

**CLL2**

**1534.**

**Transformácia CLL a stavy predchádzajúce a/alebo imitujúce transformáciu: možnosti a limity bioprotickej diagnostiky**

Balhárek Tomáš, Szépe Peter, Marcinek Juraj, Plank Lukáš (*Ústav patologickej anatómie a Konzultačné centrum bioprotickej diagnostiky ochorení krvotvorby JLF UK a MFN, Martin-SR*)

Transformácia je významná komplikácia CLL asociovaná so zlou prognózou, ktorá si vyžaduje osobitný diagnosticko-terapeutický prístup. Incidencia transformácie CLL je



v závislosti od zvolených kritérií 3-15%. Vznik sekundárního agresivního lymfómu v teréne preexistujúcej CLL sa označuje Richterov syndróm (RS). Najčastejšie (v 2-8%, reálne <3% CLL) ide o vznik difúzneho veľkobunkového B-lymfómu (DLBCL), t.j. tzv. klasický RS. Zriedkavejší je vznik klasického Hodgkinovho lymfómu (cHL), t.j. tzv. Hodgkinov variant RS (0,5-2%, reálne <1% CLL). Niektorí autori termínom RS označujú aj prolymfocytovú a iné raritné alebo kontroverzné transformácie (napr. do ALL alebo plazmocytómu). Z biologického (ale nie klinického) hľadiska je dôležité, či sekundárny lymfóm vznikol klonálnou evolúciou CLL (skutočná transformácia) alebo ide o klonálne nepríbuzný proces (kompozitný resp. kolízny lymfóm). Kľúčovú úlohu v diagnostike transformácie zohráva bioptické vyšetrenie. CLL je však známa značnou morfológickou variabilitou. Rastová aktivita vychádza z proliferáčnych centier (pseudofolikulov, PSF). Morfológická variabilita PSF v LU nekoreluje s klinickým priebehom. V tkanive LU sa pomerne často stretávame s obrazom zvýšenej rastovej aktivity, ktorá môže byť vystupňovaná až do obrazu tzv. akcelerovanej CLL. Tá je v zásade morfológicky konzistentná s ďalšou spornou entitou označovanou ako paraimunoblastový variant CLL. Paraimunoblastový variant je pritom morfológicky ťažko odlíšiteľný od počínajúcej transformácie do DLBCL. Nález transformácie v kostnej dreni je zriedkavý (<10%). V KD je potrebné odlíšiť stavy so zvýšenou proliferáčnou aktivitou a zvýšeným podielom menej zreých elementov (napr. v prípadoch s del17p) od skutočného RS. Del17p je ale zároveň rizikovým faktorom vzniku RS. Pri transformácii do cHL je nutné odlíšiť nález HRS-buniek v zodpovedajúcom „hodgkinovskom“ pozadí od prípadov s HRS-bunkami rozptýlenými len na pozadí CLL. Bolo však potvrdené, že aj časť týchto prípadov môže transformovať do cHL. V súvislosti s CLL so zvýšeným podielom prolymfocytov treba pripomenúť, že nová WHO klasifikácia (2008) už neuvádza koncepciu atypickej CLL. Vzhľadom k terminologickým a diagnostickým nejasnostiam je problematickou aj bioptická diagnostika prolymfocytovej transformácie. Uvedené stavy poukazujú na limity bioptickej diagnostiky transformácie, pretože môžu byť príčinou jej nad- alebo poddiagnostikovania. Podporené Grantom MZ SR č. 2005/12-MFN-04 a Grantom VEGA 1/4285/07.

**1380.**

**Nové prognostické faktory chronické lymfocytárnej leukémie (CLL) v každodenní hematologické praxi**  
**Multicentrická analýza**

Doubek Michael, Cmunt Eduard, Schwarz Jiří, Brejcha Martin, Pospíšil Zdeněk, Kozmon Petr, Brychtová Yvona, Pospíšilová Šárka, Cetkovský Petr, Trněný Marek, Mayer Jiří (*Interní hematologická klinika LF MU a FN, Brno; VFN, Praha; ÚHKT, Praha; Onkologické centrum, Nový Jičín; Přírodovědecká fakulta MU, Brno; FN, Brno*)

Úvod. Představy o prognostických faktorech a patogenézi CLL se během posledního desetiletí významně změ-

nily. Na druhou stranu ale indikační kritéria pro zahájení léčby CLL se stále opírají o konvenční hematologické a klinické nálezy. Kromě toho metody používané k detekci nových prognostických faktorů nejsou standardizovány a není také jasné, kdy by měly být tyto faktory u nemocných s CLL vyšetřovány. Přesný význam nových prognostických faktorů tak u CLL není stále známý. Cíl a metody. Retrospektivní analýza vlivu klasických a nových prognostických faktorů na celkové přežití (OS) pacientů s CLL. Analyzována byla data všech nemocných zařazených do databází 4 hematologických center. Výsledky. Analyzována byla data od 1146 pacientů (medián věku 61 let, 32-90; pohlaví: 707 muži, 439 ženy). Medián sledování byl 53 měsíců (1-362). Medián OS všech pacientů byl 180 měsíců. Po vyloučení nemocných, kteří zemřeli na jinou nemoc než CLL, byl medián OS 233 měsíců. Léčba CLL byla indikována u 353 nemocných (31%). Pomocí uniparametrické analýzy bylo zjištěno, že negativní vliv na OS měly: pokročilé stadium podle Raie (II-IV) ( $p < 0.001$ ), nemutovaný IgVH ( $p < 0.001$ ), del/mut p53 ( $p < 0.001$ ), ať už byla hranice positivity 5% nebo 20%, a zvýšená exprese CD38 ( $p = 0.01$ ). Naopak významný vliv na OS nebyl prokázán u +12, del ATM, del RB1 a cZAP70. Nemocní s nemutovaným IgVH, del/mut p53, del ATM, +12, cZAP70+ a CD38+ byli léčeni významně víc než pacienti bez těchto změn. Multiparametrická analýza ukázala, že OS bylo významně ovlivněno pohlavím (muži mají horší prognózu než ženy;  $p = 0.02$ ), věkem ( $p = 0.04$ ), stavem IgVH ( $p = 0.03$ ) a del/mut p53 ( $p = 0.007$ ). Když jsme z analýzy vyřadili nemocné, kteří zemřeli na jinou nemoc než CLL, statisticky významný vliv na OS si zachovala jen del/mut p53 ( $p = 0.004$ ). Závěry. Podle naší analýzy je funkce genu p53 jediným faktorem, který za každých okolností signifikantně ovlivňuje OS pacientů s CLL. Tento marker má silný prediktivní význam dokonce i u neselektované skupiny pacientů z "reálného hematologického života". Role dalších faktorů je u této skupiny nemocných daleko méně významná, což je možná dáno i novými efektivními léčebnými postupy. Podpořeno částečně Českou leukemickou studijní skupinou pro život (CELL), výzkumným záměrem MSM 0021622430 a grantem IGA NR9293-3/2007.

**1540.**

**Pacienti s B chronickou lymfatickou leukémií s prokázanou mutací genu V3-21 mají variabilní klinický průběh v závislosti na mutačním stavu IgVH a přítomnosti cytogenetických změn**

Urbanová Renata, Turcsányi Peter, Procházka Vít, Plachý Radek, Papajík Tomáš, Indrák Karel, Jarošová Marie (*Hematologická klinika FN, Olomouc*)

Úvod. Mutační stav IgVH je nezávislý prognostický faktor u pacientů s B chronickou lymfatickou leukémií (B CLL). Mnohé práce dokumentují, že pacienti se vzácnou mutací genu V3-21 mají klinicky nepříznivý průběh onemocnění nezávisle na mutačním stavu IgVH. Cíl: Analy-

zovat soubor pacientů s B CLL s nálezem mutace V3-21 sledovaných a léčených na Hemato onkologické klinice FN Olomouc, popsat klinický průběh jejich onemocnění a přežití těchto pacientů v závislosti na ostatních prognostických faktorech. Metody: Mutační stav IgVH byl analyzován u 352 pacientů s B CLL, kteří byli diagnostikováni dle NCI-WG kritérií. Genová mutace V3-21 byla popsána u 22 z celkového počtu 352 vyšetřených pacientů, tj u 6%. 12 pacientů mělo mutovaný stav IgVH tj. 55%. FISH analýza byla provedena u 19 z 22 pacientů souboru, vysoce rizikové abnormality 17p- nebo 11q- byly detekovány u 8 z 19 pacientů, tj. u 42%. Medián věku při diagnóze byl 66 let, v rozmezí 36-76 let. Rozdělení pacientů do klinických stádií bylo rovnoměrné, Binet A 32%, Binet B 36%, Binet C 32%. Terapii pro aktivitu onemocnění podstoupilo 18 z 22 pacientů, 82%. Medián sledování pacientů byl 54 měsíců, 9 pacientů (41%) zemřelo. Výsledky: 7 leté přežití (OS) je 61% (95% CI 0.35-0.87). Přežití bez léčby po 2 letech bylo 39% (95% CI 0.16-0.61). Prodloužení intervalu bez léčby je asociováno s mutovaným stavem IgVH a s absencí nepříznivých cytogenetických změn. Pacienti bez 17p- nebo 11q- mají delší přežití (OS ve 3 letech je 90%) oproti pacientům s přítomností 17p- nebo 11q- (OS ve 3 letech 57%). Pacienti s mutovaným stavem IgVH vykazovali tendenci k delšímu celkovému přežití (OS v 7 letech 72% oproti 40%, log rank 0,09). Nebyla nalezena korelace mezi přítomností 17p- nebo 11q- a mutačním stavem IgVH. Závěr: Pacienti s mutací genu V3-21 nevykazovali stejný klinický průběh onemocnění. Přežití a zahájení léčby bylo ovlivněno přítomností nepříznivých cytogenetických změn a mutačním stavem IgVH. Aktuálně používané vyšetření FISH a vyšetření mutačního stavu také u pacientů s B CLL s mutací genu V3-21 neztrácí svoji prediktivní roli. Podpořeno grantem MSM 6198959205 a grantem IGA NR 9484.

#### 1417.

##### **Fludarabin, cyklofosfamid a rituximab (FCR) v 1. linii léčby chronické lymfocytární leukémie (CLL): retrospektivní analýza České CLL skupiny**

Smolej Lukáš, Lysák Daniel, Šálková Jana, Papajík Tomáš, Brejcha Martin, Vozobulová Věra, Karban Josef, Hrudková Monika, Cmunt Eduard, Turcsanyi Peter, Jungová Alexandra, Krejčová Hana, Trněný Marek (*II. interní klinika OKH, FN a LF UK, Hradec Králové; Hematologicko-onkologické oddělení, FN Plzeň; I. interní klinika, VFN Praha, HOK FN Olomouc; Hematologické oddělení, Onkologické centrum J.G. Mendela, Nový Jičín; OKH FN Plzeň*)

Kombinace fludarabinu, cyklofosfamid a rituximabu (FCR) je nyní považována za léčbu volby v 1. linii u „fit“ nemocných s chronickou lymfocytární leukémií (CLL) na základě výsledků studie CLL-8. Vyšší dávka rituximabu (500 mg/m<sup>2</sup> od 2. cyklu) použitá ve studii CLL-8 je však zcela empirická a optimální dávkování rituximabu u CLL není známo. Je také omezené množství dat

o použití režimu FCR v běžné praxi. Z těchto důvodů provedla Česká skupina pro chronickou lymfocytární leukémii retrospektivní analýzu účinnosti a bezpečnosti protokolu FCR v 1. linii léčby CLL. Od října 2002 do května 2008 bylo v 5 centrech spolupracujících v rámci ČSCLL léčeno 107 nemocných s aktivním CLL režimem FCR (68 % mužů, medián věku 60 let [rozmezí 27-75]). Byly použity běžné dávky fludarabinu (25 mg/m<sup>2</sup> i.v. nebo 40 mg/m<sup>2</sup> p.o. D1-3) a cyklofosfamid (250 mg/m<sup>2</sup> i.v. nebo p.o. D1-3). Rituximab byl podán 1.den v dávce 375 mg/m<sup>2</sup> ve všech cyklech u 87 nemocných či v dávce 500 mg/m<sup>2</sup> od 2.cyklu (n=20). Nízké/střední/vysoké riziko dle Raie bylo přítomno u 1/72/27 %. IgVH geny byly nemutované u 74 % nemocných; del 13q byla zjištěna u 31 %, trisomie 12 u 9 %, del 11q u 26 % a del 17p u 8 % nemocných. Medián sledování byl 22,3 měsíce. Medián podaných cyklů byl 5. Celková odpověď/kompletní remise (ORR/CR) byly dosaženy v 95/47 %. Medián období bez progresu (PFS) byl 30 měsíců; medián celkového přežití nebyl dosažen. Nemocní s nemutovanými IgVH geny měli významně kratší PFS (p=0,0051). Nízký počet nemocných v jednotlivých podskupinách aberací FISH neumožnil smysluplnou analýzu. Čtyři ze sedmi nemocných s del 17p odpověděli na léčbu (1x CR, 3x PR). Nemocní léčení dávkou rituximabu 375 mg/m<sup>2</sup> měli srovnatelné ORR, CR and PFS v porovnání s těmi léčenými dávkou 500 mg/m<sup>2</sup> (p=0,79, p=0,24 a p=0,65). Neutropenie III./IV. stupně byla zjištěna u 22/14 % podaných cyklů, trombocytopenie III./IV. stupně u 5/3 % cyklů. Závažné infekce se objevily v 1 % cyklů. Granulocytární růstový faktor byl podán u 54 % a erytropoetin u 13 % nemocných. Uzačínáme, že léčba CLL režimem FCR v 1. linii použitá v podmínkách běžné praxe je vysoce účinná navzdory nepříznivým prognostickým faktorům přítomným u většiny nemocných. Toxicita byla přijatelná. Další studie jsou potřebné k zodpovězení otázky, zda použití nižší dávky rituximabu má stejnou léčebnou účinnost jako 500 mg/m<sup>2</sup>. Podpořeno grantem MSM 0021620808 Ministerstva školství a výzkumným záměrem MZO 00179906 Ministerstva zdravotnictví České republiky.

#### 1550.

##### **Reaktivace CMV u nemocných léčených alemtuzumabem (CAM) na IHOK LF MU a FN Brno v letech 2003 -2008**

Ráčil Zdeněk, Tošková Martina, Winterová Jana, Lengeřová Martina, Volfová Pavlína, Weinbergerová Barbora, Mayer Jiří (*Interní hematologická klinika LF MU a FN, Brno*)

Úvod: Virové infekce jsou nejčastější komplikací doprovázející th. CAM. Absolutní většinu z těchto infekcí pak představuje reaktivace CMV. Součástí terapie CAM je proto profylaxe CMV a nebo preemptivní přístup spočívající v pravidelném monitoringu CMV (PCR nebo antigenémie) a zahájení účinné terapie při nárůstu virové nálože. Cíle a metody: Retrospektivní analýza frekvence re-

aktivace CMV detekované pomocí PCR (kvalitativní PCR do roku 2005 a kvantitativní real-time PCR od roku 2005) u pac. léčených CAM na IHOK v letech 2003-2008, identifikace velikosti virové nálože, klinického obrazu, zvolené terapie a léčebné odpovědi. Výsledky: Ve sledovaném období bylo léčeno CAM 98 pac. Ve většině případů ( $n = 72$ ; 73%) byl CAM podáván již předléčeným pac. K CMV reaktivaci došlo u 21 (22%) z 98 pac. Procento reaktivací se nelišilo u CAM primoterapie ve srovnání s předléčenými pac. (23% vs. 21%), nicméně pouze 50% pac. v primoléčbě mělo kvantitativní monitoring CMV a po retrospektivním přešetření vzorků byl medián počtu kopií CMV u těchto pac. pouze 208 ve srovnání s 86% kvantitativního monitoringu u předléčených pac. s mediánem kopií CMV 1006. Frekvence reaktivací byla výrazně vyšší v letech 2003-2005 (kvalitativní PCR) než mezi roky 2006-2008 (kvantitativní PCR) – 48% vs. 15%. Retrospektivním přešetřením vzorků bylo zjištěno, že počet kopií při kterých byla zahajována terapie CMV v prvním období, byl významně nižší než tomu bylo v letech 2006-2008 (228 vs. 1157). K reaktivaci docházelo nejčastěji v 4. týdnu th. CAM a to po aplikaci 283 mg CAM (medián). 71% případů CMV probíhal pod obrazem pouhé reaktivace a nebo CMV infekce (19%). Pouze v jednom případě (5%) došlo k rozvoji susp. CMV choroby a v jednom případě (5%) šlo o primoinfekci CMV. 40% pac. bylo léčeno ganciklovirem, 24% valganciklovirem, 24% ganciklovirem a následně foskarnetem a 12% pouze foskarnetem. Efekt antivirové th. podávané s mediánem 15 dnů byl promptní a u všech pac. došlo k poklesu virové nálože prakticky do nulových hodnot. Závěr: CMV infekce je sice nejčastější komplikací při terapii CAM, nicméně její průběh a tak i závažnost je odlišná od pac. po alogenní HSCT. Kvantifikace virové nálože je zásadní pro správné rozhodnutí o přístupu k CMV reaktivaci při th. CAM (přerušeni th. vs. pokračování th. CAM; th. antivirovoty vs. přerušeni CAM a pouze observace). Mezilaboratorní srovnání PCR metodik a konsensus mezi pracovišti umožní výrazné snížení rizika "overtreatmentu" CMV při th. CAM.

#### 1480.

#### Význam délky telomér a porovnanie s molekulárne cytogetickými metodami u pacientov s B-CLL

Izáková Silvia, Březinová Jana (ÚHKT, Praha)

Úvod. Chronická B-lymfatická leukémia (B-CLL) je lymfoproliferatívne nízkomalignné ochorenie s variabilným klinickým priebehom. Pozornosť sa venuje novým prognostickým faktorom s cieľom presnejšieho určenia rizika a nepriaznivej prognózy. Na základe posledných štúdií sa medzi tieto markery radí aj stanovenie dĺžky telomér meraním terminálneho repetičného fragmentu (TRF). Naším cieľom bolo vyhodnotenie dĺžky telomér v skupine chorých s B-CLL a následné porovnanie s výsledkami molekulárne cytogetickej analýzy chromozómových aberácií, mutačného stavu IgVH génu a expsie ZAP-

70 a CD38. Metódou Interfáznu fluorescenčnou in situ hybridizáciou (I-FISH) sme analyzovali vzorky periférnej krvi od 77 pacientov s B-CLL (40 mužov, 37 žien, priemerný vek 67 rokov). K analýze cytogetických aberácií sme použili panel DNA sond: CLL Probe panel pre regióny 13q14.3;13q34;17p13.1;11q22.3 12p11.1-q11 (Abbott-Vysis) a DNA sondu k detekcii prestavby oblasti 14q32 (Abbott-Vysis, Kreatech). Dĺžka telomér bola meraná metódou terminálneho repetičného fragmentu TRF (TeloTAGGG Telomere Length Assay kit). Na detekciu telomerázovej aktivity bol použitý TeloTAGGG Telomerase PCR ELISAPLUS kit, k určení mutačného stavu IgVH génu sme použili metódu PCR „touch down“. Výsledky. Pre štatistické vyhodnotenie závislosti dĺžky telomér a cytogetického nálezu sme pacientov rozdelili do 3 skupín: s dobrou prognózou – 32, so štandardnou prognózou – 40, so zlou prognózou – 5 pacientov. Mutačná analýza IgVH génu bola stanovená u 74 chorých (mutovaný stav 48/ nemutovaný 20) u 6 pacientov sa nepodarilo zachytiť alely IgVH génu. 28 pacientov z 76 mali pozitívny ZAP-70 a CD38 u 18 z 76 pacientov. Redukciu telomér sme identifikovali u 48 pacientov. Kvantitatívne stanovenie aktivity telomerázy bola prevedená u 28 pacientov a jej zvýšenú aktivitu preukázali u 14 pacientov. Štatistická analýza získaných výsledkov preukázala že priemerné TRF je významne kratšie u pacientov s nemutovaným stavom IgVH génu oproti pacientom s mutovaným IgVH. Detailnejšie výsledky analýz TRF v porovnaní s ostatnými prognostickými faktormi budú prezentované. Záver. Stanovenie dĺžky telomér v kombinácii s inými prognostickými parametrami prispieva k detekcii rizikových skupín chorých v časných štádiách B-CLL. Podporené grantmi IGA MZČR NR 9244-3, MZO VFN2005, MSM 0021620808, LC535.

## EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE 2

#### 1411.

#### Optimalizace nové generace myeloidních dendritických buněk pro protinádorovou vakcinaci

Skálová Kateřina, Macková Klára, Michálek Jaroslav (Univerzita v Brně, Ústav pro imunologii a alergologii, MU, Brno; I. Dětská interní klinika, FN, Brno)

Dendritické buňky patří mezi antigen prezentující buňky, jejichž hlavní funkcí je aktivace pomocných a cytotoxických T-lymfocytů. Jsou schopné prezentovat nádorový antigen a indukovat tak imunitní odpověď organismu proti nádoru. Jako profesionální antigen prezentující buňky je lze využít pro přípravu protinádorových vakcín. V různých experimentálních studiích bylo prokázáno, že dendritické buňky kultivované různými metodami se značně liší svými schopnostmi specificky aktivovat T-lymfocyty. Zatímco dříve byl kladen důraz na imunofenotyp dendritických buněk (CD80+, CD83+, CD86+, HLA-DR+ a CD14-), podle současných poznatků je rozhodující schopnost specifické aktivace pomocných T-lym-



focytů typu Th1 a cytotoxických T-lymfocytů ve smíšené lymfocytární kultuře. Tato schopnost je dána zejména produkcí interleukinu-12 (IL-12), který podporuje protinádorovou imunitní reakci. Naopak nežádoucí je produkce IL-10, který tlumí aktivaci lymfocytů a navozuje stav anergie. V této studii jsme porovnávali pět různých postupů kultivace dendritických buněk vhodných pro použití v klinických studiích. Z krve zdravých dárců byly gradientovou centrifugací izolovány mononukleární buňky. Metodou plastické adherence byly získány monocyty, které byly kultivovány v kompletním médiu s přidávkou cytokinů IL-4 a GM-CSF (růstový faktor stimulující tvorbu granulocytů a makrofágů). Takto získané nezralé dendritické buňky byly naloženy nádorovým antigenem ve formě proteinového lyzátu nádorové tkáně. Jejich maturace byla indukována pěti různými kombinacemi cytokinů s následujícím složením: MK1 (maturační koktejl 1) - bakteriální lipopolysacharid (LPS) a interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ); MK2 - tumor nekrotizující faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , IFN- $\alpha$ , prostaglandin E2 (PGE2) a ligand toll-like receptoru 7/8 (R848); MK3 - TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6 a PGE2; MK4 - TNF- $\alpha$ ; MK5 - R848 a IFN- $\alpha$ . Dendritické buňky jsme následně kvalitativně a kvantitativně analyzovali na produkci cytokinů, imunofenotyp, zralost a schopnost aktivace T-lymfocytů ve smíšené lymfocytární kultuře. Dosažené výsledky budou detailně prezentovány. Práce byla podpořena granty MŠMT NPV II 2B06058 a NPV II 2B08066.

#### 1464.

##### **The preparation of myeloma-specific T cells activated with MUC1 pulsed dendritic cells**

Kryukov Fedor, Očadlíková D., Kovářová L., Burešová I., Hájek R., Michálek J. (*UCIC, URC-CMG, Masaryk University, Brno; URC-CMG, Masaryk University, Department of Hematooncology, University Hospital, Brno; UCIC, Masaryk University, Department of Pediatrics, University Hospital, Brno*)

Background: Multiple myeloma is a hematological malignancy with weak immunogenicity and defective function of the immune system. An important issue for immunotherapy of myeloma is the identification of appropriate tumor-associated antigens. Recently, MUC1 was detected on a majority of myeloma cell lines. Aim: We studied antigen-specific and HLA-A2-restricted cytotoxic activity against MUC1-positive ARH77 myeloma cell line in vitro. Methods: A HLA-A2 specific MUC1-derived nonapeptide (TSAPDTRPA) was used as a tumor-associated antigen. Dendritic cells (DCs) were generated from HLA-A2 positive PBMCs using GM-CSF and IL-4 and were matured with TNF $\alpha$ . Myeloma-specific cytotoxic activity of MUC1-reactive CTL was established by repeated stimulation of CTL via dendritic cells loaded with MUC1-derived nonapeptide. MUC1-reactive IFN-g+ T cells were sorted with immunomagnetic beads (MACS) and further expanded in vitro. Specific cytotoxicity of MUC1-reactive T cells aga-

inst ARH77 myeloma cell line was evaluated. subset of CD3+CD4+ and CD3+CD8+ T cells Results: The IFN-g repeated stimulation via DCs reached 1.31% $\pm$ 0.15% and 1.05% $\pm$ 0.12%, after respectively and after MACS enrichment reached 66.94% $\pm$ 7.19% of IFN-g+ CD3+CD4+ and 64.59% $\pm$ 6.03% IFN-g+ CD3+CD8+ T cells. At a ratio 20:1 (effector: target cells) cytotoxicity of IFN-g+ T lymphocytes vs. ARH77 reached 17.16% $\pm$ 5.13% compared to non-specific killing of allogeneic PBMC (negative control) which was 0.79% $\pm$ 0.39%. At a ratio 40:1 IFN-g+ T cells were able to kill 36.14% $\pm$ 6.51% of ARH77 MUC1-positive target cells while the cytotoxicity against allogeneic PBMC remained negligible 0.77% $\pm$ 0.38%. The differences between experimental and control groups were significant ( $p < 0.01$ ). Conclusion: We were able to demonstrate that MUC1-reactive T cells can be identified and expanded using a relatively simple in vitro techniques consisting of antigen-specific stimulation, immunomagnetic sorting and rapid expansion. In summary, MUC1-pulsed DCs could be a good candidate for future clinical vaccination trials. This study was supported with grant MSMT LC0602, MSMT LC0627, MSMT MSM0021622434, MSMT NPV II 2B06058, IGA MZCR NR/8945-4 and IGA MZCR 1A/8709-5.

#### 1446.

##### **Selektivní deplece aloreaktivních T-lymfocytů u pacientů s diagnózou leukémie a mnohočetného myelomu**

Matějková Eva, Burešová Ivana, Foltánková Veronika, Michálek Jaroslav (*Univerzitní centrum buněčné imunoterapie, Masarykova univerzita, Brno*)

Úvod: Reakce štěpu proti hostiteli (graft versus host, GVH) je obávanou komplikací alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk. Hlavní roli hrají T lymfocyty dárce, které v konečném důsledku mohou vést k těžkému poškození tkání hostitele, především kůže, jater a gastrointestinálního traktu. Selektivní deplece pomocí anti-CD25 imunotoxinu (IT) vede k eliminaci nežádoucích aloreaktivních T lymfocytů a uchování žádoucích T lymfocytů dárce, které vykazují protileukemickou a protinfekční reaktivitu. Metodika: V primární smíšené lymfocytární reakci (mixed lymphocyte reaction, MLR) byly použity ozářené nenádorové buňky pacienta jako antigenní stimulátor. Vzniklá populace aloreaktivních T lymfocytů byla selektivně depletována pomocí anti-CD25 imunotoxinu (IT). Zbýlé T-lymfocyty byly následně stimulovány leukemickými/myelomovými buňkami téhož pacienta. Takto aktivované buňky byly separovány metodou FACS a po následné expanzi byla jejich protileukemická/protimyelomová aktivita ověřena v neradioaktivním testu cytotoxicity. Soubor pacientů: V našich experimentech bylo provedeno 22 MLR (12x AML, 3x ALL, 2x CLL, 1x CML a 7x mnohočetný myelom). Výsledky: 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 – 9,6% (medián 7,46%) u pacientů s leukémií a 0,7 – 6,6% (medián 3,0%). Graft-versus-host (GVH) reaktivita dárcovských buněk byla zanedbatelná (0 – 0,23%, medián 0,14%) i po opakovaných restimulacích ozářenými nenádorovými buňkami pacienta. Test cytotoxicity potvrdil výraznou protinádorovou aktivitu získaných GVL/GVM klonů T lymfocytů. Závěr: Dokázali jsme, že anti-CD25 imunotoxin vede k dlouhodobé selektivní depleci aloreaktivních klonů T lymfocytů dárce při uchování jejich protinádorového potenciálu. V případě diagnózy leukémie i mnohočetného myelomu byla u depletovaných buněk zachována vysoká reaktivita GVL a GVM. Podporováno grantem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy NPVII 2B06058.

1499.

**Detekce alodepletovaných protileukemických T lymfocytárních klonů u pacienta s chronickou lymfatickou leukémií**

Foltánková Veronika, Koláčná Kateřina, Matějková Eva, Dendis Miloš, Bartoš Milan, Novotná Dana, Brychtová Yvona, Mayer Jiří, Michálek Jaroslav (*Univerzitní centrum buněčné imunoterapie, Masarykova Univerzita, Brno; Genex CZ, s.r.o., Brno; IHOK FN, Brno; 1. dětská interní klinika, FN, Brno*)

Efekt štěpu proti leukémii (GVL; graft versus leukemia) bývá často provázen nemocí štěpu proti hostiteli (GVHD; graft versus host disease) u pacientů podstupujících alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk (HSCT). Již dříve jsme pomocí klonotypového eseje prokázali, že reakce GVL a GVH je zprostředkována různými klony T lymfocytů (Michálek et al., PNAS 2003). Cílem této studie bylo u pacienta s chronickou lymfatickou leukémií identifikovat takové klony T lymfocytů, které nesou specifickou protileukemickou aktivitu a zároveň nevyvolávají GVH efekt. Klony byly identifikovány na základě smíšené lymfocytární reakce (MLR). V primární MLR byly T lymfocyty HLA-identického příbuzného dárce stimulovány antigenem získaným z neleukemických buněk pacienta a aloreaktivní T lymfocyty byly následně selektivně depletovány pomocí anti-CD25 imunotoxinu. Alodepletované T lymfocyty byly dále v sedmidenních intervalech třikrát reaktivovány ozářenými leukemickými buňkami téhož pacienta. Aktivované alodepletované GVL-reaktivní T lymfocyty dárce byly vytříděny pomocí průtokového cytometru. Individuální GVL-specifické klony T lymfocytů byly identifikovány pomocí klonotypového eseje, který je založen na detailní analýze unikátní VDJ sekvence T lymfocytárního receptoru beta (TCRB-VDJ). Cílová TCRB-VDJ sekvence byla amplifikována pomocí dvou odlišných přístupů PCR (V-rodiny a anchored PCR) a použita k vytvoření cDNA

knihovny s imunodominantními klony. Bylo dosaženo selektivní deplece (více než 2 log) aloreaktivních T lymfocytů. Zároveň byla úspěšně potencována jejich protileukemická aktivita, která byla ověřena i v neradioaktivním testu cytotoxicity. Byly srovnány výsledky dvou odlišných způsobů amplifikace sekvence TCRB-VDJ. Metodou PCR s TRBV primery jsme identifikovali devět protileukemických klonů, z toho čtyři byly rozpoznány rovněž druhou metodou anchored PCR. Nejvíce dominantní klon TCRBV 7.2 byl zastoupen v 80% všech klonů a byl sledován pomocí real-time PCR v periferní krvi pacienta po HSCT. Vzhledem ke klinickému průběhu komplikovanému vzácnou blastickou transformací (Stano-Kozubik et al., Cancer Genet Cytogenet. 2008), která vedla ke smrti pacienta v relapsu osm měsíců po HSCT, nebyl in vivo detekovatelný ani nejvíce dominantní protileukemický klon T lymfocytů. Práce byla podpořena grantem MŠMT (NPVII-2B06058).

1432.

**Paměťové a regulační populace T-lymfocytů u nově diagnostikovaných pacientů s roztroušenou sklerózou**

Mikulková Zuzana, Praksová Petra, Štourač Pavel, Bednařík Jan, Štrajtová Lucie, Michálek Jaroslav (*Univerzitní centrum buněčné imunoterapie, MU, Brno; Neurologická klinika, FN, Brno*)

Roztroušená skleróza (RS) je chronické autoimunitní onemocnění způsobené infiltrací auto-agresivních buněk do centrálního nervového systému. Pomocí průtokové cytometrie jsme zhodnotili populace T-lymfocytů s významnou funkcí v autoimunitních procesech. Porovnali jsme populace naivních T-buněk CD4+CD45RA+, centrálních paměťových T-buněk (Tcm) CD4+CD45RO+CCR7+, efektorových paměťových T-buněk (Tem) CD4+CD45RO+CCR7, T-regulačních buněk (Treg) CD4+CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> a T-supresorových buněk (Ts) CD8+CD28<sup>-</sup>. Sledovali jsme rozdíly ve skupině pacientů s první manifestací roztroušené sklerózy (n = 58) a ve skupině zdravých dárců (n = 40). Byly zjištěny zvýšené počty paměťových populací, jak Tcm (p = 0,014), tak Tem (p > 0.001). U naivních buněk byl detekován pokles v rámci skupiny RS pacientů (p = 0,017). U populace regulačních buněk nebyl zjištěn žádný signifikantní rozdíl mezi pacienty a zdravými dárce (p = 0,162). Dále byl sledován vývoj všech uvedených populací v závislosti na věku a bylo zjištěno, že populace T-lymfocytů jsou věkově závislé u zdravých dárců, avšak žádná významná závislost nebyla zjištěna u nově diagnostikovaných RS pacientů. Práce byla podpořena granty Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy: MSM0021622404 a 2B08066.