

Diskuse a závěr: Použití plasmferézy v této indikaci ukazuje jasný benefit této metody. Podle literatury by měl být výskyt PPE při námi podané dávce PPL asi 50%. Při využití eliminace nadbytečného množství PPL po nasycení tumorosní tkáně byl výskyt podstatně nižší – jen u jedné nemocné. V našem dalším výzkumu se zaměříme na zvětšení souboru nemocných a bližší

hodnocení jak klinických parametrů (nutriční stav, imunologický profil), tak „benefit cost“ vzhledem k možnosti doporučit tuto metodu jako standardní postup u nemocných s vysokým rizikem PPE (malnutrice, chronická žilní insuficience dolních končetin, imunokompetence atd.) léčených PLD. Práce byla podpořena grantem AVZ MZ 16-30366A.

## LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA

### 2970. VYUŽITÍ CELOEXOMOVÉHO SEKVENOVÁNÍ V PŘEDNÁŠKA

**Staňo Kozubík K., Pál K., Radová L., Šmída M., Réblová K., Plevová K., Pospíšilová Š., Doubek M. (CMBGT, IHOK FN a CEITEC MU, Brno; CEITEC MU, Brno)**

Přednáška bude cílena zejména na laboratorní aspekty této problematiky. Pokusí se o vysvětlení principu NGS, uvedení historie NGS a konkrétní postup aplikace exomového sekvenování na případové studii. Zmíní také problematická místa dané metodiky (BioIT, zkušenosti s vyhodnocováním NGS dat a používáním NGS metodiky v laboratoři).

Lidský genom obsahuje cca  $3,2 \cdot 10^9$  párů bází. Pouze <2 % genomu tvoří kódující genové sekvence. Gen je tvořen introny, exony a nepřekládanými úseky na 3' a 5' koncích. Všechny exony (kódující sekvence) se označují „exom“. Exom obsahuje cca 85 % známých mutací, které podmiňují onemocnění. Sekvenování nové generace (NGS – z anglického „Next Generation Sequencing“) nachází stále větší uplatnění nejen v klinickém výzkumu, ale také v klinické diagnostice. Tato technologie umožňuje přechíst sekvenci lidského genomu za významně nižší cenu a kratší dobu než klasické Sangerovo sekvenování. Zatímco klasické sekvenování (sekvenování první generace = Sangerovo sekvenování) detekuje DNA nukleotidy v řadě jeden po druhém, NGS funguje na principu masivního paralelního sekvenování. Tím se stanoví sekvence až stovek milionů bází současně.

Výhodou NGS je flexibilita: v jednom běhu lze sekvenovat a) konkrétní úsek DNA (gen/geny), b) protein kódující DNA (exom), c) celou DNA (genom). Lze využít nastavitelné senzitivity metody: podle množství genetické informace k vyšetření volíme vysokou senzitivitu pro detekci např. somatických mutací nebo nižší senzitivitu pro vyšetření např. zárodečného genomu. V současnosti je cílené, celoexomové i celogenomové sekvenování považováno za vhodnou a praktickou variantu testování pro klinické účely. S jejich využitím lze

detekovat varianty napříč širokým spektrem aplikací: např. v populační genetice, u klinicky podmíněných onemocnění nebo u nádorových onemocnění. Volba mezi celoexomovým nebo celogenomovým sekvenováním závisí na ceně a potřebě znalosti nekódujících dat pro stanovení diagnózy.

V hematologii lze exomové sekvenování využít k detekci kauzálních genů a jejich variant např. u monogenních onemocnění, ale také ke stanovení diagnózy tam, kde je fenotyp onemocnění podmíněn výskytem mutace v celé řadě genů nebo kde je vyšetřovaný úsek DNA příliš rozsáhlý. Mezi nemoci, u nichž je stanovení diagnózy rychlejší a levnější pomocí celoexomového sekvenování, patří např. Long QT syndrom u člověka, SCID a kardiomyopatie. V klinické hematologii existuje řada potenciálních aplikací pro cílené exomové sekvenování: hemolytická anemie neznámého původu, kongenitální neutropenie, aplastická anemie ad. Celoexomové sekvenování se využívá pro diagnostické účely u následujících klinických syndromů: Fanconiho anemie, neuroacanthocytosis syndromy a Diamond-Blackfanova anemie. Řada hematologických onemocnění je nejasné etiologie, přestože jde často o geneticky podmíněná onemocnění. Exomové sekvenování je vhodné také v případech geneticky podmíněného hematologického onemocnění nejasného původu pro detekci kauzální varianty (např. u trombocytopenií).

Pro identifikaci hereditárních germinálních mutací je zapotřebí získat biologický materiál (např. periferní krev a z ní izolovanou DNA) nejen od nemocných, ale také od zdravých členů rodiny. Po provedení NGS analýzy získáme stovky až tisíce variant. Následuje bioinformatická a biostatistická analýza dat: srovnání získaných dat s referenční sekvencí, stanovení odchylek od reference, vyloučení populačních a rodinných variant a identifikace potenciálně kauzálních variant. Přítomnost potenciálně kauzální varianty je třeba ověřit alternativní sekvenací metodou. Optimální by bylo provést funkční test potenciálně kauzálních variant pro stanovení jejich patogenity.

Na reálném příkladu bude představena metodika exomového sekvenování konkrétní rodiny včetně výsledku NGS a funkční analýzy detekované mutace.

„Podpořeno z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. 16-29447A. Veškerá práva podle předpisů na ochranu duševního vlastnictví jsou vyhrazena.“

### **2978. DETEKCE MUTACÍ V TP53 GENU U PACIENTŮ S CHRONICKOU LYMFOCYTÁRNÍ LEUKEMIÍ POMOCÍ SEKVENOVÁNÍ NOVÉ GENERACE**

**Kriegová E., Schneiderová P., Jarošová M., Procházka V., Fillerová R., Jiskrová E., Urbanová R., Papajík T. (Ústav imunologie, LF UP a FN, Olomouc; Hemato-onkologická klinika, LF UP a FN, Olomouc)**

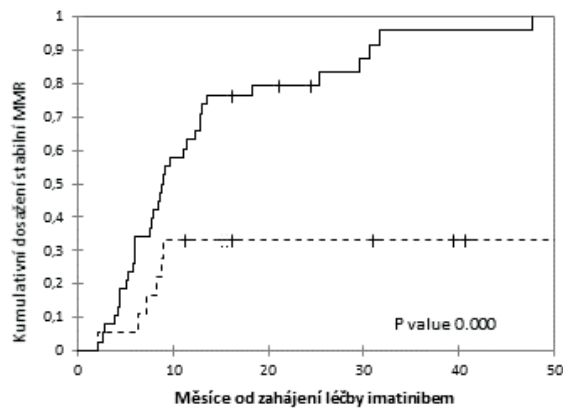
Chronická lymfocytární leukemie (CLL) patří mezi nejčastěji se vyskytující maligní lymfoproliferativní onemocnění starších dospělých. Klinický průběh CLL je velmi heterogenní. Jednou z možných příčin je velká genetická variabilita zahrnující řadu významných cytogenetických aberací (13q-, 11q-, trizomie 12 a 17p-) a také mutace v TP53, NOTCH1, ATM, SF3B1, BIRC3 a dalších genech podílejících se na patogenezi CLL. Mezi nejvýznamnější prognostický faktor u CLL patří delece a/nebo mutace genu TP53, které jsou spojovány s neodpovídavostí na chemoterapii a vyšším rizikem relapsů. S nástupem nových léků typu inhibitorů BCR signalizace (ibrutinib a idelalisib), které jsou účinné také u pacientů s deletovaným/mutovaným TP53, je nutné zařadit vyšetřování delece 17p- současně s detekcí mutací v genu TP53 do klinické praxe. Sdělení shrnuje současný stav znalostí klinického dopadu deletovaného/mutovaného TP53 genu u CLL. Dále diskutujeme výhody detekce mutací TP53 genu pomocí sekvenování nové generace (NGS), která umožňuje detekovat i minoritní subklony nesoucí mutace TP53, včetně základní interpretace výsledků. Současná cytogenetická detekce delece 17p- společně s detekcí mutací TP53 genu pomocí NGS umožní identifikovat rizikové CLL pacienty a současné nové léčebné možnosti umožní nasadit cílenou terapii u těchto vysoce rizikových pacientů. Grantová podpora: MZ ČR VES16-32339A, IGA\_LF\_2016\_001, IGA\_LF\_2016\_011.

### **2908. SNP ALELY V REGULAČNÍCH OBLASTECH GENŮ SLC22A4 A SLC22A5 JSOU VÝZNAMNĚ SPJATY S DOSAŽENÍM STABILNÍ VELKÉ MOLEKULÁRNÍ ODPOVĚDI U PACIENTŮ S CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMIÍ LÉČENÝCH IMATINIBEM V PRVNÍ LINII**

**Jarušková M., Čuřík N., Hercog R., Polívková V., Motlová E., Beneš V., Klamová H., Machová Poláková K. (Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha - CZ; Genomics Core Facility, Heidelberg - D)**

Nejčastěji užívaným lékem v 1. linii u chronické myeloidní leukemie (CML) zůstává inhibitor tyrozin-kináz (TKI) imatinib (IM). Biologická dostupnost IM v leukemických buňkách v dostatečné koncentraci je důležitým faktorem ovlivňujícím odpověď pacientů na léčbu. Farmakogenetika představuje potenciální zdroj molekulárních markerů, které by mohly v době diagnózy predikovat odpověď na léčbu IM. Vhodnými markery mohou být děděné polymorfismy nacházející se v regulačních oblastech vybraných ABC a SLC genů, které kódují transmembránové přenašeče IM. Cílem této práce bylo prověřit polymorfismy v promotorových oblastech vybraných ABC a SLC genů a identifikovat ty, které jsou asociované s odpovědí na léčbu IM v první linii u pacientů s CML. Metodou NGS jsme na testovací kohortě 83 pacientů vyšetřili promotory 15 SLC a 4 ABC genů s anotovanou funkcí lékových přenašečů. Všichni pacienti byli léčeni IM v neměnné dávce 400mg/den. Na základě minimálně dvouletého sledování byli pacienti rozděleni na optimálně (n=42) a neoptimálně (n=41, kategorie warning a failure podle doporučení Evropské leukemické sítě 2013) odpovídající na IM. Na validační kohortě (n=42) byla provedena detekce SNP v promotorech genů SLC22A4 a SLC22A5 pomocí Sangerova sekvenování. Analýzy vazebné nerovnováhy genotypovaných SNP v promotorech SLC22A4 a SLC22A5 a vyhledávání s nimi asociovaných SNP v dalších lokusech regulujících transkripci obou genů bylo provedeno na Evropské populaci pomocí nástroje LDlink1.1. Pro analýzy frekvence alel byly použity Fisherův exaktní test pravděpodobnosti a Chi-kvadrátový test. Kumulativní incidence dosažení stabilní velké molekulární odpovědi (MMR) byla vypočtena pomocí XLSTAT. Pro výpočet přežití bez události byla použita Kaplan-Meierova metoda. V 1486 sekvencích promotorů vyšetřených NGS jsme identifikovali 95 SNP. Na sloučeném souboru testovací a validační kohorty pacientů (n=125) jsme mezi pacienty optimálně odpovídajícími na léčbu IM a pacienty se selháním léčby nesoucími genotyp rs2631365-TC (SLC22A5) zjistili významný rozdíl v četnosti genotypů

Obrázek 1



rs460089-GC a rs460089-GG (SLC22A4). Zjistili jsme, že lokusy rs460089 a rs2631365 jsou ve významné vazebné nerovnováze ( $R^2=0,98-1,0$ ;  $P=0,0$ ) s dalšími 12 regulačními lokusy nacházejícími se převážně v intronech genů SLC22A4 a SLC22A5, které kódují transportéry IM OCTN1 a OCTN2. Na základě asociačních analýz se ukázalo, že pacienti nesoucí genotyp rs460089-GC měli významně vyšší pravděpodobnost dosažení stabilní MMR než pacienti nesoucí genotyp rs460089-GG ( $P=0,001$ ). Pravděpodobnost dosažení MMR se ještě zvýšila u pacientů nesoucích genotyp rs460089-GC\_rs2631365-TC ( $P=0,000$ ; obrázek 1). Podobně pacienti s genotypem rs460089-GC měli významně vyšší pravděpodobnost přežití bez události než pacienti s genotypem rs460089-GG ( $P=0,003$ ) a tento rozdíl se prohloubil mezi pacienty nesoucími genotyp rs460089-GC\_rs2631365-TC v porovnání s pacienty s genotypem rs460089-GG\_rs2631365-TC ( $P < 0,0001$ ). Zjistili jsme, že SNP rs460089 a rs2631365 mohou představovat důležité genetické markery předpovídající odpověď na léčbu IM u pacientů s CML v době diagnózy. Pacienti s genotypem rs460089-GC\_rs2631365-TC budou s vysokou pravděpodobností odpovídat na léčbu IM optimálně, zatímco vysoce rizikový genotyp rs460089-GG\_rs2631365-TC naopak předvídá selhání léčby IM a progresi onemocnění. Pacienti s tímto rizikovým genotypem by mohli profitovat z léčby takovými TKI, které pro transport do buněk nevyužívají transportéry OCTN1 a OCTN2. Podporováno granty MZČR IGA NT/13899 a GA UK 177815.

## 2947. VYŠETŘENÍ TKÁNÍ PŘI DIAGNOSTICE AMYLOIDU

Flodrová P., Pika T., Flodr P. (Ústav klinické a molekulární patologie, LF UP, Olomouc; Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc)

Amyloidóza je vzácné onemocnění charakterizované ukládáním amyloidových depozit v extracelulárním prostoru tkání. Tato depozita jsou jen velmi omezeně odbouratelná a jejich hromaděním dochází postupně k porušení funkce postiženého orgánu a v konečné fázi až k jeho selhání. V současnosti je známo 31 proteinů, které mohou způsobit amyloidózu u lidí, a to jak v systémové tak lokalizované formě. Prognóza většiny nemocných není příznivá, v krajních případech dochází k úmrtí v řádu měsíců po stanovení diagnózy. Z toho důvodu má prioritu co nejčasnější a také nejpřesnější stanovení diagnózy. V diagnostickém procesu má kromě podrobného klinického vyšetření nezastupitelnou roli hodnocení tkáně, které jediné může přítomnost onemocnění potvrdit nálezem amyloidu v histologickém obraze. Kromě metod speciálního barvení, které více či méně specificky amyloid znázorní, je v dnešní době nezbytné použití dalších postupů, které mají za cíl přesnou typizaci amyloidu. Ta je klíčová pro adekvátní terapii pacientů, neboť každý subtyp onemocnění se léčí výrazně odlišným způsobem. K určení subtypu amyloidu se využívá především aplikace nepřímé imunohistochemie a imunofluorescence na histologické tkáňové řezy. V úzce specializovaných centrech je výhodou dostupnost metody kapalinové chromatografie spřažené s hmotnostní spektrometrií, která jako jediná určí přesně všechny proteiny, které se na složení depozit podílí. Vzhledem k vzácnosti této diagnózy je důležitá centralizace péče o nemocné pro zajištění co nejvyššího standardu diagnostiky i léčby. Podpořeno z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. 16-31156A. Veškerá práva podle předpisů na ochranu duševního vlastnictví jsou vyhrazena.