

Univerzita Palackého v Olomouci

Lékařská fakulta

**Význam vyšetření hepcidinu  
u vybraných vrozených anémií  
v dětském věku a u dárců krve**

Doktorská dizertační práce

**MUDr. Lucie Sulovská**

Olomouc 2015

<b>Doktorand:</b>	MUDr. Lucie Sulovská
<b>Školitel:</b>	Prof. MUDr. Dagmar Pospíšilová, Ph.D.
<b>Školící pracoviště:</b>	Dětská klinika, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
<b>Studijní obor:</b>	Pediatric

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že dizertační práci jsem vypracovala samostatně pod odborným vedením své školitelky Prof. MUDr. Dagmar Pospíšilové, Ph.D.. Všechny použité zdroje literatury jsem uvedla.

### **Poděkování**

Ráda bych poděkovala zejména své školitelce Prof. MUDr. Dagmar Pospíšilové, Ph.D. za pomoc s realizací projektu, za odborné vedení a za čas, který mi věnovala při přípravě této práce. Mé díky patří i kolegům z laboratoře proteomiky Ústavu molekulární a translační medicíny a Ústavu biologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci Mgr. Dušanu Holubovi, Mgr. Monice Horváthové, Ph.D. a Mgr. Zuzaně Židové, bez jejichž přispění by tato práce nevznikla.

Mé poděkování patří Prof. MUDr. Vladimíru Mihálovi, CSc. za cenné rady a za poskytnutí pracovního zázemí.

V neposlední řadě patří mé díky rodině a také kolegům z Dětské kliniky Fakultní nemocnice v Olomouci za dlouhodobou podporu.

V Olomouci, 16. října 2015

MUDr. Lucie Sulovská

## Seznam použitých zkratek

<b>Alk3</b>	aktivin-like kinase 3
<b>Apo-Tf</b>	apotransferin
<b>ATP</b>	adenosin-trifosfát
<b>BFU – E</b>	burst forming unit – erythroid
<b>BMP/Smad</b>	Bone morfogenic protein/Small and Mothers Against Decaplentaplegic protein
<b>CFU-E</b>	colony forming unit – erythroid
<b>c-kit</b>	tyrozinkinázový receptor kit
<b>DCYTB</b>	duodenální cytochrom-b
<b>DMT1</b>	divalent metal transporter 1
<b>DNA</b>	deoxyribonukleová kyselina
<b>EPO</b>	erythropoetin
<b>ERFE</b>	erytroferon
<b>Fe</b>	železo
<b>FPN</b>	feroportin
<b>G-CSF</b>	granulocytární kolonie stimulující faktor
<b>GDF 15</b>	růstový diferenciační faktor 15
<b>GM-CSF</b>	granulocytární a monocytární kolonie stimulující faktor
<b>HAMP</b>	human antimicrobial peptide gene
<b>Hb A</b>	adultní hemoglobin
<b>Hb F</b>	fetální hemoglobin
<b>Hb</b>	hemoglobin
<b>HCP 1</b>	heme carrier protein 1
<b>HE</b>	Hereditární eliptocytóza
<b>HFE</b>	protein dědičné hemochromatózy
<b>HIF</b>	hypoxií indukovaný faktor
<b>HJV</b>	hemojuvelin
<b>HLA</b>	human leukocytes antigen, lidský leukocytární antigen
<b>HRE</b>	hypoxia responsive element
<b>HS</b>	Hereditární sférocytóza
<b>HSC</b>	hematopoetické kmenové buňky
<b>HSCT</b>	transplantace kmenových buněk krvetvorby
<b>Il-1</b>	interleukin 1
<b>Il-3</b>	interleukin 3
<b>Il-6</b>	interleukin 6
<b>Il-9</b>	interleukin 9
<b>IRE</b>	iron-responsive element
<b>IRIDA</b>	anémie refrakterní na železo
<b>IRP</b>	iron regulatory protein
<b>JAK/STAT</b>	Janus kinase/signal transducers and activators of transcription

<b>LEAP-1</b>	liver-expressed antimicrobial peptide 1
<b>M-CSF</b>	monocytární kolonie stimulující faktor
<b>MCV</b>	střední objem erytrocytů
<b>MCH</b>	střední obsah hemoglobinu v erytrocytu
<b>MCHC</b>	střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytu
<b>mRNA</b>	messengerová ribonukleová kyselina
<b>NaCl</b>	chlorid sodný
<b>OPSI</b>	overwhelming post-splenectomy infection, fulminantní sepse splenektomovaných
<b>RF</b>	růstový faktor
<b>ROS</b>	volné kyslíkové radikály
<b>SCF</b>	stem cell faktor
<b>sTfR</b>	solubilní transferinový receptor
<b>Tf</b>	transferin
<b>TfR 1, 2</b>	transferinový receptor 1, 2
<b>TGF <math>\beta</math></b>	transformující růstový faktor beta
<b>TI</b>	talasemie intermedia
<b>TM</b>	talasemie major
<b>TMPRSS6</b>	transmembrane protease, serin 6
<b>TNF <math>\alpha</math></b>	tumor nekrotizující faktor alfa
<b>TPO</b>	trombopoetin
<b>TSAT</b>	saturace transferinu
<b>TWSG 1</b>	twisted gastrulation homolog protein

<b>Obsah</b>	
<b>Úvod</b>	<b>7</b>
<b>I. Teoretická část</b>	
<b>1 Erytropoéza</b>	<b>9</b>
1.1 Erytroidní progenitorové buňky a jejich diferenciaci	9
1.2 Růstové faktory, mikroprostředí kostní dřeně	10
<b>2 Metabolismus železa a jeho regulace</b>	<b>11</b>
2.1 Vstřebávání Fe	13
2.1.1 Divalent metal transporter 1 a duodenální cytochrom – b	13
2.2 Transport Fe	14
2.2.1 Ferroportin	14
2.2.2 Hefestin	15
2.2.3 Transferin	15
2.2.4 Transferinové receptory 1 a 2	15
2.3 Zásobní Fe	16
2.3.1 Feritin	16
2.3.2 Hemosiderin	17
2.4 Regulace homeostázy Fe	17
2.4.1 Hepcidin	17
2.4.1.1 Hepcidin a hladina železa	20
2.4.1.1.1 BMP/SMAD	20
2.4.1.1.2 Hemojuvelin	20
2.4.1.1.3 Protein dědičné hemochromatózy	21
2.4.1.2 Hepcidin a zánětlivá aktivita	21
2.4.1.3 Hepcidin a erythropoetická aktivita	22
2.4.1.3.1 Růstový diferenciační faktor 15	22
2.4.1.3.2 Twisted gastrulation homolog protein 1	23
2.4.1.3.3 Erytroferon	24
2.4.1.4 Hepcidin a hypoxie	24
2.4.2 IRP (iron regulatory protein) a IRE (iron-responsive element)	24
<b>3 Talasémie</b>	<b>25</b>
3.1 Definice a epidemiologie	26
3.2 Patofyziologie	27
3.3 Klinická manifestace	27
3.4 Diagnostika	31
3.5 Léčba	31
<b>4 Vrozené poruchy erytrocytární membrány</b>	<b>32</b>
4.1 Definice a epidemiologie	33
4.1.1 Hereditární sférocytóza	33
4.1.2 Hereditární eliptocytóza	34
4.1.3 Hereditární stomatocytóza	34
4.2 Patofyziologie	34
4.3 Klinická manifestace	35

4.4	Diagnostika	36
4.5	Léčba	37
<b>II. Experimentální část</b>		
<b>5</b>	<b>Metabolismus železa a erythropoetická aktivita u vrozených poruch erytrocytární membrány a talasemie minor</b>	<b>38</b>
5.1	Cíl studie	38
5.2	Materiál a metody	38
5.2.1	Soubor pacientů	38
5.2.2	Hematologické a biochemické vyšetření	38
5.2.3	Vyšetření hladiny hepcidinu	39
5.2.4	Měření GDF 15	40
5.2.5	Statistické zpracování dat	41
5.3	Výsledky	41
5.3.1	Analýza hematologických nálezů u studovaných skupin	41
5.3.2	Hodnocení ukazatelů erythropoetické aktivity	45
5.3.3	Hodnocení parametrů metabolismu Fe	47
5.3.4	Poměr hepcidin/feritin a (hepcidin/feritin)/sTfR	50
5.4	Diskuze	52
5.5	Závěr	55
<b>6</b>	<b>Metabolismus železa u dárců krve</b>	<b>56</b>
6.1	Cíl studie	56
6.2	Materiál a metody	56
6.3	Výsledky	57
6.4	Diskuze	61
6.5	Závěr	62
<b>Reference</b>		<b>64</b>
<b>Přílohy</b>		<b>78</b>
<b>Publikační činnost</b>		<b>113</b>

# Úvod

Anémie je jedním z nejčastějších onemocnění v dětském věku, které může mít významný vliv na zdraví a vývoj dítěte v důsledku neadekvátního zásobení vyvíjejících se tkání kyslíkem. Anémie může negativně ovlivnit nejen růst a vývoj dítěte, ale i rozvoj centrálního nervového systému a může mít negativní důsledky na jiné orgánové systémy. Dopad anémie na zdraví dítěte je tedy daleko širší než je tomu u dospělých pacientů.

Podle údajů World Health Organization (WHO) z roku 2009 postihuje anémie celosvětově 1.62 miliardy obyvatel planety a je tedy závažným problémem jak v rozvojových tak ve vyspělých zemích. Prevalence anémie je nejvyšší u dětí předškolního věku (47%), u dětí školního věku je nižší (25%). Nejčastější příčinou anémie je nutriční nedostatek železa vedoucí k sideropenické anémii, která je příčinou anémie přibližně v polovině případů. Druhým nejrozšířenějším druhem anémie jsou talasémie způsobené vrozenou nebalancovanou syntézou globinových řetězců a postihující přibližně 7% světové populace. Obě nejčastěji se vyskytující anémie jsou mikrocytární a hypochromní a jsou doprovázeny poruchou metabolismu Fe. Vzhledem k rozdílnému terapeutickému přístupu je nutné oba typy anémie včas odlišit.

Další často se vyskytující skupinou anémií jsou anémie způsobené geneticky danými poruchami struktury erytrocytární membrány (hereditární sférocytóza, eliptocytóza, stomatocytóza, pyropoikilocytoza), u kterých může dojít již v časném novorozeneckém věku k závažnému postižení dítěte v důsledku zvýšené propustnosti hematoencefalické bariéry pro nekonjugovaný bilirubin, který má toxické účinky na mozkovou tkáň. I tuto skupinu anémií doprovází narušený metabolismus železa, který může mít vedle negativního efektu nekonjugovaného bilirubinu na centrální nervový systém novorozence další následky ve formě postupného ukládání železa ve tkáních s příslušným negativním vlivem na postižené orgány.

Následky anémie a doprovázejících poruch regulace metabolismu železa u dětí s uvedenými typy anémie mohou mít celoživotní negativní dopad a je proto důležité jejich včasné odhalení a léčba. K lepšímu porozumění vzájemné souvislosti vývoje erythropoézy a metabolismu železa při vzniku anémie vedla doslova exploze poznatků o molekulárních mechanismech zasahujících do buněčné i orgánové regulace obou procesů, které jsme byli svědky v posledních 10 letech. Mnoho souvislostí již bylo objasněno, řada otázek však stále

zůstává nezodpovězena. Cílem předložené práce je přispět alespoň částečně k zodpovězení některých aspektů regulace metabolismu železa a erythropoézy u vybraných anémií u dětí a zhodnocení metabolismu železa u dárců krve se zaměřením na význam hlavního regulátoru metabolismu železa: hepcidinu.



# I. Teoretická část

## 1 Erytropoéza

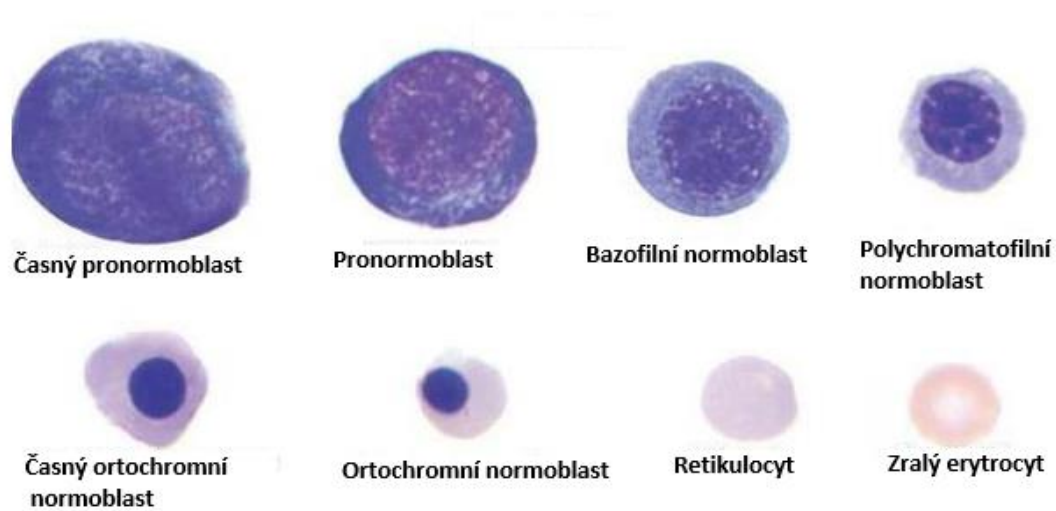
Erytropoéza - nedílná součást hematopoézy - je definována jako proces tvorby zralých erytrocytů z multipotentní kmenové buňky (HSC).

Základními znaky hematopoetických kmenových buněk jsou schopnost sebeobnovy, proliferace a diferenciaci. Ze společné multipotentní kmenové buňky se diferencují dva typy progenitorových buněk – lymfoidní a myeloidní. Lymfoidní progenitorová buňka dává vznik T- a B- lymfocytární linii a NK buňkám. Z myeloidní progenitorové buňky pak vzniká progenitorová buňka pro megakaryocyty-erytrocyty a pro granulocyty-makrofágy. Tyto buňky nelze morfologicky odlišit od HSC. Jejich postupnou diferenciací vznikají zralé elementy erytroidní, granulocytární, megakaryocytární a monocytární řady.

### 1.1 Erytroidní progenitorové buňky a jejich diferenciaci

První erytroidní progenitorovou buňkou, kterou lze identifikovat pomocí průtokové cytometrie, tvoří tzv. BFU – E, „burst forming unit – erythroid“ (volně přeloženo: kolonie časných erytroidních progenitorových buněk). Po sedmi dnech dochází vlivem cytokinů a růstových faktorů (RF) interleukinu 3 (IL-3), růstového faktoru kmenových buněk (stem cell faktor, SCF) a granulocytární a monocytární kolonie stimulujícího faktoru (GM-CSF) k diferenciaci v CFU - E - „colony forming unit – erythroid“ (volně přeloženo: kolonie pozdních erytroidních progenitorových buněk). Po dalším týdnu jsou již vytvořena hnízda s prvními morfologicky odlišitelnými buňkami erytroidní linie – proerytroblasty. V průběhu následujících pěti dnů vznikne z každého proerytroblastu v průměru osm retikulocytů, které jsou uvolněny do cirkulace. Během této doby dochází k buněčnému dělení a vyžívání dceřiných buněk – přes stádium bazofilní, polychromatofilní až po ortochromní normoblast. Po proběhlé extruzi jádra je pak retikulocyt uvolněný do cirkulace, kde v řádu hodin dokončí svůj vývoj v plně funkční erytrocyt (*Sieff, 2015*). Vývoj erytrocytu je zobrazen na Obrázku 1.

**Obrázek 1: Vyzrávání erytrocytu od stádia časného pronormoblastu až po plně funkční zralý erytrocyt.**



*Převzato a upraveno: <https://www.pinterest.com/eradzak08/mls/>*

## **1.2 Růstové faktory, mikroprostředí kostní dřeně**

Pro funkční erytropoézu je podstatná přítomnost specifických růstových faktorů. Mezi hlavní funkce růstových faktorů patří ochrana hematopoetických prekursorových buněk před apoptózou, indukce buněčného dělení zkrácením doby přechodu z fáze G0 do fáze G1 v buněčném cyklu a současně regulace buněčné diferenciaci jednotlivých buněčných linií. V časných fázích hematopoézy HSC proliferují pod vlivem SCF. SCF se váže na povrchový buněčný receptor c-kit, který má vlastní tyrozinkinázovou aktivitu, a následně je signál přenesen do jádra HSC. Exprese c-kit receptorů se snižuje s postupnou diferenciací a vyzráváním buněk. Kromě SCF se v časném stádiu hematopoézy uplatňuje synergický vliv Il-3, Il-6 a GM-CSF. V průběhu vyzrávání jednotlivých buněčných linií se do popředí dostává vliv liniově specifických RF – erythropoetin (EPO) pro červenou krevní řadu; GM-CSF (granulocytární a monocytární kolonie stimulující faktor), G-CSF (granulocytární kolonie stimulující faktor), M-CSF (monocytární kolonie stimulující faktor) pro leukocytární krevní řadu a trombopoetin (TPO) pro megakaryopoézu (Ogawa, 1993; Sieff et al., 2015).

EPO je podstatným RF pro funkční erythropoézu. Jedná se glykoproteinový hormon produkovaný z 90% v ledvinách (juxtaglomerulární buňky aferentních arteriol), který je nezbytný pro terminální maturaci erytroidních prekurzorů. Studie provedená na myším modelu s homozygotní mutací v genu pro erythropoetin nebo erythropoetinový receptor (EPOR) prokázala letální selhání erythropoézy intrauterinně. U těchto embryí se BFU-E a CFU-E vyvíjely standardně, avšak další maturace selhávala (Wu *et al.*, 1995). Stimulace erytroblastů EPO má za následek zvýšení syntézy hemoglobinu a erytrocytárních membránových komponent, zvýšení proliferační aktivity a snížení míry apoptózy. Kromě EPO se na vývoji elementů červené krevní řady podílí SCT, Il-3 a GM-CSF, které mají synergický efekt s EPO (Wu *et al.*, 1995; Jubinsky *et al.*, 1997).

Nejsilnějším stimulem pro zvýšené uvolňování EPO je tkáňová hypoxie. Při sníženém parciálním tlaku kyslíku je komplex podjednotek hypoxií indukovaného faktoru (HIF) stabilní a dochází k jeho translokaci do jádra buňky, kde se podjednotka HIF 1alfa váže HRE (hypoxia-responsive element) v zesilující oblasti genu pro EPO (Semenza *et al.*, 2009).

K produkci zralých krevních elementů je zapotřebí kromě vlastních kmenových buněk, cytokinů a růstových faktorů také vhodné prostředí. Stroma kostní dřeně tvoří retikulární buňky (fibroblasty), endoteliální buňky, adipocyty, makrofágy, osteoblasty a osteoklasty a mnoho dalších (Antohony *et al.*, 2014). Retikulární síť slouží k uchycení hematopoetických buněk, prostory mezi nimi jsou vyplněny extracelární matrix tvořenou proteoglykany, glykosaminoglykany, fibronektiny, kolageny, lamininem, hemonektinem a trombospondinem. Toto uspořádání umožňuje dostatečné zásobení dělicích se a diferencujících se buněk živinami, usnadňuje mezibuněčné interakce, zprostředkuje signály k proliferaci a diferenciaci a zabezpečuje adhezi a následné uvolnění zralých elementů do cirkulace (Gupta *et al.*, 1998).

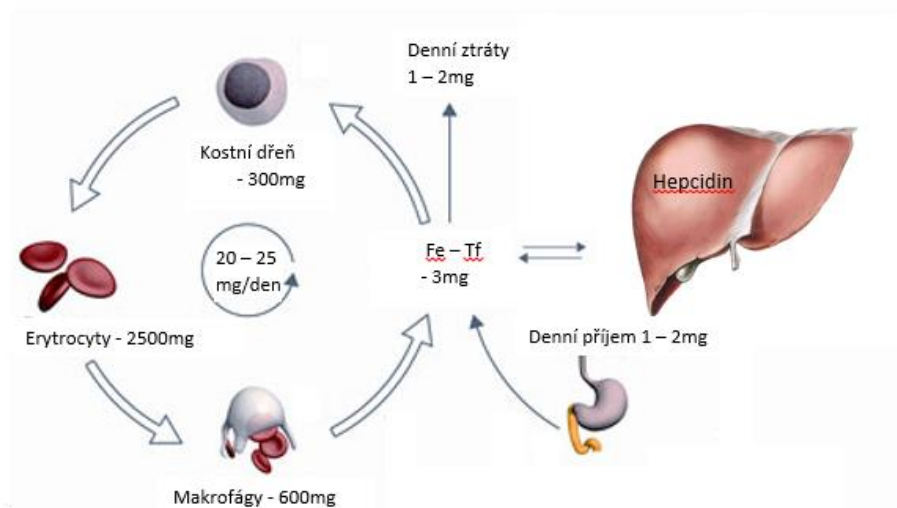
## **2 Metabolismus železa a jeho regulace**

Železo (Fe) patří spolu s ostatními stopovými prvky mezi esenciální molekuly, jejichž nedostatek nebo nadbytek vede k ohrožení životních funkcí. Na buněčné úrovni se Fe účastní řady enzymatických reakcí, které jsou nezbytné pro přežití buněk a pro jejich dělení. Za

fyziologických podmínek je hladina Fe udržována v úzkém rozmezí, protože jak nedostatek, tak akumulace Fe v organismu má závažné důsledky pro buněčné pochody. Nedostatek Fe může vést k zástavě růstu buňky i k buněčné smrti. Při nadbytku železa se po nasycení kapacity vazebních proteinů projevuje schopnost volného Fe katalyzovat Fentonovu a Haber-Weissovou reakci vedoucí ke vzniku volných kyslíkových radikálů (ROS). I přesto, že každá buňka má své mechanismy eliminace malého množství ROS, při nadbytku volného Fe je množství ROS vyšší a eliminační mechanismy nedostačují. Cytotoxicita ROS je dána především jejich schopností poškozovat nitrobuněčné struktury, buněčné membrány a i samotnou DNA (Lawen *et al.*, 2013).

Denní potřeba Fe u člověka je 20 – 25mg, převážná část je využita v kostní dřeni při erythropoéze. Denně se vstřebá jen 1 – 2mg Fe, toto množství může být zvýšeno na 3 – 4mg, pokud to aktuální situace vyžaduje (např. po akutním krvácení). Homeostáza Fe tedy závisí na příjmu, uskladnění a využití Fe. Redistribuce Fe v organismu je znázorněna na Obrázku 2.

**Obrázek 2: Redistribuce Fe v organismu.**



Železo je vstřebáváno v enterocytech duodena, odkud je ve vazbě na transferin distribuováno k cílovým buňkám, zejména k erytroblastům kostní dřene, kde je využito k syntéze hemu. Po erytrofagocytóze senescentních erytrocytů makrofágy, je toto železo opět redistribuováno ve vazbě na transferin. Pouze 1 - 2mg je denně vyloučeno z organismu.

Převzato a upraveno: <http://www.hepcidinanalysis.com/hepcidin>.

## 2.1 Vstřebávání Fe

Železo se ve stravě vyskytuje ve dvou formách – hemové a nehemové, tedy navázané nebo nenavázané na hemovou skupinu. Fe vázané na hemovou skupinu je obsaženo zejména v mase a vnitřnostech a je pro organismus dostupnější a lépe vstřebatelné než nehemové Fe (*Beard et al, 1996*). Nehemové železo se nachází v rostlinné stravě, především v luštěninách, listové zelenině. Množství vstřebaného Fe může být ovlivněno současnou přítomností látek podporujících nebo inhibujících vstřebávání. Mezi sloučeniny, které pozitivně ovlivňují vstřebávání nehemového Fe tvorbou solubilních chelátů, patří organické kyseliny, aminokyseliny, askorbová kyselina a citrát. Na druhé straně přítomnost polyfenolů, fytátů (obsažených v celozrnných výrobcích, luštěninách) inhibuje vstřebávání Fe tvorbou nerozpustných komplexů (*Conrad, 1998*).

### 2.1.1 Divalent metal transporter 1 a duodenální cytochrom – b

Fe je vstřebáváno v enterocytech duodena a horní části jejunu, vstřebatelné je však pouze Fe v dvojmocném stavu ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Trojmocný iont Fe ( $\text{Fe}^{3+}$ ), který je obsažen v rostlinné potravě, musí být nejprve redukován na dvojmocný kationt. Tato reakce je zprostředkovaná duodenálním cytochromem-b (DCYTB), který v kyselém prostředí redukuje  $\text{Fe}^{3+}$  na  $\text{Fe}^{2+}$  (*McKie et al., 2001*). Rozpustná forma  $\text{Fe}^{2+}$  je na apikálně straně enterocytu přenesena divalentním transportérem kovů 1 (DMT 1) do nitra buňky, kde je Fe dále využíván. DMT 1 je transmembránová protonová pumpa se schopností transportovat kromě Fe i dvojmocné kationty mědi, olova a zinku (*Cannone-Hergaux et al., 2001*). Homozygotní mutace v genu pro DMT 1 vede u pacientů k těžké mikrocytární hypochromní anémii. Současně tito jedinci mají určitý stupeň přetížení Fe, zřejmě v důsledku kompenzačního zvýšení příjmu hemového Fe při anémii (*Priwitzerova et al., 2004*).

Mechanismus transportu hemového Fe přes apikální membránu enterocytu zatím zůstává nejasný. Zvýšení exprese tzv. heme carrier proteinu 1 (HCP 1) při hypoxii a jeho přítomnost ve střevních epitelích signalizovala jeho účast na přenosu hemového Fe. Později bylo prokázáno, že hlavním substrátem pro HCP 1 je folát, i přesto jeho funkce hemového přenašeče s nízkou afinitou byla popsána (*Le Blanc et al., 2012*). Uvnitř enterocytu dále probíhá degradace komplexu hem-Fe enzymem hem oxygenázou za vzniku  $\text{Fe}^{2+}$  iontů, biliverdinu a CO.

## 2.2 Transport Fe

Střevní epitelie hrají klíčovou úlohu v metabolismu Fe při jeho zpřístupnění ostatním tkáním. Děje se tak na bazolaterální membráně enterocyty v duodenu a v menším množství v horní části jejunu. Fe vázané na transportní proteiny stejně jako zásobní Fe musí být pro organismus netoxické. Před navázáním na transportní protein transferin je tedy nutná jeho opětovná oxidace na trojmocný kationt.

### 2.2.1 Ferroportin

Jediným dosud identifikovaným specifickým transportérem iontů Fe z buňky je ferroportin (FPN, Ireg1, SLC40A1). Ve velké míře je exprimovaný v enterocytech, makrofázích jater, sleziny a kostní dřeně, v hepatocytech a buňkách syncytiotrofoblastu. FPN je součástí membrány většiny ostatních buněk, jedná se však pouze o malé množství pro potřeby vlastního buněčného metabolismu (Nemeth *et al.*, 2004). Vliv exprimovaného FPN v kardiomyocytech, endoteliích cév mozkové tkáně, plic nebo v nádorových buňkách na různá onemocnění je v centru zájmů vědeckých skupin (Lakhal-Littleton *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015; Mc Carthy *et al.*, 2014, Yang *et al.*, 2005). Jedná se protein tvořený 571 aminokyselinami, kódovaný genem na dlouhém raménku chromozomu 2. FPN prochází membránou 9 – 12x a jeho N' terminální konec je umístěn v cytosolu (Liu *et al.*, 2005; De Domenico *et al.*, 2005, Rice *et al.*, 2009; Wallace *et al.*, 2010). Umístění C' terminální části zůstává nevyjasněno. Studie využívající značený protein prokazují přítomnost C' terminálního konce také intracelulárně (Liu *et al.*, 2005; De Domenico *et al.*, 2007). Recentní studie s použitím monoklonální protilátky prokazuje přítomnost C' konce extracelulárně (Ward *et al.*, 2012). Stejně jako struktura exportéru i mechanismus jeho funkce zůstává objasněn jen z části. FPN je jediným dosud popsaným receptorem pro hepcidin, regulační hormon metabolismu Fe. Hepcidin po vazbě na FPN přímo inhibuje eflux iontů Fe z buňky do plazmy. Po navázání hepcidinu na FPN dojde ke konformačním změnám a k internalizaci komplexu FNP-hepcidin do buňky a následné lysozomální degradaci (Nemeth *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2011). Po podání syntetického hepcidinu dochází u myši k hypoferémii trvající 48 hodin, zatímco clearance hepcidinu z cirkulace je pouze několik hodin. Tento časový rozdíl je zřejmě potřebný k resyntéze FNP a jeho internalizaci zpět do buněčné membrány. Hepcidin se na FNP váže v místě extracelulární kličky obsahující cystein v pozici 326. Mutace v genu pro FPN, která má za následek záměnu aminokyseliny v pozici 326 polypeptidového řetězce, způsobuje necitlivost FPN k hepcidinu a je příčinou jedné z forem hereditární hemochromatózy (Sham *et al.*, 2009).

### **2.2.2 Hefestin**

S exportem Fe iontů extracelulárně je úzce spjata i nutnost dvojmocné Fe oxidovat na trojmocné Fe. Feroxidáza hefestin získala své jméno po řeckém bohu kovářství Héfaistovi. Strukturální i funkční podobností bývá enzym považovaný za membránový homolog ceruloplazminu, respektive za membránový protein s ceruloplazminu podobnou ektodoménou (Vulpe *et al.*, 1999). Hefestin má oproti ceruloplazminu navíc na C terminálním konci 86 aminokyselin, které prochází lipidovou dvojvrstvou a jsou zakončeny intracelulárním segmentem (Petrak *et al.*, 2005). Myši s deficitem hefestinu mají středně těžkou až těžkou hypochromní mikrocytární anémii, Fe je ve střevě normálně absorbováno do enterocytů, ale další transport do cirkulace se neuskuteční (Vulpe *et al.*, 1999). U člověka byla exprese hefestinu v různé míře prokázána v mnoha tkáních, včetně distální části tenkého a tlustého střeva – tedy v místech s minimálním vstřebáváním Fe (Petrak *et al.*, 2005).

### **2.2.3 Transferin**

Po uvolnění Fe z bazolaterální membrány enterocytu a jeho oxidaci na trojmocný kationt je Fe navázané na transferin (Tf) dopravováno k místům dalšího zpracování – zejména prekurzorům erytrocytů a svalovým buňkám. Transferin je syntetizovaný převážně v játrech, jeho molekulová hmotnost je 80kDa, gen pro tento protein je lokalizovaný na dlouhém raménku chromozomu 3 (Woods *et al.*, 1990). V plazmě se vyskytuje jako apotransferin nebo s navázaným jedním či dvěma ionty Fe<sup>3+</sup> (Aisen *et al.*, 1978). Úplná absence transferinu je většinou neslučitelná se životem, mutace vedoucí k nižší syntéze transferinu způsobují u svých nositelů závažnou hypochromní mikrocytární anémii se současným přetížením Fe (Goldwurm *et al.*, 2000; Athiyarath *et al.*, 2013). U zdravých jedinců je transferin saturovaný z jedné třetiny, při nedostatku Fe se syntéza transferinu v játrech zvyšuje. Saturace transferinu je proto důležitým indikátorem deficitu Fe (Worwood, 1997).

### **2.2.4 Transferinové receptory 1 a 2**

Cílovou molekulou pro transferin je transferinový receptor 1 (TfR 1), transmembránový glykoproteinový dimer, který je exprimovaný v různé míře ve všech buňkách kromě erytrocytů. Afinita receptoru při pH 7,4 závisí na saturaci transferinu, přednostně je navázán diferický transferin. Komplex Tf – TfR je endocytózou v klatrinových inkluzích dopravený do cytosolu, při snížení pH specifickou proteázou se v endozomu uvolní ionty Fe a zbylý komplex apoTf - TfR je internalizovaný zpět do buněčné membrány (Worwood, 1997). Tento cyklus může molekula Tf opakovat až 100x (Pietrangelo, 2002). TfR může být uvolněn do plazmy a

cirkulovat jako solubilní TfR, který je velmi důležitým markerem erythropoetické aktivity i metabolismu Fe. Vysoce homologní k TfR 1 je transmembránový TfR 2, má však mnohem nižší afinitu (až 30x) k Tf, proto se pravděpodobně více podílí na regulaci Fe než na jeho transportu k cílovým buňkám (*Kawabata et al., 1999*).

## 2.3 Zásobní Fe

Uvolněné  $\text{Fe}^{2+}$  je vysoce reaktivní a je proto vždy vázáno na definované proteiny. V buňce může být zpracováno dvěma způsoby: 1. intracelulárně uskladněno v molekule feritinu a hemosiderinu nebo 2. transportováno přes bazální membránu střečních epitelů do plazmy.

### 2.3.1 Feritin

Jedním z dosud nejlépe a nejdéle studovaným proteinem, který se účastní metabolismu Fe, je feritin. Molekulová hmotnost tohoto multimerického proteinu je 440kDa. Molekula feritinu má vlastnosti nanopasti, která ve svém nitru dokáže uskladnit až 4500 iontů Fe (*Theil, 2013*). Skládá se z 24 podjednotek – lehkých (L) a těžkých (H). V různých tkáních existuje odlišné zastoupení jednotlivých podjednotek v molekule feritinu. Podjednotka H má enzymatickou aktivitu, která mění vysoce reaktivní dvojmocné Fe na uskladnitelné trojmocné Fe, gen pro tuto podjednotku je lokalizovaný na chromozomu 19 (*Arosio et al., 2010*). Podjednotka L je naopak neaktivní částí feritinu a zdá se, že je více odolná degradaci a denaturaci. Jedinou dosud jednoznačně popsanou funkcí podjednotky L je transport elektronů při mineralizaci a demineralizaci Fe iontů (tedy převádění  $\text{Fe}^{2+}$  na  $\text{Fe}^{3+}$  při uskladnění a při přechodu  $\text{Fe}^{3+}$  zpět k dvojmocné formě) (*Carmona et al., 2014*). Gen pro podjednotku L je lokalizovaný na chromozomu 11 (*Arosio et al., 2010*). Poměr podjednotek H:L není fixní a může se měnit s aktuální situací např. při infekci, zánětlivých procesech, při růstu a vývoji organismu, stejně jako odpověď na různé stresové situace. Ve slezině a játrech, kde je železo fyziologicky skladováno, byla v molekule feritinu popsána predominance L podjednotek,

naopak v srdci a ledvinách dominuje podjednotka H (*Torti et al., 2002*). Úplná absence H podjednotek je neslučitelná se životem. Myši s heterozygotní mutací v genu pro H podjednotku mají mírně vyšší hladinu L podjednotek feritinu ve tkáních, ale 7 – 10x vyšší sérový feritin a přesto u nich v dospělém věku nedochází k přetížení železem. Heterozygotní mutace pro H podjednotku by mohla být příčinou vzácně se vyskytujícího syndromu hyperferitinémie bez přetížení Fe, který byl popsán celosvětově u několika rodin (*Ferreira et al., 2001*).



Feritin je současně i reaktantem akutní fáze zánětlivé odpovědi, při zánětlivém procesu se jeho hladina zvyšuje i několikanásobně. Toto zvýšení má za následek hypoferémii v plazmě a tedy nedostupnost Fe pro bakterie.

### **2.3.2 Hemosiderin**

Druhou formou zásobního Fe je hemosiderin – nerozpustný komplex částečně degradovaných multimerů feritinu. Fe zakomponované v hemosiderinu je hůře odbouratelné a reutilizovatelné než ve feritinu. Množství hemosiderinu se zvyšuje při nedostatečné kapacitě feritinu uskladnit přijaté Fe. Akumulace hemosiderinu a plně saturovaného feritinu poškozuje buněčné membrány a intracytoplazmatické komponenty, což má za následek funkční a strukturální postižení buněk životně důležitých orgánů vedoucí k jejich selhání. Nejčastěji bývají postižena játra, slezina, myokard, plicní tkáň a endokrinní orgány (*Coleman, 2012*).

## **2.4 Regulace homeostázy Fe**

Nedostatek Fe i nadbytek Fe mají pro organismus závažné důsledky, proto musí být jeho hladina přísně regulovaná. Omezená možnost exkrece Fe proto musí být kompenzovaná striktní regulací jeho absorpce. Homeostáza Fe je udržována regulačními mechanismy jak na úrovni organismu jako celku (systémově) tak na buněčné úrovni.

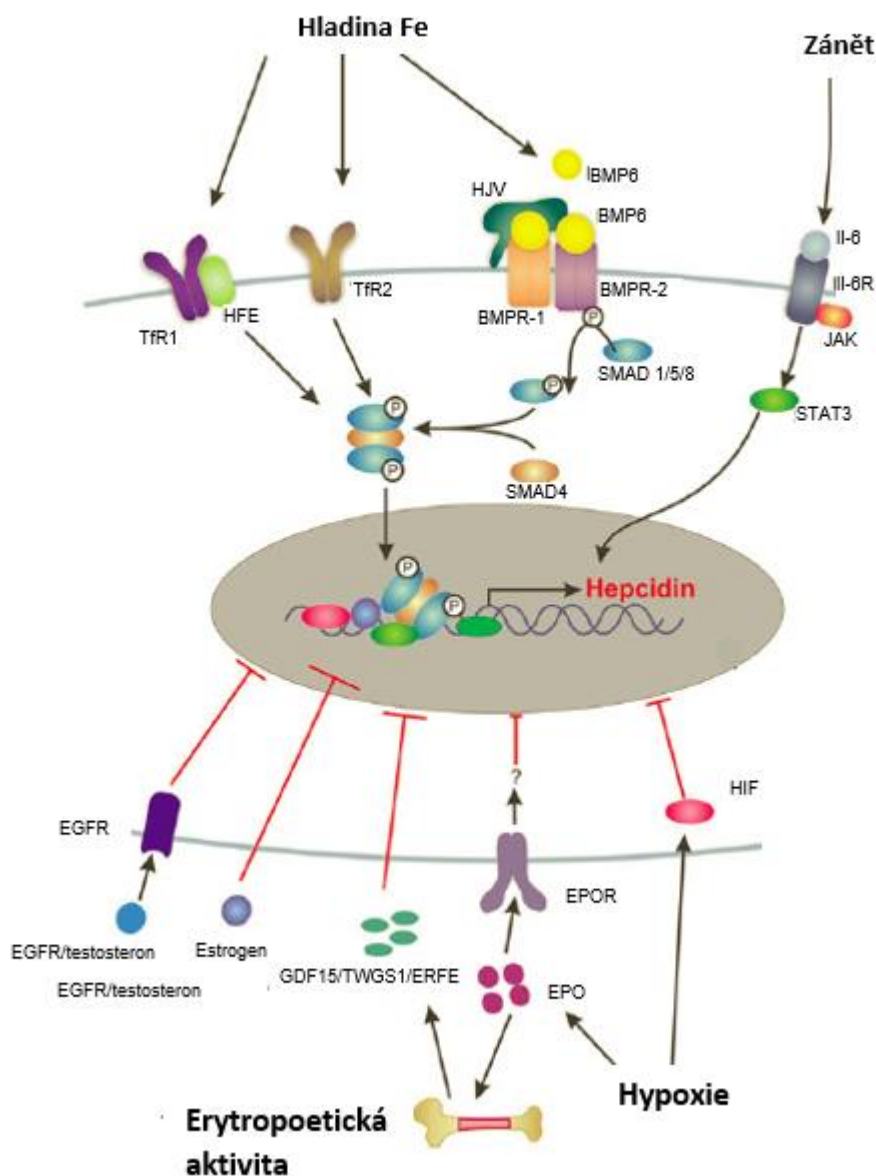
Klíčovou molekulou, která hraje rozhodující roli v udržení homeostázy Fe na systémové úrovni, je hepcidin. Objevení a identifikace tohoto proteinu před 15 lety otevřela novou kapitolu metabolismu Fe a i přes intenzivní výzkum v této oblasti stále zůstává řada otázek nezodpovězených. Na buněčné úrovni je homeostáza Fe regulována posttranskripčně systémem proteinů IRP (iron regulatory protein) a odpovídajících částí mRNA IRE (iron - responsive element).

### **2.4.1 Hepcidin**

V roce 2000 byl z ultrafiltrátu lidské plazmy izolovaný peptid bohatý na cystein. Původní název LEAP-1 (liver-expressed antimicrobial peptide 1) získal podle místa s nejvyšší expresí a podle antimikrobiální aktivity, která byla prokázána na koloniích bakterií G+ rodu *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, G- *Neisseria* a kvasinek *Saccharomyces* (*Krause et al., 2000*). Ve stejnou dobu byla identická molekula s názvem hepcidin izolovaná z moči (*Park et al., 2001*). První spojení hepcidinu a metabolismu Fe pak přinesla studie na myších modelech s přetížením železem (*Pigeon et al., 2001*). Hepcidin je syntetizovaný převážně v játrech jako

preprohormon s 84 aminokyselinami, následně je v několika enzymatických krocích štěpen na biologicky aktivní peptid s 25 aminokyselinami (Valore *et al.*, 2008). Byly popsány peptidy s kratším řetězcem (hepcidin-20 a hepcidin-22), které postrádají na N' konci 5 aminokyselin nezbytných pro regulační funkci metabolismu Fe, proto jsou dnes považovány spíše za inaktivní degradační produkty hepcidinu-25 (Park *et al.*, 2001). Gen pro hepcidin (HAMP) je lokalizovaný na chromozomu 19 a obsahuje 3 exony (Pigeon *et al.*, 2001). Vzájemné interakce hepcidinu a ostatních molekul zúčastněných v regulaci příjmu a redistribuce Fe jsou komplexní a dosud ne plně objasněné. Syntéza hepcidinu je stimulována aktuální hladinou Fe a zánětlivými cytokiny, negativní vliv na syntézu hepcidinu mají zejména zvýšená erythropoetická aktivita a hypoxie (Ganz, 2004; Ganz *et al.*, 2011). Regulaci syntézy hepcidinu znázorňuje Obrázek 3.

**Obrázek 3: Regulace syntézy hepcidinu.**



*Hladina Fe přes signální kaskádu BMP/SMAD stimuluje syntézu hepcidinu, zatímco zánětlivé cytokiny (Il-6) využívají signální dráhu JAK/STAT k přenosu informace do jádra hepatocytu. Hypoxie a zvýšená erythropoetická aktivita suprimují syntézu hepcidinu dosud ne zcela objasněným mechanismem za účasti růstových faktorů EPO, HIF, GDF 15, TWGS 1 a ERFE.*

*Tfr 1,2 transferrinový receptor 1, 2; HFE protein dědičné hemochromatózy; HJV hemojuvelin; BMP 6 bone morfogenic protein 6; BMPR 1,2 bone morfogenic protein receptor 1,2; SMAD 1, 4, 5, 8 Small and Mothers Against Decaplentaplegic protein; JAK janus kinase; STAT 3 signal transducers and activators of transcription; Il-6 interleukin 6; Il-6R receptor pro Il-6; HIF hypoxií indukovaný faktor; EGFR receptor pro epidermální růstový faktor; GDF 15 růstový diferenciační faktor 15; TWGS 1 twisted gastrulation homolog protein 1; ERFE erytroferon; EPO erythropoetin, EPOR receptor pro erythropoetin*  
*Převzato a upraveno: Rishi et al., 2015.*

### **2.4.1.1 Hpcidin a hladina železa**

#### **2.4.1.1.1 BMP/SMAD**

Regulace exprese hepcidinu aktuální hladinou Fe není jednoznačně objasněna. Existuje více signálních a regulačních molekul, které zprostředkují informace o aktuální hladině Fe v hepatocytu a mění expresi hepcidinu. Zásadní roli v regulaci produkce hepcidinu hladinou Fe má signální dráha BMP/SMAD (Bone morfogenic protein/Small and Mothers Against Decapentaplegic protein). BMP patří do rodiny cytokinů TGF  $\beta$ . Tyto růstové faktory ovlivňují vývoj a proliferaci buněk, jejich diferenciaci a apoptózu. Zpětná vazba hladiny Fe na syntézu hepcidinu je právě zprostředkovná BPM/SMAD signální dráhou (*Parrow et al., 2014*). Po vazbě BMP na receptorový komplex na povrchu buňky dochází k aktivaci receptorové kinázy a fosforylaci cytoplazmatických proteinů SMAD 1, 5 a 8. V dalším kroku se tyto fosforylované SMAD spojují s proteinem SMAD 4, vytváří komplex SMAD - SMAD 4, který po translokaci do jádra indukuje transkripci cílového genu, např. hepcidinu (*Kautz et al. 2008; Meynard et al., 2009*). U savců bylo popsáno přes 20 různých BMP. Mezi nimi má v regulaci exprese hepcidinu nezastupitelné postavení pouze BMP 6. Pokud dojde k jeho úplnému vyřazení, jeho funkci nemůže zastoupit jiný BMP a dochází k rozvoji závažného přetížení železem (*Meynard et al., 2009; Andriopoulou et al., 2009; Core et al., 2014*). BMP 6 je exprimovaný hlavně v endoteliích jaterních sinusoid, které jsou v úzkém kontaktu s plazmou. Jakým způsobem je řízena exprese BMP 6 v hepatocytech hladinou plazmatického Fe, zatím zůstává nejasné (*Zhao et al., 2013*). Při mutaci SMAD 4 selektivně v hepatocytech dochází u takto mutovaných myší k výrazné supresi mRNA hepcidinu, jejímž důsledkem je opět závažné přetížení železem (*Wang et al. 2005*).

#### **2.4.1.1.2 Hemojuvelin (HJV)**

Hemojuvelin (HJV, hemochromatosis type 2A) je membránový protein s glykosylfosfatidylinositolovou kotvou, exprimovaný výhradně v hepatocytech. Je koreceptorem BMP 6, homozygotní nebo dvojitá heterozygotní mutace genu pro HJV významně snižuje expresi hepcidinu a má za následek onemocnění juvenilní hemochromatózou, vede u pacientů k závažnému přetížení železem – právě v důsledku nízkých hladin hepcidinu (*Babitt et al., 2006*). HJV  $-/-$  mutantní myši mají sníženou expresi hepcidinu, i přesto, že mají vyšší expresi BMP 6, z čehož je patrné, že HJV je esenciální pro signální dráhu BMP/SMAD (*Niederkofler et al., 2005*). Kromě BMP 6 se HJV váže také na neogenin, transmembránový protein exprimovaný ve většině buněk, který zpětnou vazbou reguluje

sekreci HJV. Jeho účast v regulaci metabolismu Fe dokládá studie na myším modelu s mutovaným genem pro neogenin, což u těchto myší vede k přetížení železem (*Zhao et al., 2014*).

Do regulace hepcidinu přes HJV zasahuje enzym matriptáza - 2, která je kódovaná genem *TMPRSS6* (transmembrane protease, serin 6 gene) a je nejvýznamnější molekulou s inhibičním účinkem na expresi hepcidinu. Matriptáza - 2 odstraňuje z cirkulace HJV, pokud je její enzymatická aktivita snížena v důsledku mutace *TMPRSS6* genu, v hepatocytech dochází k neadekvátně zvýšené expresi hepcidinu, což je podstatou anémie refrakterní na železo (IRIDA). Tito pacienti v důsledku vysokých hladin hepcidinu neodpovídají na orální podávání Fe preparátů a jen částečně na parenterální podání Fe (*Silvestri et al., 2008; Heeney et al., 2014; Rausa et al., 2015*).

#### **2.4.1.1.3 Protein dědičné hemochromatózy**

Informace o aktuálním množství cirkulujícího Fe je zřejmě zprostředkována také proteinem dědičné hemochromatózy (HFE) a TfR. HFE se váže na TfR 1 a tato vazba je kompetitivní s diferickým Tf. Pokud se zvýší hladina saturovaného transferinu, je HFE z komplexu HFE-TfR 1 vytěsněn a dojde k vazbě diferického Tf, což je pravděpodobně podstatný krok k zahájení signální kaskády vedoucí k expresi hepcidinu (*Schmidt et al., 2008*). HFE je schopen se také vázat na TfR 2, který je považovaný za marker saturace transferinu (*Goswami et al., 2006; Gao et al., 2009*). Významnost TfR2 a HFE dokládá studie na myším modelu s vyřazením jednoho nebo obou těchto proteinů z funkce. Dysregulace exprese hepcidinu a stupeň přetížení Fe je markantnější při vyřazení obou proteinů než při chybění pouze jednoho z nich (*Wallace et al., 2009*). Novější studie prokazují, že HFE reaguje s BMP receptorem Alk3 (aktivin - like kinase 3), stabilizuje tento protein v membráně a zesiluje signál přenášený komplexem BMP/SMAD a tím ovlivňuje expresi hepcidinu v jaterních buňkách (*Wu et al., 2014*).

#### **2.4.1.2 Hepcidin a zánětlivá aktivita**

Regulace syntézy hepcidinu v přítomnosti zánětu je zprostředkována signální dráhou JAK/STAT 3 (JAnus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription 3). Její aktivace je zahájena po stimulaci zánětlivými cytokiny (lipopolysacharid, Il-6). Il-6 v lidských jaterních buňkách zvyšuje expresi hepcidinu, zatímco cytokiny I. fáze zánětlivé odpovědi (např. tumor nekrotizující faktor alfa a interleukin 1 alfa) expresi hepcidinu neovlivňují. Hepcidin je

tedy reaktantem II. fáze zánětlivé odpovědi (Nemeth et al., 2002; Nemeth et al., 2004). Mechanismus aktivace signální dráhy je obdobný jako u BMP/SMAD – po navázání ligandu (např. Il-6) na receptor dojde k aktivaci signální dráhy, jejímž výsledkem je fosforylace STAT 3. Aktivovaný STAT 3 je následně translokovaný do jádra, kde se váže na příslušné transkripční faktory a zprostředkuje transkripční aktivaci nebo inhibici cílových genů (Yu et al., 2014).

#### **2.4.1.3 Hepcidin a erytropoetická aktivita**

Kostní dřeň vyžaduje k udržení vyváženého stavu erytropoézy neustálý přísun Fe. Jeho hlavním zdrojem v kostní dřeni jsou makrofágy, které obsahují recyklované Fe z fagocytovaných senescentních erytrocytů. Menší množství Fe je do kostní dřene transportováno transferinem. Studie na myších modelech prokazují zvýšení hladiny hepcidinu v případě snížené erytropoetické aktivity – např. po ozáření nebo po podání transfuze (Vokurka et al., 2006). Tyto výsledky naznačují, že míra erytropoetické aktivity kostní dřene je přímo nebo zprostředkovaně regulačním mechanismem exprese hepcidinu. Nejsilnější erytropoetickou signální molekulou je erythropoetin, který dynamicky reaguje na aktuální potřeby organismu stran zásobení kyslíkem. Je syntetizovaný v ledvinách, v buňkách kostní dřene se váže na erythropoetinový receptor a iniciuje proliferaci a diferenciaci erytroidních prekurzorů. Je signální molekulou zejména časných stádií erytropoézy. Po podání EPO se u člověka snižuje hladina hepcidinu, což vede ke zvýšení příjmu Fe enterocyty a tedy ke zlepšení dostupnosti Fe pro potřeby erytropoézy (Ashby et al., 2010). EPO pravděpodobně není přímým supresorem hepcidinu (Sasaki et al., 2012).

Kandidátními erytropoetickými molekulami, které hrají dosud ne zcela přesně definovanou roli v regulaci syntézy hepcidinu, jsou růstový diferenciací faktor (GDF 15), twisted gastrulation homolog protein (TWSG 1) a nově objevený erytroferon (ERFE).

##### **2.4.1.3.1 Růstový diferenciací faktor 15**

GDF 15 je členem rodiny transformujících růstových faktorů beta, která zahrnuje více než 40 dalších členů a jejíž vliv se uplatňuje zejména při buněčné diferenciaci, vyžrávání a apoptóze (Whitman, 1998). Strukturálně má GDF 15 ojedinělé postavení v této rodině, protože přítomností na cystein bohatých domén je vysoce homologní s ostatními členy TGF  $\beta$  rodiny, avšak je minimálně homologní pořadím aminokyselin (méně než 30%). (Bootcov et al., 1997). Hladina GDF 15 se zvyšuje u onemocnění, která jsou spojena s neefektivní erytropoézou a apoptózou vyžrávajících erytroidních prekurzorů (např. talasémie, kongenitální

dyserythropoetická anémie, Diamondova – Blackfanova anémie, deficit pyruvátkinázy nebo refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty (Nemeth, 2010; Shalev et al., 2013; Pospisilová et al., 2014 – příloha č. 1; Mojzíkova et al., 2014; Ramirez et al., 2009). Na druhou stranu GDF 15 se nezvyšuje u pacientů s expandující efektivní erytropoézou; po HSCT nebo podání syntetického EPO nebyl zaznamenán signifikantní nárůst hladin GDF 15 (Kanda et al., 2008; Ashby et al., 2010). Lze tedy předpokládat, že GDF 15 uplatňuje svůj vliv pouze u patologické erytropoézy a může být využit ke sledování aktivity neefektivní erytropoézy. (Musallam et al., 2011). V promotorové oblasti genu pro GDF 15 jsou dvě vazebná místa pro protein p53. (Lim et al., 2007; Li et al., 2000). Protein p53 je tumor supresorovým proteinem, který svou vazbou na příslušné oblasti genů reguluje jejich transkripci, a proto je syntéza GDF 15 na buněčné úrovni spojena se současným pozastavením buněčného cyklu a indukci apoptózy. (Bauskin et al., 2006; Tan et al., 2000).

Onemocnění charakterizovaná neefektivní erytropoézou jsou často spojena se současným přetížením Fe. Příčinou bývá neadekvátní suprese hepcidinu expandující (zčásti neefektivní) erytropoézou, jejíž signály jsou zřejmě nadřazeny signálům o stavu zásob Fe. Po přidání GDF 15 do kultury hepatocytů *in vitro* dochází k supresi mRNA hepcidinu, zřejmě přes signální dráhu SMAD 2/3 – SMAD 4. U pacientů s talasemií major je hladina GDF 15 signifikantně zvýšená a koreluje se stupněm neefektivní erytropoézy. Flebotomie provedená u myši GDF 15 <sup>-/-</sup> a „wild-type“ však vedla ke stejné supresi mRNA hepcidinu (Tanno et al., 2007). Z těchto výsledků lze usuzovat, že za fyziologických okolností GDF 15 nevede k supresi hepcidinu, mohl by svůj vliv ale uplatňovat při supresi hepcidinu u onemocnění s neefektivní erytropoézou. Nízká hladina hepcidinu vede k vyšší expresi feroportinu v enterocytech a tedy k vyššímu příjmu Fe z potravy (Nemeth, 2010). GDF 15 je tedy jedním z navrhovaných erytroidních regulačních proteinů syntézy hepcidinu, pravděpodobně však svůj vliv uplatňuje pouze u stavů s neefektivní erytropoézou.

#### **2.4.1.3.2 Twisted gastrulation protein homolog 1**

Twisted gastrulation protein homolog 1 (TWGS 1) je produkovaný časnými stádii erytroidních prekurzorů. TWGS 1 v lidských buněčných liniích snižuje expresi hepcidinu inhibicí stimulačních signálů pro BMP 2 a BMP 4. U talasemických myši byla detekovaná signifikantně vyšší exprese TWGS 1 ve slezině, v játrech a v kostní dřeni (Tanno et al., 2009). Pravděpodobně ale ani TWGS 1 není přímým regulačním proteinem hepcidinu, kterým by erythropoetická aktivita ovlivňovala syntézu hepcidinu. U myši se během 24 hodin po krvácení

výrazně snižuje hladina hepcidinu, zatímco odpovídající změna exprese TSWG 1 nebyla pozorovaná (Kautz *et al.*, 2014).

#### **2.4.1.3.3 Erytroferon**

Intenzivní výzkum v oblasti metabolismu Fe v minulém roce vedl k identifikaci hormonu erytroferonu (ERFE), který je uvolňovaný erytroblasty jako odpověď na flebotomii nebo injekci EPO. ERFE je produktem genu *Fam132b* a patří do rodiny příbuzné C1q/tumor nekrotizujícímu faktoru. ERFE  $-/-$  myši vykazují opožděnou supresi hepcidinu po flebotomii nebo po podání EPO, což prokazuje, že ERFE je nezbytný k rychlé odpovědi syntézy hepcidinu na akutní zvýšení erythropoetického úsilí organismu. Je zapotřebí dalšího výzkumu k rozpoznání mechanismu účinku ERFE, také dosud není objasněna signální dráha, kterou zvýšená hladina ERFE v hepatocytech reguluje syntézu hepcidinu (Kautz *et al.*, 2014).

#### **2.4.1.4 Hepcidin a hypoxie**

Lidský organismus je velmi citlivý k nedostatečné dodávce kyslíku do tkání. Existuje proto více regulačních a signálních molekul, kterými buňky reagují na nižší přísun kyslíku. Hypoxií indukovaný faktor (HIF) je transkripční faktor, který se skládá ze tří podjednotek – HIF 1alfa, HIF 2alfa a HIF 3alfa. Pokud je množství kyslíku dostatečné, jsou tyto podjednotky pozměněné enzymem prolylhydrogenázou a jsou degradovány v proteozomech. Při sníženém parciálním tlaku kyslíku je prolylhydrogenáza inaktivní, čímž dojde ke stabilizaci podjednotek HIF a po translokaci do jádra komplex reguluje expresi specifických cílových genů. Podjednotka HIF 1alfa se váže na HRE (hypoxia - responsive element) v promotorové oblasti genu pro hepcidin a snižuje tím jeho expresi, jak v buněčné linii HEK 293 (lidské embryonální ledviny), tak v jaterní tkáni myši (Peyssonnaud *et al.*, 2007; Greer *et al.*, 2012).

#### **2.4.2 *IRP (iron regulatory protein) a IRE (iron-responsive element)***

Na buněčné úrovni je homeostáza Fe udržována systémem IRP (iron-responsive protein) a IRE (iron-responsive element). IRP1 a 2 jsou cytosolické proteiny, které jsou schopné se vázat na mRNA a tím postranlačně regulovat její expresi. IRE je specifická sekvence mRNA na 5' nebo 3' nepřekládaném konci genů kódujících proteiny účastnících se příjmu, skladování a výdeje Fe buňkami. Jedná se o například o gen pro feroportin (FPN), feritin, transferin, transferinový receptor a DMT 1 (divalent metal transporter 1). Pokud se IRP váže na mRNA na 5' konci, dochází ke snížení translace, pokud se IRP naváže na 3' konec mRNA, pak se



translace zvýší. Aktivita IRP závisí na množství Fe v buňce. V případě nedostatečného množství intracelulárního Fe se IRP1 a IRP2 vážou na IRE mRNA výše zmíněných genů a mění jejich expresi. Tímto mechanismem každá buňka řídí postranskripčně svoji vlastní homeostázu Fe, kdy se například při nedostatku Fe zvyšuje exprese transferinového receptoru nezbytného pro příjem Fe a naopak snižuje exprese feritinu jakožto proteinu zásobního (*Pantopoulos et al., 2004; Rouault et al., 2006; Wallander et al., 2006; Anderson et al., 2012*).

Regulace homeostázy Fe je komplexní proces, který je řízen na několika úrovních. V posledních letech dochází k výrazným pokrokům v pochopení vzájemných vztahů homeostázy Fe mezi jednotlivými regulačními proteiny a potřebami organismu (např. zánětlivá odpověď organismu nebo stavy spojené s tkáňovou hypoxií), na druhou stranu stále existují nerozpoznané interakce na buněčné úrovni a další výzkum je proto nezbytný.

### **3 Talasémie**

Talasémie tvoří heterogenní skupinu geneticky podmíněných onemocnění červené řady. Společným rysem pro všechny talasemické syndromy je defektní či chybějící syntéza jednoho nebo více globinových řetězců v molekule hemoglobinu. U zdravých lidí je hemoglobin tvořený čtyřmi podjednotkami, každá z nich se skládá z hemové skupiny a globinového řetězce. Právě globinové řetězce určují typ hemoglobinu, zatímco hemová struktura je vždy identická. Existuje celkem šest různých globinových řetězců: alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), gamma ( $\gamma$ ), delta ( $\delta$ ), epsilon ( $\epsilon$ ), zeta ( $\zeta$ ). Více než 95% Hb dospělého člověka tvoří hemoglobin A (Hb A), který je složený ze dvou alfa a dvou beta řetězců ( $\alpha\alpha/\beta\beta$ ). Minoritně jsou pak u dospělého člověka zastoupeny Hb A2 ( $\alpha\alpha/\delta\delta$ ) a fetální Hb F ( $\alpha\alpha/\gamma\gamma$ ). V průběh ontogeneze se vyskytují embryonální Hb Gower – 1 ( $\zeta\zeta/\epsilon\epsilon$ ), Hb Gower – 2 ( $\alpha\alpha/\epsilon\epsilon$ ) a Hb Portland ( $\zeta\zeta/\gamma\gamma$ ), které jsou postupně ve druhém trimestru nahrazovány fetálním Hb F. Vyšší afinita Hb F ke kyslíku zaručuje dostatečnou oxygenaci tkání plodu.

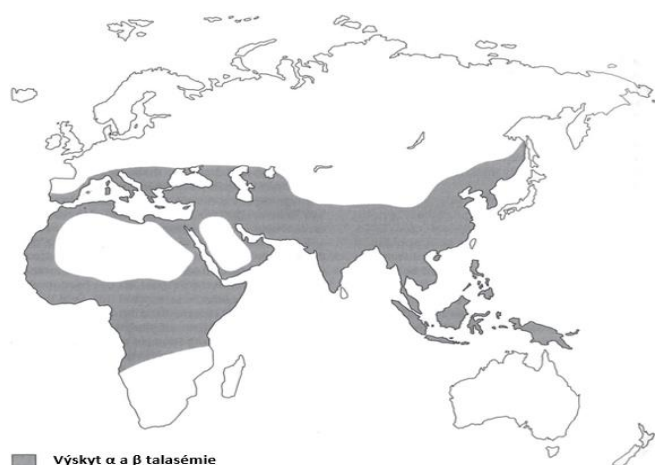
Syntéza jednotlivých globinových řetězců je přísně regulovaná. Geny pro šest různých globinových řetězců jsou lokalizované na chromozomu 11 (beta – like řetězce:  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  a  $\epsilon$ ) a chromozomu 16 (alfa-like řetězce:  $\alpha$  a  $\zeta$ ) a jsou seřazeny v pořadí, v jakém jsou během ontogeneze exprimované. Pokud není syntéza globinů narušená, pak poměr alfa-like a beta-like řetězců v molekule hemoglobinu je roven  $1,00 \pm 0,05$ . V případě pacientů s talasemií je ale tento poměr narušený sníženou nebo úplnou absencí jednoho z řetězců, což vede k akumulaci

nadbytečných nepostížených globinových řetězců, které nemohou být spárované (Schechter, 2008).

### 3.1 Definice a epidemiologie

Talasemie postihuje až 7% celosvětové populace, ale její maximum je koncentrované do oblastí Středomoří, zemí Blízkého východu, Indie, jihovýchodní Asie a severní Afriky (Obrázek 4). Mluvíme o takzvaném talasemickém pásu. Mezi evropské oblasti s nejvyšší prevalencí beta talasemie patří Řecko, Kypr a Sardinie (6 – 19%). Vysoká koncentrace mutovaných alel v oblasti talasemického pásu vede k častějšímu výskytu dvojitých heterozygotních nosičů talasemické alely nebo ke kombinaci talasemického nosičství s jiným typem hemoglobinopatie u jednoho pacienta. V důsledku globalizace a migrace dochází také v posledních letech k rozšíření talasemických alel i do oblastí dříve postižených minimálně (Angastiniotis *et al.*, 1998; Weatherall *et al.*, 2001). V zemích s vysokým výskytem talasemie je zároveň vysoká prevalence malárie a je pravděpodobné, že přítomnost talasemické alely jedincům poskytuje určitou selektivní výhodu (Mockenhaupt *et al.*, 2004). Například genotyp  $\alpha\alpha/\alpha-$  je spojený s o 40% nižším rizikem úmrtí na malárii při srovnání se zdravou populací, u genotypu  $\alpha-/alpha-$  je toto riziko nižší až o 60% (Williams *et al.*, 2005). Přesný mechanismus této rezistence k onemocnění malárií není známý, pravděpodobně se podílí snížení replikační schopnosti plazmodia v postižených erythrocytech a zvýšená destrukce infikovaných erythrocytů (Pattanapanyasat *et al.*, 1999; Ayi *et al.*, 2004).

**Obrázek 4: Světová distribuce talasémie.**



Nejvíce postižené oblasti tvoří tzv. talasemický pás, který zahrnuje oblasti Středomoří, zemí Blízkého východu, Indie, jihovýchodní Asie a severní Afriky.

Převzato a upraveno: Williams *et al.* 2012.

### 3.2 Patofyziologie

Talasemie dělíme podle chybějícího nebo sníženě syntetizovaného globinového řetězce na alfa talasemie (mutace v genu nebo genech pro  $\alpha$  řetězec) a beta talasemie (mutace v genu pro  $\beta$  řetězec). Postižena může být jedna alela (heterozygotní forma, talasemie minor) nebo obě alely (homozygotní forma, talasemie major).  $\beta$  globinové řetězce jsou na každém chromozomu pouze v jedné kopii, jiná situace je u  $\alpha$  globinových řetězců, které jsou na každém chromozomu ve dvou kopiích ( $\alpha 1$  a  $\alpha 2$ ). Delece všech čtyř genů pro  $\alpha$  globinový řetězec je neslučitelná se životem, protože tento řetězec je součástí fetálního hemoglobinu, plod se nemůže vyvíjet a dochází k fetálnímu hydropsu (*Chui et al., 1998*).

Nebalancovaná syntéza globinových řetězců má za následek akumulaci volných nespárovaných řetězců normálně syntetizovaného globinu. Precipitace těchto volných řetězců vede k poškození intracelulárních membrán a tím ke zvýšené apoptóze erytroidních prekurzorů. Výsledný počet uvolněných zralých erytrocytů neodpovídá množství erytroidních prekurzorů, které vstoupí do diferenciaci (neefektivní erytropoéza). I tyto zralé erytrocyty však obsahují inkluze precipitovaných nespárovaných globinových řetězců a jsou proto zvýšeně destruované monocyt – makrofágovým systémem (*Mehta, 2012; Benz et al., 2015*).

### 3.3 Klinická manifestace

Klinická manifestace odpovídá stupni snížení syntézy daného globinového řetězce. Pacienti s talasemií minor bývají asymptomatictí, v laboratorním vyšetření nacházíme mikrocytózu erytrocytů, normální nebo zvýšený počet erytrocytů, v nátěru periferní krve různé morfologické odchylky (terčovité erytrocyty, dakrocyty). Na druhé straně pacienti s homozygotní formou talasemie mají výraznou mikrocytární anémii s hodnotami hemoglobinu 30 – 50g/l. Celoživotně jsou závislí na pravidelné substituci erytrocytárními koncentráty, což vede k akumulaci Fe a jeho ukládání v parenchymatózních orgánech (*Martin et al., 2013; Benz et al., 2014*).

Klinicky lze odlišit jedince, jejichž hladiny hemoglobinu jsou nižší než u jedinců s talasemií minor a transfuzi vyžadují pouze ojediněle. Řadí se do skupiny talasemia intermedia (*Haddad et al., 2014*). I přesto, že příjem Fe transfuzemi je u nich minimální, dochází po letech trvání choroby k přetížení Fe, pravděpodobně alterací regulačních mechanismů příjmu Fe neefektivní erytropoézou (*Taher et al., 2009*).

## Alfa talasemické syndromy

Alfa talasémie je způsobená ztrátou jedné nebo více alel pro alfa globinový řetězec, při syntéze hemoglobinu se v buňce hromadí nadbytek nespárovaných beta globinových řetězců. U člověka je genový lokus pro alfa globin na chromozomu 16 duplikovaný, může tedy dojít ke ztrátě jednoho, dvou, tří nebo všech čtyř genů.

*Alfa talasemie minima* – delece jednoho genu se většinou neprojeví ani klinicky ani při vyšetření krevního obrazu. Elektroforéza hemoglobinu je normální. Jedinou možností identifikace těchto jedinců je DNA sekvenování.

*Alfa talasemie minor* – k deleci dvou genů může dojít na jednom chromozomu ( $\alpha\alpha/--$ , cis forma), nebo na po jednom genu na každém chromozomu ( $\alpha-/ \alpha-$ , trans forma). Jedinci s alfa talasemií minor mají mírnou anémii, mikrocytózu a hypochromii erytrocytů. Na rozdíl od pacientů s beta talasemií minor nenacházíme zvýšení Hb A2 (Mehta, 2012).

*Hemoglobin H* – při ztrátě tří funkčních genů pro alfa globinový řetězec je výrazný nadbytek beta globinových řetězců, které spontánně agregují do tetramerů. Výsledkem je hemoglobin H ( $\beta\beta/\beta\beta$ ), který je detekovatelný při elektroforéze Hb. Hb H ale není schopný přenášet do tkání kyslík, protože disociační křivka pro kyslík je výrazně posunutá doleva (Benz et al., 2014). Pacienti s hemoglobinem H bývají symptomatictí již při narození, protože alfa globin je součástí fetálního Hb, po narození bývá proto přítomný ikterus a anémie. Intrauterinně volné gamma řetězce agregují do tetramerů (Hb Bart), při elektroforéze Hb v prvních týdnech života je detekovatelný v koncentraci 20 – 40%. V průběhu života jsou nejčastější příznaky důsledkem chronické hemolýzy – hepatosplenomegalie, ikterus, cholecystolithiáza. Dysregulace metabolismu Fe u těchto pacientů vede v pozdějším věku k hemosideróze jater a myokardu i přesto, že většina pacientů nevyžaduje transfuze erytrocytárních koncentrátů (Benz et al., 2014; Mehta, 2012; Lorey et al., 2001).

*Alfa talasemie major* – delece všech čtyř genů pro alfa globin je neslučitelná s extrauterinním životem. Při naprosté absenci alfa globinových řetězců dochází intrauterinně k tvorbě gamma tetramerů (Hb Bart), který má desetinásobně vyšší afinitu ke kyslíku. Chronická hypoxie způsobuje závažné poruchy vývoje plodu a v důsledku srdečního selhávání k prosáknutí všech tkání. Většina plodů umírá intrauterinně, bylo však popsáno několik případů živě narozených, ti však umírají během prvních hodin života (Carr et al., 1995). Současně dochází k ohrožení života matky, zejména toxémií, polyhydramnionem, akutním hemoragickým šokem aj. (Chui et al., 1998; Mehta, 2012)

## **Beta talasemické syndromy**

Mutace v genu pro beta globinový řetězec vedou k beta talasémii. Historicky se beta talasémie dělily podle klinického průběhu na formu minor, intermedia a major. Zavedení DNA sekvenování identifikuje i pacienty s tzv. tichým nosičstvím talasémie. Pacienti mají v jednom genu pro beta globinový řetězec mutaci, která vede jen k velmi diskrétnímu snížení produkce beta řetězce a žádným odchýlkám v krevním obraze (*Thein, 2005; Mehta, 2012*).

Pacienti s *beta talasemií minor* obvykle mají výraznou mikrocytózu, hypochromii erytrocytů, kompenzatorní erytrocytózu a mohou mít mírnou anémii. V nátěru periferní krve se vyskytují různé formy patologických tvarů erytrocytů, např. poikilocyty, eliptocyty a terčovité erytrocyty, může být přítomné bazofilní tečkování. U některých pacientů je přítomná hepatomegalie a splenomegalie. Slezina je hmatná u méně než 20 procent jedinců, při ultrazvukovém vyšetření mají tito pacienti slezinu větší o 29 - 67 procent než zdravé kontroly (*Tassiopoulos et al., 1995; Karimi et al., 2009*). Naprostá většina pacientů během svého života nevyžaduje podání transfuze.

*Beta talasemie intermedia* je definovaná jako talasemie se závažnější anémií než u talasemie minor, která však k udržení stabilní hladiny hemoglobinu a kvality života pacienta nevyžaduje pravidelnou substituci krevními deriváty. U většiny pacientů se hladina hemoglobinu pohybuje nad 70g/l. Genotyp pacientů je značně heterogenní, od homozygotní formy mutací vedoucích k mírnému snížení syntézy řetězců až po dvojitě heterozygotní mutace s různým dopadem na syntézu globinu (*Galanello et al., 1998; Taher et al., 2010*). Na druhé straně spektra stojí triplikace alfa globinového lokusu u heterozygotního nosičství beta talasemie, která také v důsledku narušení poměru  $\alpha:\beta$  řetězců vede k talasemii intermedia (*Oron et al., 1994*). Klinická manifestace beta talasemie intermedia je velmi rozdílná – různě závažná anémie s charakteristickými talasemickými rysy (mikrocytóza, hypochromie, erytrocytóza, patologické morfologické odchylky erytrocytů v nátěru periferní krve). Pacienti s tímto typem talasemie i přes absenci chronické erytrocytární substituce trpí komplikacemi z přetížení železem. Akumulace Fe je pravděpodobně způsobena alterací regulace příjmu Fe ze stravy. Klíčový význam má v tomto případě neefektivní erytropoéza, která přes dosud neobjasněnou signální dráhu, snižuje hladinu hepcidinu s následným zvýšením příjmu Fe ze stravy (*Tanno et al., 2007; Origa et al., 2007*). Přetížení Fe se u těchto pacientů objevuje o 10 – 20 let později než u pacientů s pravidelným podáváním transfuzí. V následujících letech se dá očekávat, že intenzivní výzkum v oblasti terapeutických zásahů do regulace metabolismu Fe povede ke zlepšení prognózy pacientů s talasemií.

*Beta talasemie major* - nejzávažnějším talasemickým syndromem je beta talasemie major. Inaktivace obou beta globinových genů způsobuje úplnou absenci nebo výrazně sníženou syntézu beta globinového řetězce. Volné alfa řetězce jsou nestabilní a spontánně agregují do tetramerů. Vytvořená inkluzní tělíčka vedou k neefektivní erytropoéze v kostní dřeni a také zkrácení životního cyklu erytrocytu předčasným rozpadem ve slezině (Olivieri, 1999). Intrauterinně a během prvních měsíců života jsou homozygotní jedinci asymptomatictí, protože Hb F ( $\alpha\alpha/\gamma\gamma$ ) je dominujícím hemoglobinem a jeho syntéza není ovlivněna. Při následném snižování Hb F a neadekvátním zvyšování Hb A se objevuje závažná mikrocytární, hypochromní anémie, většina pacientů je diagnostikovaná do 2 let věku. Klinické projevy talasemie jsou kombinací čtyř patologických stavů – anémie X chronické hemolýzy X přetížení Fe X expanze erytropoézy. Trvalá hemolýza má za následek ikterus, splenomegálii a hepatomegálii a tvorbu žlučových kamenů. Současně se na hepatomegálii a fibrózní přestavbě uplatňuje vliv akumulovaného Fe a u některých pacientů i koincidence infekční virové hepatitidy B a C. (Benz et al., 2014; Mehta, 2012). Chronická hypoxie způsobuje expanzi erytropoézy extramedulárně – v játrech, slezině, ledvinách a také tumoriformních masách v mediastinu nebo retroperitoneu (Dragean et al., 2011). Kostní abnormality jsou také důsledkem expanze erytropoézy, nejznatelnější jsou v obličejí – prominence a zvětšení maxily, relativně malý nos a vystupující horní řezáky (facies talasemica), rozšíření dřevné dutiny a ztenčení kompakty plochých kostí se projevují typickým radiologickým nálezem „hair-on-end“. Patologické fraktury obratlů a dlouhých kostí jsou důsledkem osteopenie a osteoporózy u adolescentů a mladých dospělých (Basu et al., 2009). Zvýšený obrát Fe při expanzi erytropoézy a exogenní přívod Fe transfuzemi mají za následek hemosiderózu jater, sleziny, myokardu a endokrinních žláz. Endokrinopatie zahrnují hypogonadismus (40 – 55%), růstovou retardaci (33%), diabetes mellitus (6 – 13%), hypothyreózu a hypoparathyreózu (10 – 11%). Časně zahájená chelatační léčba zastavuje progresi postižení, není však jasné, jestli již vzniklé změny jsou reverzibilní (Fung et al., 2006; Vogiatzi et al., 2009). Kardiální postižení je častou příčinou smrti, kombinace chronické anémie a hemosiderózy myokardu způsobuje poruchy rytmu, ischemickou chorobu srdeční, dilataci levé komory a v neposlední řadě srdeční selhávání (Pepe et al., 2013). Kvalitu života pacientů s talasemií výrazně ovlivňuje bolest. Multicentrická prospektivní studie s účastí 258 subjektů dokumentuje negativní vliv bolesti na kvalitu života jednotlivce. 81% pacientů pociťovalo v posledním roce bolesti, v intervalu 5 let pak 31%. Nejčastěji se jednalo o bolesti hlavy, střední a dolní části zad a bolesti nohou. Při regresní

analýze výskyt bolesti koreloval s věkem, ne však s tíží anémie, typem talasemie, počtem transfuzí, chelatační léčbou ani kostní denzitou (*Haines et al. 2013*).

### 3.4 Diagnostika

V krevním obraze pacientů s talasemií nacházíme výraznou mikrocytózu (pod 65 fl) a hypochromii (pod 20 pg/l) erytrocytů. Kompenzačně je zvýšený počet červených krvinek a retikulocytů, v důsledku neefektivní erythropoézy však zvýšení počtu retikulocytů neodpovídá tíži anémie. Distribuční šíře erytrocytů bývá normální, nebo jen lehce zvýšená. V nátěru periferní krve jedinců s talasemií minor jsou přítomné mikrocytární a hypochromní erytrocyty bikonkávního tvaru, na rozdíl od pacientů s beta talasemií major, u kterých se častěji vyskytuje poikilocytóza, terčovité erytrocyty, eliptocyty, jaderné erytrocyty a bazofilní tečkování. Osmotická rezistence erytrocytů je zvýšená (*Sirichotiyakul et al., 2004*). Pro kostní dřev talasemických jedinců je typická erytroidní hyperplazie (poměr myeloidní a erytroidní řady může být 1:20, u zdravých lidí se tento poměr pohybuje 1.5 – 3:1) (*Benz et al., 2014*). Elektroforéza Hb identifikuje pacienty s abnormálním spektrem, např. pacienti s beta talasemií minor mají až dvojnásobně zvýšenou hladinu HbA<sub>2</sub>, u některých jedinců bývá zvýšený i HbF. V případě bodových mutací se uplatňují molekulárně genetické metody – polymerázová řetězová reakce, real-time polymerázová řetězová reakce, hybridizace se specifickými DNA sondami a sekvenování DNA (*Divoky et al., 2005*). Dosud již bylo identifikováno přes 300 delečních a bodových mutací vedoucích k beta talasemií.

### 3.5 Léčba

Pacienti s talasemií minor většinou nevyžadují žádnou léčbu. Zejména v zemích, kde se nosičství talasemie vyskytuje minoritně (včetně České republiky), jsou často tyto pacienti mylně léčeni preparáty Fe. Mikrocytární a hypochromní anémie je v tomto případě považována za anémii sideropenickou. Nosičství talasemie je pak diagnostikované až při neadekvátní odpovědi na tuto léčbu. Základem terapie těžších forem talasemie (intermedia a major) je substituce erytrocytárními koncentráty. Pacienti s talasemií intermedia vyžadují léčbu transfuzemi erytrocytů v dětství a v době dospívání jen ojediněle a k pravidelné substituční terapii, pokud vůbec musí být zahájena, dospějí až po ukončení druhé dekády života. Pacienti s talasemií intermedia v pozdějším věku trpí přetížením Fe v důsledku alterace metabolismu Fe neefektivní erythropoézou (*Taher et al., 2009*). Transfuze tuto patologickou krvetvorbu potlačuje a vede ke zvýšení hladiny hepcidinu a tedy ke snížení absorpce Fe ve střevě (*Pasricha et al., 2013*). U beta talasemie major se průměrná hladina hemoglobinu pohybuje kolem 30g/l, a proto tyto

pacienti zahajují pravidelnou transfuzní léčbu většinou hned po stanovení diagnózy, tedy v časném dětství. Časové rozmezí podávání jednotlivých erytrocytárních koncentrátů je 2 – 4 týdny.

Pravidelný přívod Fe transfuzemi a neefektivní erytropoézou zprostředkovaná hyperabsopce Fe u pacientů s TI a TM způsobují přetížení železem (*Rachmilewitz et al., 2011; Goss et al., 2014*). Součástí léčby je tedy podávání chelatačních látek k vyvázání nadbytečného Fe, k jeho exkreci pak dochází močí nebo stolicí. Existují 3 typy chelatačních látek:

1. Deferoxamin (Desferal) – 1 molekula desferoxaminu váže 1 atom Fe, indikace: přetížení Fe jakéhokoliv původu.

2. Deferiprone (Ferriprox) – 3 molekuly deferipronu vyvazují 1 atom Fe, indikace: pacienti s talasemií major nad 10 let věku, u kterých nelze podávat desferoxamin.

3. Deferasirox (Exjade) – 1 atom Fe se váže na 2 molekuly deferasiroxu, indikace preparátu je přetížení Fe u pacientů od 2 let věku se závislostí na transfuzích, u kterých je léčba deferoxaminem kontraindikovaná nebo nevhodná (*Kwiatkowski et al., 2012; Jonášová, 2012*).

Součástí léčby talasemie je léčba přidružených komplikací, je tedy nutný multidisciplinární přístup zahrnující péči kardiologickou, endokrinologickou, ortopedickou a chirurgickou.

Kurativní léčbou talasemie jsou transplantace kmenových buněk krvetvorby (HSCT) a genová terapie. První HSCT byla provedena již v roce 1982 a od té doby byla využita k léčbě talasemie u více než 3000 pacientů (*Thomas et al., 1982; Angelucci et al., 2008*). Overall event-free survival je 80 – 97% v závislosti na pokročilosti onemocnění. Nejvhodnějším dárce je zdravý HLA shodný sourozenec (*Lucarelli et al., 2008*). Genová terapie talasemie je možností kurativní léčby pro pacienty, kteří nenajdou vhodného dárce k transplantaci. S úspěchem byla poprvé použita u pacienta s talasemií Hb E/ $\beta$ - v roce 2010. Celkem nyní probíhají tři klinické studie zahrnující 7 pacientů, u všech byl použitý lentivirový vektor se schopností začlenit funkční gen pro beta globinový řetězec do genomu pacienta. Tato léčba je zatím experimentální, protože chybí dostupné informace o mutagenезi po zásahu do genetické informace pacientů (*Finotti et al., 2015*).

#### **4 Vrozené poruchy erytrocytární membrány**

Hereditární poruchy erytrocytární membrány jsou v severní Evropě nejčastější příčinou vrozené hemolytické anémie (*Perrotta et al., 2008*). Erytrocyty jsou bezjaderné krevní



elementy bikonkávního tvaru. Tento tvar je udržovaný komplexní sítí proteinů, která je ukotvená k vnější lipidové dvojvrstvě. Bikonkávní tvar erytrocytu zvětšuje vlastní buněčný povrch, na kterém probíhá difuze krevních plynů, a zároveň poskytuje erytrocytu deformovatelnost a usnadňuje tedy jeho průchod kapilárním řečištěm tkání. Proto značná část metabolismu erytrocytu je zaměřena na udržení tohoto tvaru. Erytrocyty jedinců s vrozeným defektem syntézy některého z proteinů stabilizujících bikonkávní tvar erytrocytu mají výrazně sníženou životnost. Při průchodu kapilárami dochází u těchto červených krvinek ke ztrátám částí lipidové dvojvrstvy, čímž se povrch erytrocytu zmenšuje, zatímco jeho objem zůstává konstantní. Důsledkem těchto drobných ztrát částí membrány je změna permeability červené krvinky a zhoršená deformabilita a její následný předčasný rozpad ve slezině (*Yang et al., 1992; Da Costa et al., 2013*).

Hereditární membranopatie jsou historicky děleny podle morfologie erytrocytů. Nejčastěji se vyskytuje hereditární sférocytóza, dále hereditární eliptocytóza, vzácně hereditární pyropikilocytóza a hereditární stomatocytóza.

## **4.1 Definice a epidemiologie**

### **4.1.1 Hereditární sférocytóza (HS)**

Základním charakteristickým rysem této membranopatie je sférický tvar červených krvinek v nátěru periferní krve. Incidence je udávána v rozmezí 1:3000, ale pravděpodobně je vyšší v důsledku nerozpoznaných mírných forem. HS je skupina heterogenních syndromů vedoucích ke změně vnitřní struktury cytoskeletonu erytrocytu a tím i ke změně jeho tvaru. V 75% případů je HS děděná autosomálně dominantně (*An et al., 2008*). Celkem je známo šest genů kódujících integrální nebo periferní proteiny, jejichž mutace vede ke snížení syntézy daného proteinu a má za následek typický sférický tvar erytrocytů. Nejdéle je známý deficit spektrinu, bílkoviny pásu jedna, která se skládá ze dvou heterodimerů – alfa a beta (geny SPTA1 a SPTB). Mezi další proteiny způsobující HS patří ankyrin (gen ANK1), protein pásu 3 (gen SLC4A1), protein pásu 4.1 (gen EPB41), pallidin (protein pásu 4.2, gen EPB42) a Rh asociovaný glykoprotein (gen RHAG). Mnohem častěji než primární deficit spektrinu se vyskytuje deficit sekundární v důsledku snížené syntézy ankyrinu (*Perrotta et al., 2008; An et al., 2008*).

#### **4.1.2 Hereditární eliptocytóza (HE)**

Tvorba eliptocytů je typickým nálezem u hereditární eliptocytózy. Incidence HE je udávána 1:2000 – 4000, ale reálně se může výrazně odlišovat vzhledem k možnému asymptomatickému průběhu (Gallagher, 2004). Vyšší incidence je zaznamenána v oblasti Afriky a Středozeří (Dhermy et al., 2007). Dědičnost je většinou autosomálně dominantní (An et al., 2008). V důsledku deficitu proteinů pásu 4.1 nebo spektrinu jsou narušeny horizontální a laterální interakce cytoskeletonu, což vede k charakteristickému tvaru erytrocytů (An et al., 2008; Gallagher, 2004). Podtypem HE je hereditární pyropoikilocytóza, způsobená homozygotní nebo dvojitě heterozygotní mutací v genu pro spektrin alfa (SPTA1) (An et al., 2008).

#### **4.1.3 Hereditární stomatocytóza**

Výskyt hereditární stomatocytózy je mnohem méně častý než HS a HE. Přesný genetický defekt není známý, ale u části pacientů se vyskytuje mutace v genu pro stomatin a nebo pro Rh asociovaný glykoprotein (Bruce et al., 2009). Stomatocyty mají zvýšenou propustnost pro kationty sodíku a draslíku. Změna permeability membrány vede ke dvěma subtypům – hyperhydratovaná a dehydratovaná forma (An et al., 2008; Bruce et al., 2009). Hyperhydratovaná forma je způsobena zvýšeným průnikem iontů sodíku do erytrocytu, který převyšuje únik draslíku, následkem zvýšené hladiny sodíku je osmoticky řízený přesun molekul vody intracelulárně. U dehydratované formy je v popředí zvýšený únik iontů draslíku z buňky, který není kompenzovaný adekvátním příjmem iontů natria, což vede k dehydrataci erytrocytů (Mohandas et al., 2008).

### **4.2 Patofyziologie**

Morfologické změny erytrocytů mají za následek zhoršení buněčné deformability, což se projeví při průchodu kapilárním řečištěm a slezinnými siny. Během každého průchodu krevním řečištěm dochází ke ztrátám buněčné membrány v podobě odlučujících se mikrovezikul. Zatímco povrch buňky se zmenšuje, intracelulární obsah se nemění, což způsobuje typický tvar erytrocytů a zvýšení rigidity buněk. Prodloužení kontaktu s makrofágy ve slezině a působení nízké koncentrace glukózy má za následek předčasný rozpad erytrocytů a fagocytózu buňkami monocyto – makrofágového systému. Hemolýza je tedy převážně extravaskulární (Yang et al., 1992; Da Costa et al., 2013).

### 4.3 Klinická manifestace

Pacienti s vrozenou korpuskulární hemolytickou anémií mají různě závažný stupeň anémie, žloutenku a splenomegálii (až 75% pacientů). Pacienti s mírnou formou HS (20 – 30%) bývají asymptomatictí, v krevním obraze je zvýšená distribuční šíře erytrocytů a střední obsah hemoglobinu. Vyšší počet retikulocytů adekvátně kompenzuje zvýšenou destrukci erytrocytů, počet sférocytů v nátěru periferní krve je nízký. Často tyto pacienti bývají diagnostikováni až při rozvoji hemolytické nebo aplastické krize (*Gallagher, 2004*). Přibližně 60% pacientů má středně těžkou formu HS, v krevním obraze nacházíme vyšší procento sférocytů, hladina hemoglobinu se pohybuje nad 80g/l, je přítomna výrazná retikulocytóza a mírný stupeň hemolýzy (*Perrotta et al., 2008; Bolton-Maggs et al., 2004*). Těžká forma HS postihuje asi 5% pacientů, je charakterizovaná vystupňovanou hemolýzou, závažnou anémií s hodnotami hemoglobinu 60 – 80g/l, výraznou retikulocytózou (nad 10%) a splenomegálií. Jedinci vyžadují pravidelnou transfuzi erytrocytárního koncentrátu (*Perrotta et al., 2008; An et al., 2008*). Homozygotní forma HS může vést k fetálnímu hydropsu (*Whitfield et al., 1991*). Jedinci s HE většinou mají mírný průběh onemocnění, vystupňovaná erytropoéza pokrývá úbytek erytrocytů v důsledku zvýšené destrukce. Proto anémie pokud je přítomná, je mírná, počet retikulocytů je zvýšený a může být přítomná mírná elevace přímého bilirubinu, která ale nevede k výraznému ikteru (*An et al., 2008*). Výjimku tvoří pacienti s hereditární pyropoikilocytózou, kteří trpí těžkou formou anémie, často s nutností erytrocytární substituce (*Gallagher, 2013*).

Mezi nejčastější komplikace vrozených hemolytických anémií patří *hemolytická, aplastická a megaloblastická krize*. Hemolytická krize navazuje na probíhající infekci, nejčastěji virové etiologie. Pravděpodobně aktivací lymfatické tkáně sleziny dochází ke zvýšené destrukci erytrocytů, k poklesu hemoglobinu a vystupňování hemolýzy. Aplastická krize je způsobena přechodným útlumem erytropoézy při infekci Parvovirem B19, může být ale způsobena i jinými viry. Diferenciálně diagnosticky lze tyto dva akutní stavy rozlišit přítomností nebo absencí zvýšeného počtu retikulocytů a nepřímé hyperbilirubinémie. Megaloblastická krize se objevuje u pacientů s podvýživou, u kterých příjem kyseliny listové není dostatečný pro pokrytí potřeb vystupňované erytropoetické aktivity (*Bolton-Maggs et al., 2004; Gallagher, 2013*). Častou komplikací u pacientů s poruchami erytrocytární membrány je tvorba žlučových kamenů. Chronická hemolýza má za následek vysoký obrát bilirubinu a následnou cholelithiázu, která je detekovatelná ultrasonograficky u 41% (*Tamary et al., 2003*). Vzácně se mohou vyskytovat kožní léze v oblasti dolních končetin, tumoriformní

extramedulární erythropoéza, priapismus a kardiomyopatie (*Bastion et al., 1990; Prabhakaran et al., 2007; Finsterer et al., 2007; Rabhi et al., 2011*).

#### 4.4 Diagnostika

Základem pro diagnostiku vrozených membranopatií je kompletní krevní obraz a pečlivé zhodnocení nátěru periferní krve. Nalezení morfologicky odchylných erytrocytů má vysokou senzitivitu a specificitu. V biochemické vyšetření séra jsou přítomné známky hemolýzy – elevace nepřímého bilirubinu a laktátdehydrogenázy, snížení haptoglobinu. Mezi speciální metody, které prokazují změnu vlastností patologických erytrocytů, patří test osmotické rezistence. Tento test je založený na inkubaci erytrocytů pacienta v hypotonickém roztoku NaCl. V hypotonickém prostředí erytrocyty nasávají molekuly vody, aby došlo k vyrovnání osmolality cytoplazmatického prostředí. Po dosažení této rovnováhy dochází k lýze buňky. Zdravé erytrocyty hemolyzují v 0,45% NaCl a kompletní lýzy je dosaženo při koncentraci 0,3% NaCl. Sférocyty, eliptocyty a jiné morfologické odchylky erytrocytů mají zmenšený buněčný povrch při zachovaném vnitřním objemu, k hemolýze tedy dochází v méně hypotonickém roztoku než u zdravých erytrocytů. Jejich osmotická rezistence je snižena, na rozdíl od chorob s vysokým podílem terčovitých erytrocytů (např. talasemie), kde je naopak osmotická rezistence zvýšená (*Bolton-Maggs et al., 2004*). Dříve byl ke stanovení diagnózy HS používán test autohemolýzy prokazující zvýšenou hemolýzu při inkubaci erytrocytů ve fyziologickém roztoku za současného přidání ATP a glukózy po dobu 48 hodin. Pro časovou náročnost se ale dnes využívá minimálně (*Thornburg et al., 2003*). Dalšími vhodnými metodami detekce HS jsou glycerolový test a jeho modifikace Pink test, při kterých je zjišťovaná hemolýza erytrocytů v kyselém prostředí roztoku glycerolu. Senzitivita těchto testů je vyšší než u testu osmotické rezistence (*Brabec et al., 1991*). Pro svou jednoduchost a časovou nenáročnost je dnes často využíván test kryohemolýzy, při kterém jsou erytrocyty v hypertonickém prostředí nejprve zahřáty na 37°C a následně zchlazeny na 4°C po dobu 10 minut, procento hemolýzy je u patologických erytrocytů vyšší než u zdravých (*Iglauer et al., 1999*). Ke stanovení diagnózy je rovněž možné využít průtokové cytometrie, založené na vazbě kyseliny eosin 5 maleimidové, která se váže na protein pásu 3 a Rh asociované proteiny a po excitaci modrým světlem zeleně fluoreskuje. V případě defektu v některém z těchto proteinů se intenzita fluorescence snižuje. Senzitivita tohoto testu se pohybuje v rozmezí 89 – 96%, specificita 94 – 99%, výhodou je potřeba malého množství erytrocytů a časová nenáročnost (*King et al., 2000*).

## 4.5 Léčba

U většiny pacientů je po jednom roce věku dosaženo ustáleného stavu mezi hemolýzou a zvýšenou erythropoetickou aktivitou a není tedy žádná léčba nutná. Pravidelnou substituční léčbu erytrocytárními koncentráty vyžaduje méně než 30% pacientů, novorozenci a kojenci do ukončeného 1. roku života jsou závislí na transfuzích až v 70%, zřejmě neschopností vyžívající krvinek kompenzovat rychlejší zánik erytrocytů. Pacienti se středně těžkou a těžkou formou vrozené hemolytické anémie jsou indikováni ke splenektomii, která snižuje intenzitu hemolýzy a tedy i tvorbu žlučových kamenů (*Bolton-Maggs et al., 2004*). Relativní kontraindikací splenektomie je věk, její provedení je doporučováno až po 6. roce věku. Před provedením elektivní splenektomie je nezbytné zahájit očkování proti opouzdřeným mikrobům (*Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* a *Hemophilus influenzae*). Po splenektomii by měla být zahájena dlouhodobá antibiotická profylaxe (nejčastěji penicilinovými antibiotiky). I přes tato preventivní opatření jsou pacienti po splenektomii doživotně ohroženi rozvojem syndromu fulminantně probíhající sepse splenektomovaných (OPSI, overwhelming postsplenectomy infection), a proto by měla být empirická antibiotická léčba zahájena při každém horečnatém onemocnění neprodleně. Další možnou komplikací u splenektomovaných jedinců je zvýšené trombogenní riziko v důsledku zvýšení cirkulujících trombocytů, leukocytů a hladiny fibrinogenu, v krvi splenektomovaných pacientů byly rovněž nalezeny mikročástice zvyšující prokoagulační aktivitu faktoru VIII a XI. Standardně je proto doporučeno podání nízkomolekulárního heparinu v profylaktické dávce (*Polák et al., 2013*).

## **II. Experimentální část**

### ***5 Metabolismus železa a erythropoetická aktivita u vrozených poruch erytrocytární membrány a talasemie minor***

#### **5.1 Cíl studie**

Cílem studie bylo zhodnotit vztah mezi erythropoetickou aktivitou a metabolismem Fe u dětských pacientů s poruchami erytrocytární membrány a nosičstvím talasemické mutace.

#### **5.2 Materiál a metody**

##### ***5.2.1 Soubor pacientů***

Soubor pacientů tvořilo 13 dětských pacientů s talasemií minor (10 pacientů s beta talasemií minor a 3 pacienti s alfa talasemií minor, věkové rozmezí 3-17 let), 20 dětí s poruchami erytrocytární membrány (18 s HS a 2 s HE, věkové rozmezí 2-18let) a 1 pacientka s talasemií major (7 let). Jedinci s nosičstvím talasemické mutace nevyžadovali žádnou léčbu, pacientka s TM byla na pravidelné transfuzní léčbě aplikované 1x za tři týdny. Kontrolní skupinou byl soubor pacientů přijatých k plánovaným malým chirurgickým zákrokům (operace inguinální nebo pupeční kýly, plastické operace), u kterých byly při předoperačním vyšetření potvrzeny normální hodnoty krevního obrazu. U žádného pacienta nebyly v době odběru vzorků krve přítomny známky akutního zánětlivého onemocnění.

Provedení studie a informovaný souhlas byly schváleny Etickou komisí Univerzity Palackého v Olomouci.

##### ***5.2.2 Hematologické a biochemické vyšetření***

Vyšetření kompletního krevního obrazu včetně zhodnocení erytrocytárních parametrů bylo provedeno na automatickém analyzátoru Sysmex XE 500 (Sysmex). Biochemické markery metabolismu Fe: sérové železo (Fe), feritin, saturace transferinu (TSAT), solubilní transferinový receptor (sTfR), byly vyšetřeny standardními vyšetřovacími postupy. Ke stanovení hladiny erythropoetinu (EPO) byla použita

chemiluminiscenční imunohistochemická reakce na pevné fázi (*Zadrazil et al., 2007*). Pro potřeby statistického zpracování byly u kontrolní skupiny použité referenční meze.

Diagnóza HS a HE byla potvrzena pozitivním testem kryohemolýzy a zhodnocením nátěru periferní krve. Talasemie byla potvrzena elektroforézou hemoglobinu a Sangerovým sekvenováním (*Divoky et al., 2005*).

U všech pacientů byl stanovený poměr hepcidin/feritin, který vyjadřuje, zda hladina hepcidinu je adekvátní ve vztahu k zásobám železa (*Ganz, 2011*). Vliv erythropoetické aktivity na hladinu hepcidinu byl stanovený použitím poměru (hepcidin/feritin)/sTfR (*Guimarães et al., 2015*). Stanovení uvedených poměrů bylo provedeno klasickým matematickým výpočtem.

### **5.2.3 Vyšetření hladiny hepcidinu**

Ke stanovení hladiny hepcidinu byla použita proteomická analýza vzorků séra zmrazených na -80 st. C. Metoda je založena na extrakci na pevné fázi (SPE) a kapalinové chromatografii spřažené s hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS). Pro zjištění absolutní kvantifikace hepcidinu byl použit izotopově značený interní standard [<sup>13</sup>C<sub>9</sub>, <sup>15</sup>N<sub>1</sub>-Phe<sub>4</sub>]-hepcidin, který byl přidáván ke každému vzorku séra. Nativní a značený hepcidin byl extrahován ze vzorku séra použitím SPE pomocí Oasis<sup>®</sup> HLB SPE mikrotitračních destiček. Získané extrakty vzorků s hepcidinem byly separovány na koloně s reverzní fází (C18) pomocí LC a dále analyzovány pomocí monitorování vybraných iontů (SRM) na hmotnostním spektrometru QTRAP 5500 (AB SCIEX, Framingham, MA, USA). Pro SRM byl vybrán čtyřnásobně nabitý prekurzor hepcidinu a jeho fragmentační b<sub>3</sub><sup>+</sup> ion. Bylo připraveno osm kalibrantů o koncentracích 2,5; 5; 10; 25; 50; 100; 250; 500 ng/ml hepcidinu postupným ředěním v králičím séru. Kalibrační křivka byla sestavena na základě poměrů ploch „píků“ hepcidin/interní standard a koncentrace standardů. Regresní rovnice získaná z kalibračních standardů byla použita pro zpětný výpočet koncentrace hepcidinu ve vzorku.

#### 5.2.4 Měření GDF 15

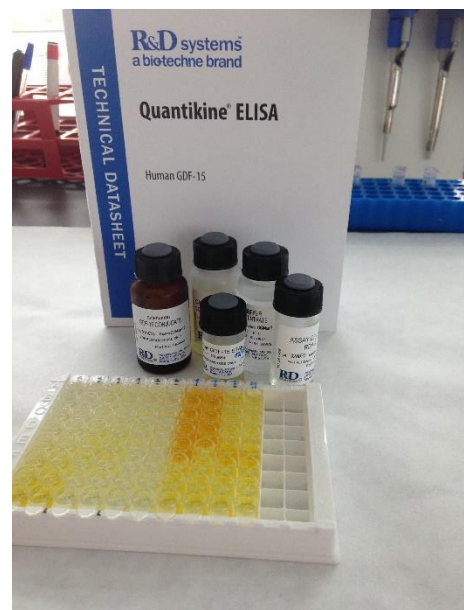
Koncentrace GDF 15 v séru byla měřena metodou ELISA dle přiloženého návodu výrobce komerčního kitu pro lidský GDF15 (Human GDF15 Quantikine ELISA Kit, R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA).

Nejprve bylo k 50  $\mu$ l séra pacientů přidáno 150  $\mu$ l ředícího roztoku RD5-20. Do jamek standardní 96 - jamkové mikrotitrační destičky s navázanou monoklonální protilátkou proti lidskému GDF15 bylo aplikováno 100  $\mu$ l ředícího roztoku (Assay Diluent) a 50  $\mu$ l naředěného séra. Inkubace probíhala 2 hodiny při pokojové teplotě za stálého promíchávání. Po čtyřnásobném promytí promývacím roztokem bylo přidáno 200  $\mu$ l polyklonální protilátky proti lidskému GDF15 s navázanou peroxidázou (Human GDF15 Conjugate) (Obrázek 4A). Po hodinové inkubaci byl promývacím roztokem nenavázaný konjugát odstraněn a bylo přidáno 200  $\mu$ l substrátového roztoku (Substrate Solution). Reakce byla zastavena po 30 minutách přidáním 50  $\mu$ l kyseliny sírové (Stop Solution). Absorbance byla měřena při vlnové délce 450, 540 a 570nm. Každý vzorek séra byl zpracovaný v dupletu a k výpočtu hladiny GDF15 byla použita průměrná hodnota, která byla vztažena k absorbanci standardů o známých koncentracích GDF 15 (23,4 – 46,9 – 93,8 – 188 – 375 – 750 – 1500 pg/ml) (Obrázek 4B).

**Obrázek 4: Měření hladiny GDF 15.**



A



B

A – mikrotitrační destička - po přidání substrátového roztoku - sledujeme průběh enzymem katalyzované reakce.

B – Kit ELISA k vyšetření hladiny lidského GDF 15.



### 5.2.5 Statistické zpracování dat

Pro data s normální distribucí byly ke statistickému zhodnocení použity testy ANOVA a Dunnettův test, pro neparametrická data byl použitý Kruskal – Wallisův test mnohonásobného porovnávání. Vlastní zpracování bylo provedeno použitím softwaru Statistica 12 (StatSoft, Inc.). Za statisticky signifikantní byly považovány výsledky na hladině 5%.

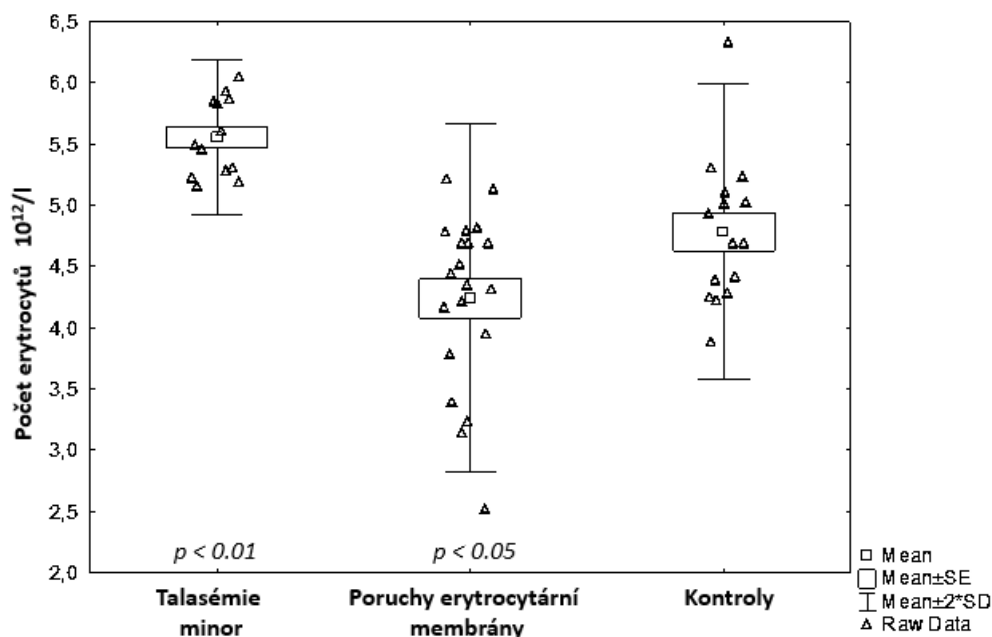
## 5.3 Výsledky

### 5.3.1 Analýza hematologických nálezů u jednotlivých studovaných skupin

U pacientů s talasemií minor jsme zaznamenali mírný stupeň anémie s kompenzačním zvýšením celkového počtu erytrocytů (Graf 1). Hladiny hemoglobinu (Graf 2), středního objemu erytrocytů (MCV; Graf 3), střední obsah hemoglobinu (MCH; Graf 4) a střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytech (MCHC; Graf 5) byly signifikantně nižší při srovnání s kontrolní skupinou. Ve skupině pacientů s poruchami erytrocytární membrány byl signifikantně snížený počet erytrocytů a jen mírné odchylky ostatních parametrů s výjimkou MCHC, která byla v této skupině signifikantně zvýšená. Jako důsledek chronické hemolýzy měli pacienti signifikantně vyšší počet retikulocytů ve srovnání s kontrolní skupinou (Graf 6; Tabulka 1).

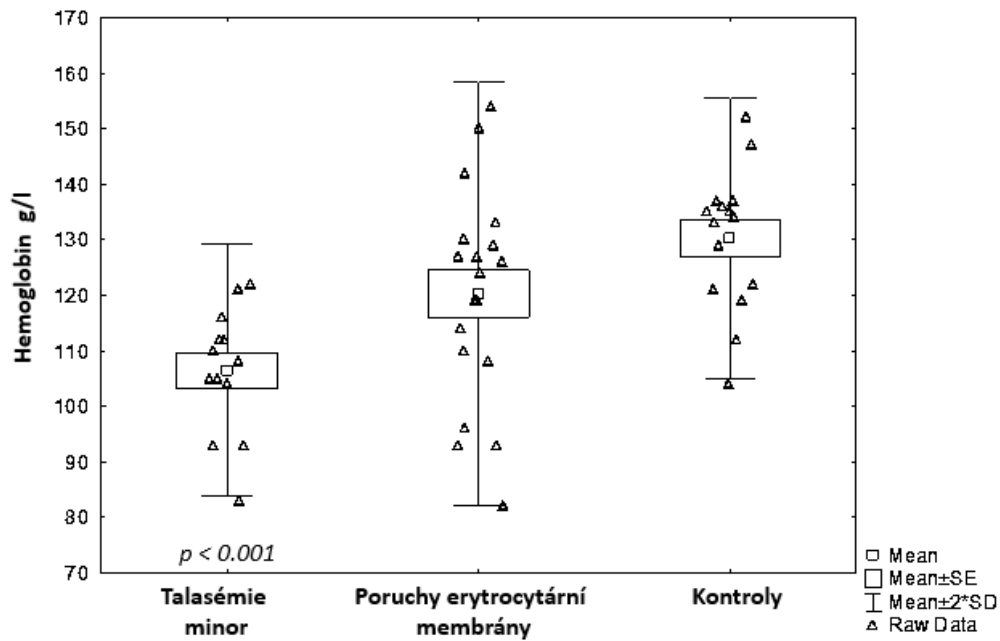
**Graf 1: Počet erytrocytů u pacientů s talasemií minor, poruchami erytrocytární membrány a kontrolní skupiny.**

*p* statistická významnost ve srovnání s kontrolní skupinou.



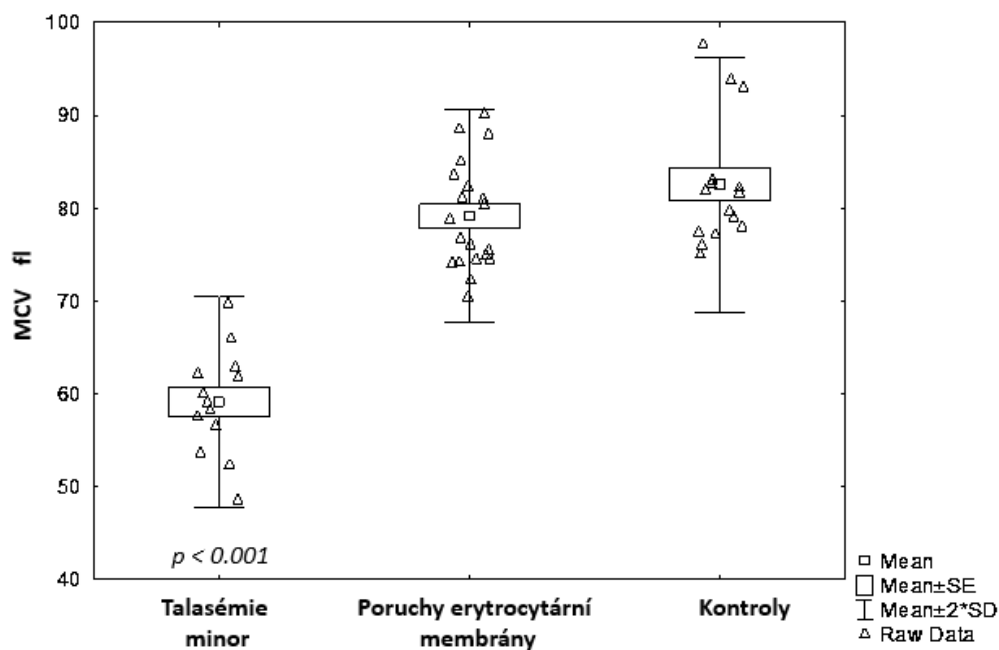
**Graf 2: Hladina hemoglobinu u pacientů s talasémií minor, poruchami erytrocytární membrány a kontrolní skupiny.**

*p* statistická významnost ve srovnání s kontrolní skupinou.



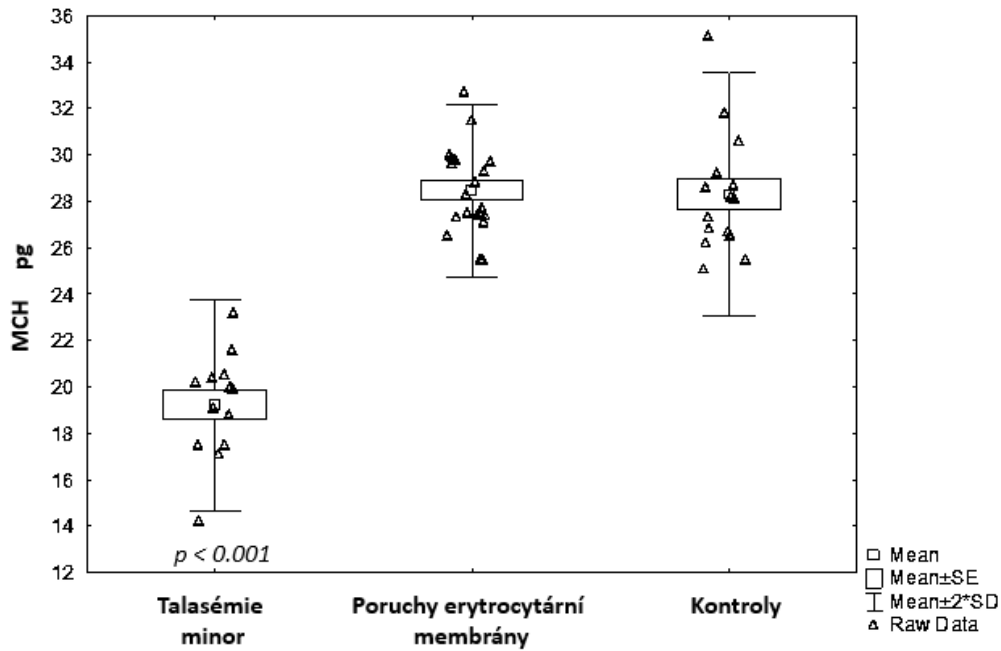
**Graf 3: Střední objem erytrocytů (MCV) u pacientů s talasémií minor, poruchami erytrocytární membrány a kontrolní skupiny.**

*p* statistická významnost ve srovnání s kontrolní skupinou.



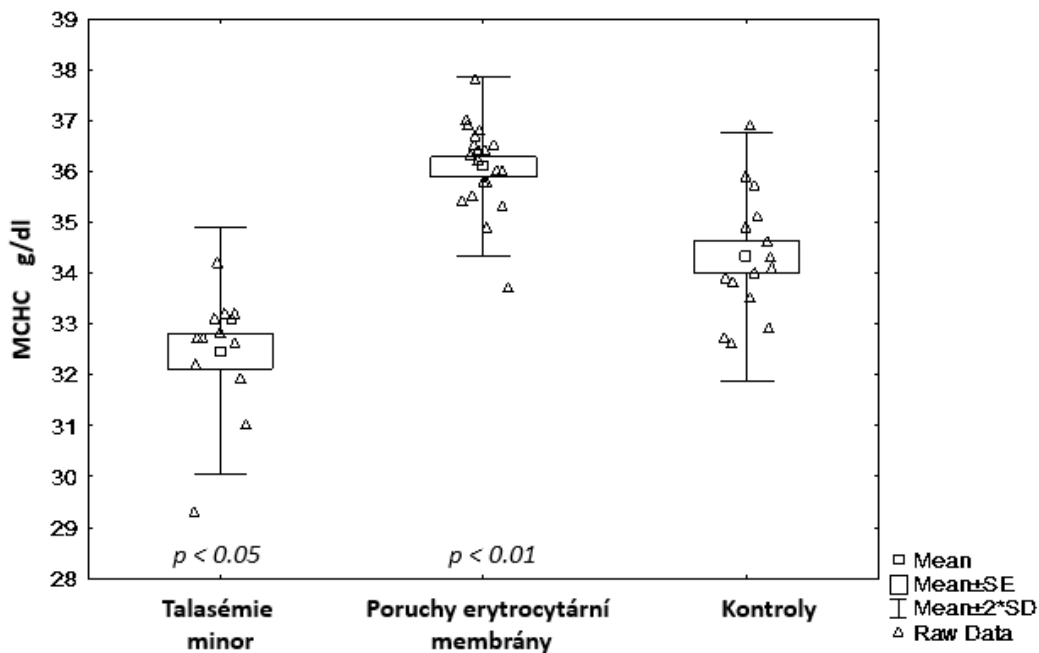
**Graf 4: Střední obsah erytrocytů (MCH) u pacientů s talasémií minor, poruchami erytrocytární membrány a kontrolní skupiny.**

*p* statistická významnost ve srovnání s kontrolní skupinou.



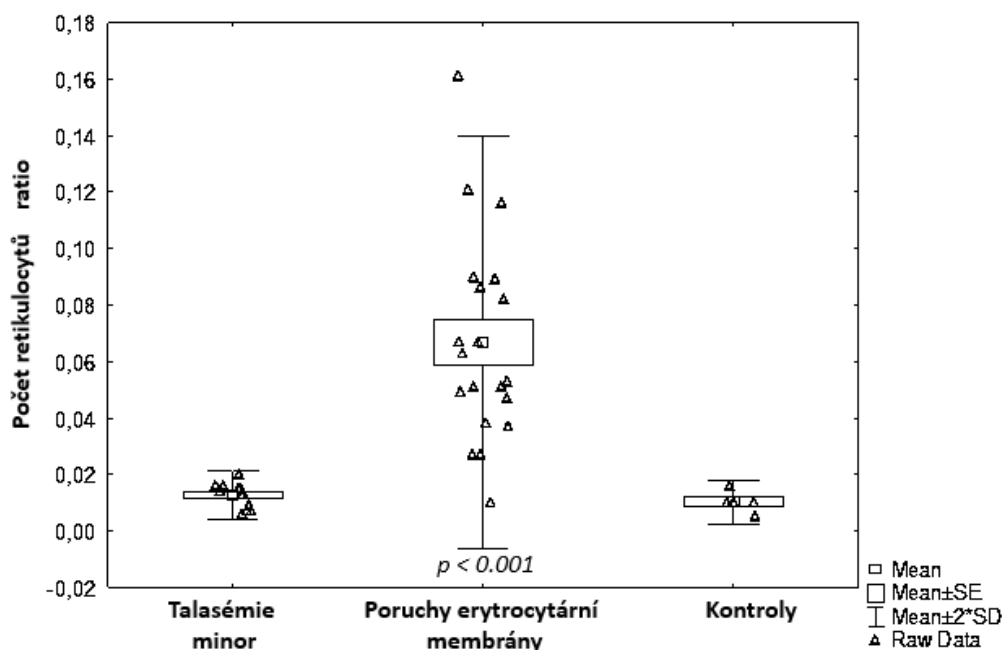
**Graf 5: Střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytu (MCHC) u pacientů s talasémií minor, poruchami erytrocytární membrány a kontrolní skupiny.**

*p* statistická významnost ve srovnání s kontrolní skupinou.



**Graf 6: Počet retikulocytů u pacientů s talasémií minor, poruchami erytrocytární membrány a kontrolní skupiny.**

*p* statistická významnost ve srovnání s kontrolní skupinou.



**Tabulka 1: Hematologické charakteristiky jednotlivých skupin pacientů**

	Kontroly	Talasémie minor	Poruchy erytrocytární membrány	Talasémie major
<b>RBC</b> (10 <sup>12</sup> /L)	4.78 ± 0.60	5.55** ± 0.315	4.23* ± 0.71	2.97
<b>Hb</b> (g/L)	130 ± 13	106*** ± 11	120 ± 19	65
<b>MCV</b> (fL)	82.56 ± 6.87	59.1*** ± 5.68	79.1 ± 5.73	79.8
<b>MCH</b> (pg)	28.29 ± 2.62	19.23*** ± 2.27	28.45 ± 1.86	27.6
<b>MCHC</b> (g/dL)	34.32 ± 1.22	32.46* ± 1.21	36.09** ± 0.87	34.6
<b>Ret</b> (ratio)	0.010 ± 0.003	0.012 ± 0.004	0.066*** ± 0.045	0.012

Výsledky jsou zobrazeny jako průměr ± SD, u pacientky s talasémií major uvádíme jednotlivé hodnoty. **RBC** počet erytrocytů; **Hb** hemoglobin; **MCV** střední objem erytrocytu; **MCH** střední obsah hemoglobin v erytrocytu; **MCHC** střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytech, **Ret** počet retikulocytů. Statistická významnost ve srovnání s kontrolní skupinou: \* *p*-value<0.05; \*\* *p*-value<0.01; \*\*\* *p*-value<0.001.

### 5.3.2 Hodnocení ukazatelů erythropoetické aktivity

K hodnocení bylo využito hladin erythropoetinu a solubilního transferinového receptoru. Pacienti s poruchami erytrocytární membrány měli průměrnou hladinu EPO nad referenční meze použité metody (průměr 34 IU/l, ref. mez 4.3 – 29 IU/l), zatímco jedinci s talasemickou mutací měli hladinu EPO v referenčním rozmezí zdravé populace (průměr 18 IU/l). U pacientů s vrozenou poruchou erytrocytární membrány byla hladina sTfR signifikantně vyšší při srovnání s kontrolní skupinou. Pacienti s talasemií minor měli 1.9krát vyšší hladiny sTfR než kontrolní skupina (Tabulka 2, Graf 7A). Ačkoliv tento výsledek nedosáhl hladiny statistické významnosti, 10 z 13 pacientů mělo hladinu sTfR nad průměrem zdravé populace. Tyto výsledky svědčí pro zvýšenou erythropoetickou aktivitu kostní dřeně u obou studovaných skupin pacientů

Ke stanovení úrovně neefektivní erythropoézy jsme provedli měření a zhodnocení hladin GDF 15 u jednotlivých skupin pacientů (*Tanno et al., 2010; Ronzoni et al., 2015*). Průměrná hodnota GDF15 byla zvýšená u pacientů s poruchami erytrocytární membrány (387 pg/ml) i u pacientů s talasemickým nosičstvím (653 pg/ml), pouze v této skupině však dosáhla statistické významnosti (Tabulka 2; Graf 7B).

**Tabulka 2: Markery erythropoetické aktivity u jednotlivých skupin pacientů a u kontrolní skupiny.**

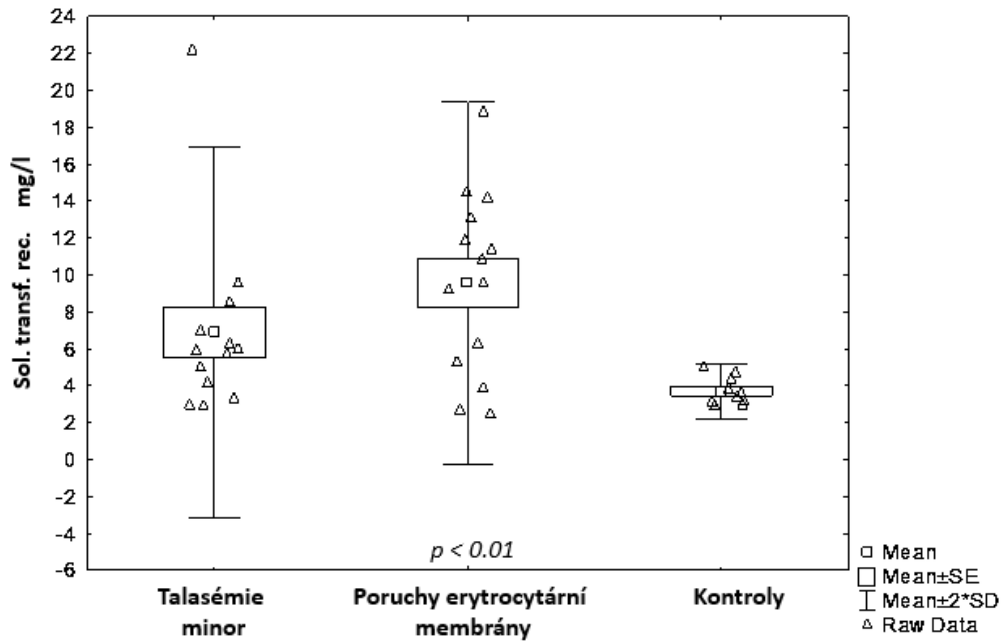
	Kontroly	Talasémie minor	Poruchy erytrocytární membrány	Talasémie major
sTfR (mg/L)	3.7 ± 0.74	6.89 ± 5.02	9.58** ± 4.89	19
EPO (IU/L)	[4.3-29] <sup>+</sup>	18.0 ± 22.67	34.04 ± 30.45	> 4000
GDF15 (pg/mL)	205 ± 27	653** ± 545	387 ± 131	8316.7

Výsledky jsou zobrazeny jako průměr ± SD, u pacientky s talasemií major uvádíme jednotlivé hodnoty. **sTfR** solubilní transferinový receptor; **EPO** erythropoetin; **GDF 15** růstový diferenciační factor 15; + referenční meze. Statistická významnost ve srovnání s kontrolní skupinou: \*\* p-value<0.01;

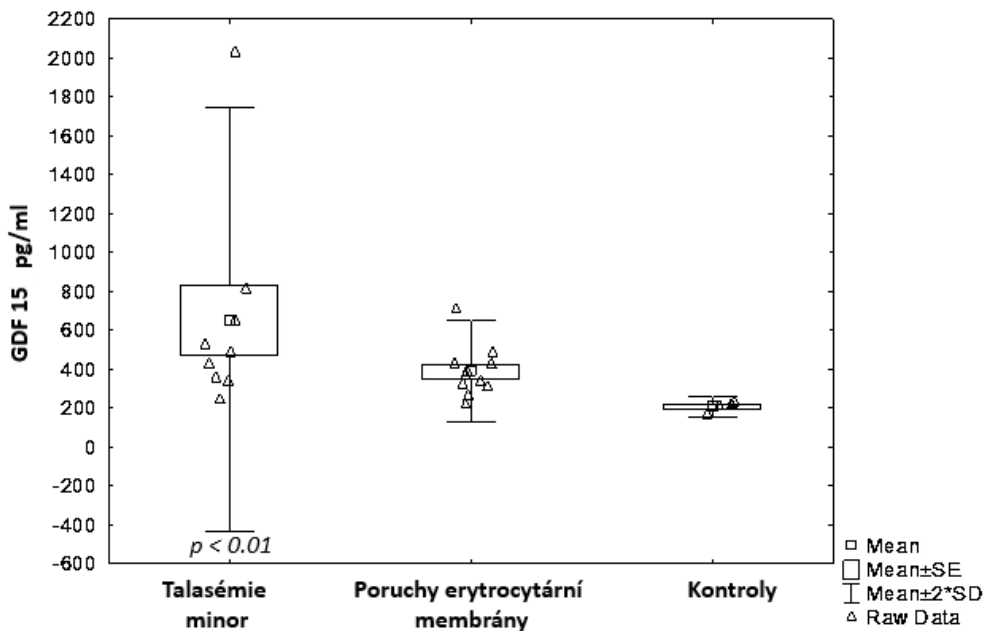
**Graf 7: Hladiny solubilního transferinového receptoru (A) a GDF 15 (B) u skupiny pacientů s talasémií minor, pacientů s poruchami erytrocytární membrány a kontrolní skupiny.**

*p* statistická významnost ve srovnání s kontrolní skupinou; **Sol. transf. rec.** solubilní transferinový receptor; **GDF 15** růstový diferenciační faktor 15.

**A**



**B**

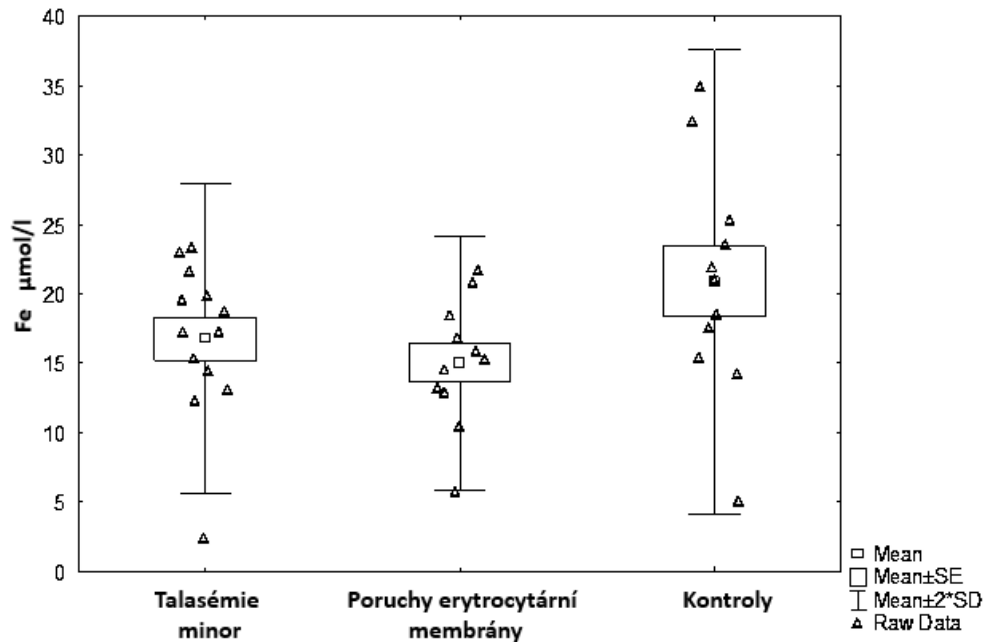


Jediná pacientka s talasémií major, jejíž výskyt je ve střední Evropě velmi vzácný, měla závažnou anémii s hladinou hemoglobinu 65 g/l, snížený počet erytrocytů, zvýšené hladiny sTfR a EPO. U této pacientky jsme zaznamenali nejvyšší hladinu GDF 15 (8631 pg/ml) (Tabulka 1; Tabulka 2).

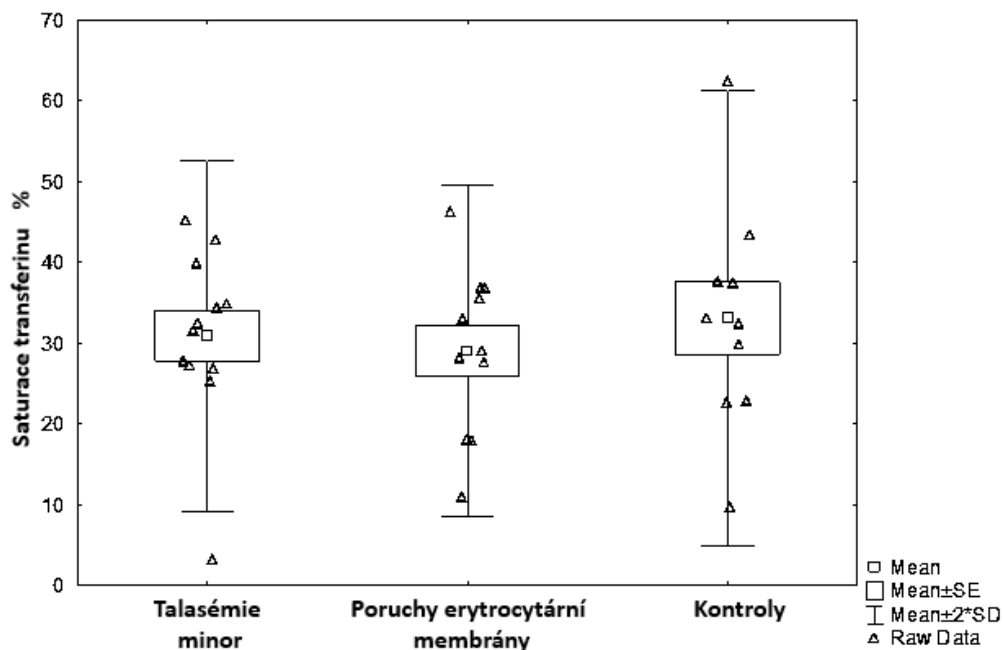
### 5.3.3 Hodnocení parametrů metabolismu Fe

Ve všech studovaných skupinách byly hladiny sérového Fe a saturace transferinu srovnatelné (Graf 8; Graf 9).

**Graf 8: Hladiny plazmatického železa u skupiny pacientů s talasémií minor, u pacientů s vrozenými poruchami erytrocytární membrány a u kontrolní skupiny.**  
*p* statistická významnost ve srovnání s kontrolní skupinou.

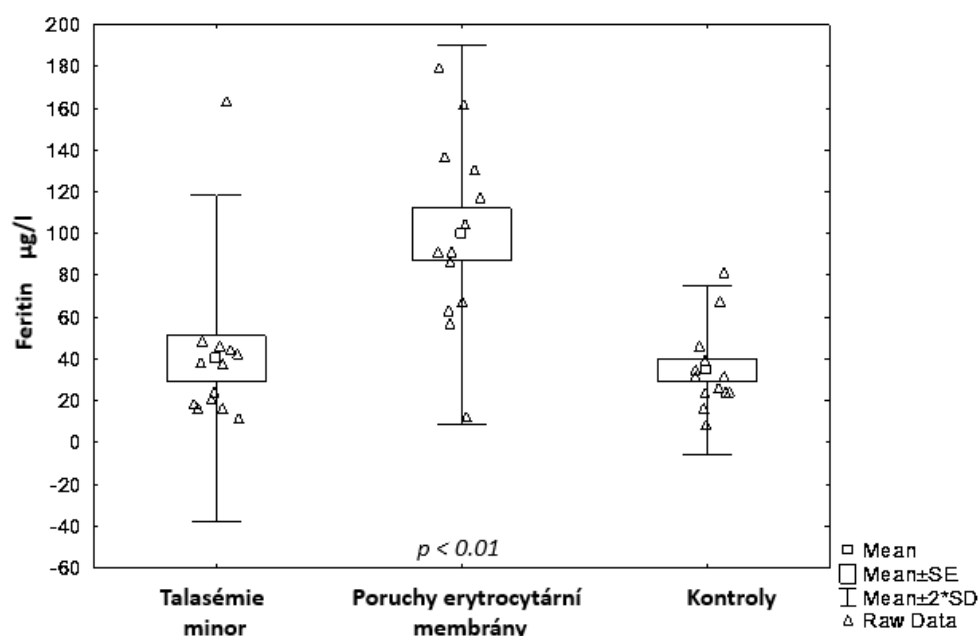


**Graf 9: Saturace transferinu u skupiny pacientů s talasémií minor, u pacientů s vrozenými poruchami erytrocytární membrány a u kontrolní skupiny.**  
*p* statistická významnost ve srovnání s kontrolní skupinou.



Skupina erytrocytárních membránových poruch měla signifikantně vyšší hladiny feritinu ve srovnání s kontrolní skupinou (průměr 99.54  $\mu\text{g/l}$  vs. 34.62  $\mu\text{g/l}$  u kontrol) na rozdíl od pacientů s talasémií, jejichž hladina feritinu se od kontrolní skupiny nelišila (Graf 10).

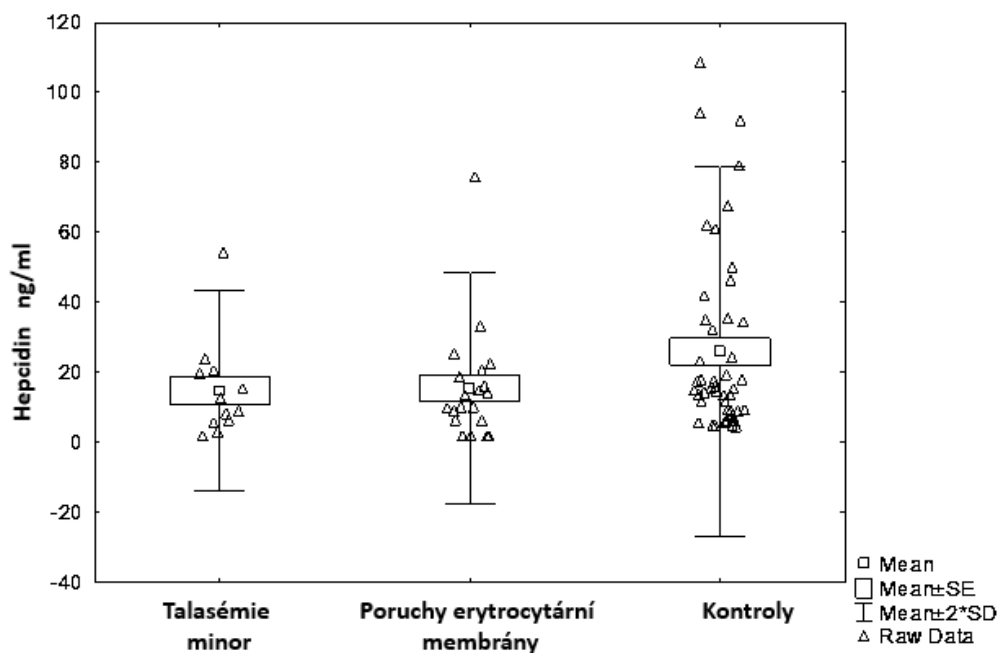
**Graf 10: Hladiny feritinu u skupiny pacientů s talasémií minor, u pacientů s vrozenými poruchami erytrocytární membrány a u kontrolní skupiny.**  
*p* statistická významnost ve srovnání s kontrolní skupinou.



Hladina hepcidinu byla výrazně snižena u obou studovaných skupin (průměr 14.73 ng/ml u talasemie vs. 15.43 ng/ml u defektu erytrocytární membrány vs. 25.86 ng/ml u kontrolní skupiny), ačkoliv rozdíl nebyl statisticky významný. Hodnoty hladin hepcidinu pro skupiny pacientů a kontrol jsou znázorněny v Grafu 11. Parametry metabolismu Fe u studovaných skupin jsou uvedeny v Tabulce 3.



**Graf 11: Hladiny hepcidinu u skupiny pacientů s talasémií minor, u pacientů s vrozenými poruchami erytrocytární membrány a u kontrolní skupiny. p statistická významnost ve srovnání s kontrolní skupinou.**



**Tabulka 3: Parametry metabolismu železa u studovaných skupin pacientů a u kontrolní skupiny.**

	Kontroly	Talasémie minor	Poruchy erytrocytární membrány	Talasémie major
%TSAT	33.07 ± 14.09	30.9 ± 10.86	29.05 ± 10.22	59.9
Sérové Fe (μM/L)	20.87 ± 8.37	16.75 ± 5.57	15.04 ± 4.57	22
Feritin (μg/L)	34.62 ± 20.1	40.23 ± 39.15	99.54** ± 45.52	2872
Hepcidin (ng/mL)	25.86 ± 26.46	14.73 ± 14.27	15.34 ± 16.56	56.2
Hepcidin/feritin	0.658 ± 0.564	0.341 ± 0.149	0.177** ± 0.173	0.02
(hepcidin/feritin)/sTfR	0.184 ± 0.189	0.072 ± 0.050	0.023*** ± 0.021	0.001

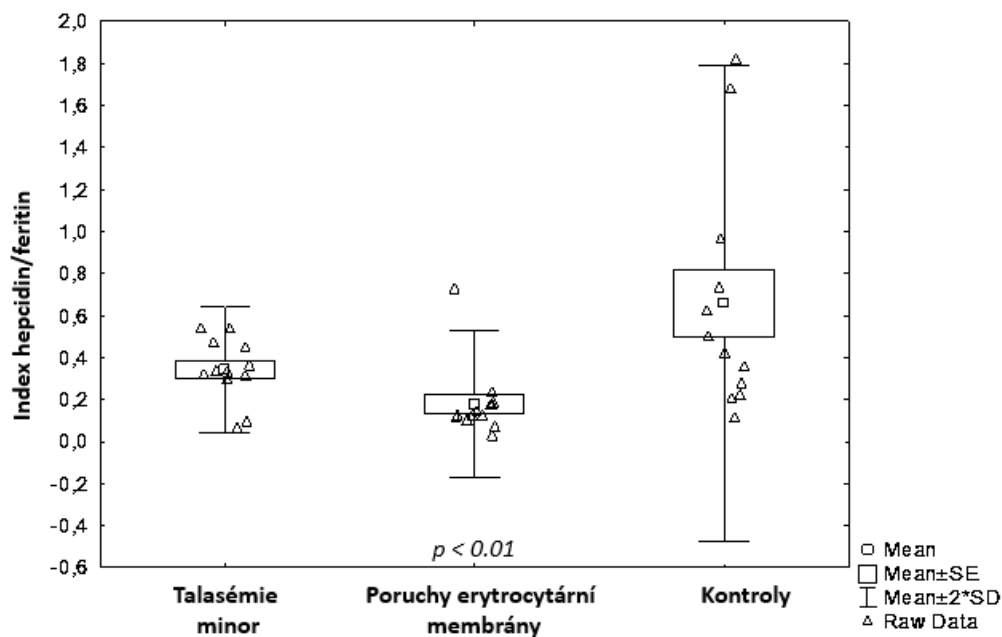
Výsledky jsou zobrazeny jako průměr ± SD, u pacientky s talasémií major uvádíme jednotlivé hodnoty. **TSAT** saturace transferinu; **Fe** železo; **sTfR** solubilní transferinový receptor. Statistická významnost ve srovnání s kontrolní skupinou: \*\* p-value<0.01; \*\*\* p-value<0.001

### 5.3.4 Poměr hepcidin/feritin a (hepcidin/feritin)/sTfR

Poměr hepcidin/feritin byl signifikantně nižší u pacientů s poruchami erytrocytární membrány (0.177) než u zdravých kontrol (0.658). U skupiny pacientů s talasemií minor byl poměr hepcidin/feritin dvakrát nižší (0.341) než u kontrolní skupiny, výsledek se přiblížil hranici statistické významnosti (Graf 12). Poměr hepcidin/feritin u obou sledovaných skupin prokazuje neadekvátní supresi syntézy hepcidinu.

**Graf 12: Hodnoty poměru hepcidin/feritin pro jednotlivé skupiny pacientů a kontrolní skupinu.**

*p* statistická významnost ve srovnání s kontrolní skupinou.

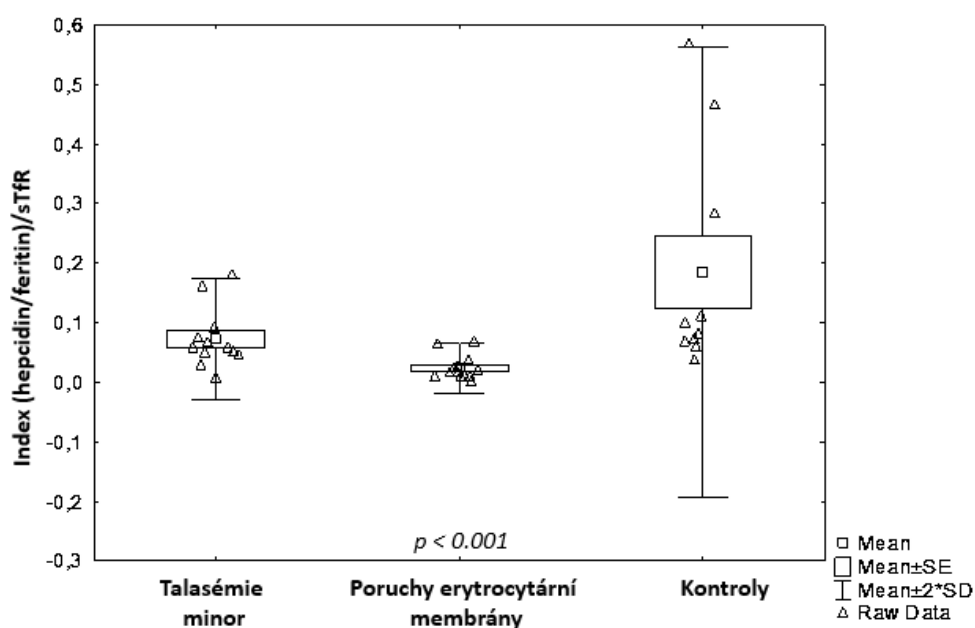


U pacientky s talasemií major jsme zaznamenali normální hladinu sérového železa, ale výrazné zvýšení feritinu (2872  $\mu\text{g/l}$ ). Hladina hepcidinu byla dvojnásobně vyšší (56.2  $\text{ng/ml}$ ) ve srovnání se zdravými kontrolami (25.86  $\text{ng/ml}$ ), zatímco poměr hepcidin/feritin byl výrazně snížený (0.02) oproti kontrolní skupině (0.658), což dokazuje neadekvátní snížení hladiny hepcidinu ve vztahu k existující hyperferitinémii.

Poměr hepcidin/feritin/sTfR byl u obou skupin pacientů snížený (talasémie minor 0.072, poruchy erytrocytární membrány 0.023) ve srovnání s kontrolní skupinou (0.184), což potvrzuje alteraci vztahu erytropoéza – metabolismu Fe (Graf 13).

**Graf 13: Hodnoty poměru (hepcidin/feritin)/sTfR pro jednotlivé skupiny pacientů a kontrolní skupinu.**

*p* statistická významnost ve srovnání s kontrolní skupinou.



Při grafickém znázornění poměru hepcidin/feritin a sTfR se obě skupiny pacientů vyčlení od kontrolní skupiny (Graf 14). Nižší poměr hepcidin/feritin se současným zvýšením sTfR je důsledkem akcelerace erytropoézy. Nejnížší hodnoty poměru hepcidin/feritin/sTfR dosahovala pacientka s TM (0.001), což je patrné z grafu (Graf 14). Její výsledky prokazují zvýšenou erytropoetickou aktivitu a neadekvátně suprimovanou hladinu hepcidinu v závislosti na stupni akumulace Fe.



V našem souboru pacientů jsme popsali, jakým způsobem dysfunkční erythropoéza ovlivňuje metabolismus Fe u pacientů s poruchami erytrocytární membrány (HS a HE). Závažnost anémie u těchto pacientů je mírnější než u pacientů s talasemií minor a je hyperchromní. Kompenzačním mechanismem chronické hemolýzy je zvýšený počet retikulocytů. Sérová hladina EPO je vyšší než u pacientů s talasemia minor a ve spojení se signifikantně zvýšeným sTfR odráží zvýšenou erythropoetickou aktivitu kostní dřeně. Navíc mírně zvýšené hladiny GDF 15 prokazují určitý stupeň neefektivní erythropoézy.

Při vyšetření parametrů metabolismu Fe jsme zaznamenali normální hladinu sérového Fe, ale signifikantně zvýšenou hladinu feritinu. Stejně jako u nositelů talasemické mutace, hepcidin byl snížený 1.7krát a poměr hepcidin/feritin 3.7krát ve srovnání se zdravými kontrolami. Pacienti s poruchami erytrocytární membrány měli také signifikantně nižší index hepcidin/feritin/sTfR oproti kontrolní skupině, což je odlišuje v grafickém znázornění od kontrolní skupiny. Skupina pacientů s poruchami erytrocytární membrány je v grafu posunuta více doprava nahoru než pacienti s talasemií minor, což je důsledek výraznější alterace signální dráhy erythropoéza-hepcidin- zásoby Fe. Tyto výsledky také naznačují neadekvátní snížení syntézy hepcidinu u pacientů s HS a HE. Signály měnící expresi hepcidinu přímo však zůstávají dosud neobjasněné, protože EPO je nepřímým supresorem hepcidinu a vyžaduje pro svoji funkci erythropoeticky aktivní kostní dřeň, jak jsme prokázali u pacientů s Diamondovou-Blackfanovou anémií (DBA) (*Pospisilova et al., 2014 – Příloha č. 1; Vokurka et al., 2006; Pak et al., 2006*). Hladina EPO u je u pacientů DBA extrémně vysoká, její zvýšení je výrazem snahy organismu o stimulaci erythropoézy, která je však hypoplastická. Prokázali jsme, že efekt EPO na produkci hepcidinu není přítomen bez funkční erythropoézy.

GDF 15 je považovaný spíše za marker neefektivní erythropoézy a současně apoptózy erytroidních buněk než za hlavní supresor hepcidinu, jak jsme rovněž prokázali na příkladu pacientů s DBA, u kterých není korelace mezi GDF15 a hepcidinem (*Pospisilova et al., 2014 – příloha č. 1; Ronzoni et al., 2015*). GDF 15 je však důležitým ukazatelem aktivity erythropoézy, jeho informační hodnota jako markeru apoptózy erytroidních buněk je dále zkoumána.

Nově identifikovaný regulační hormon erytroferon, uvolňovaný stimulovanými erytroblasty po chronickém krvácení nebo po podání EPO, má suprimující účinek na syntézu hepcidinu a zdá se tedy velmi slibnou přímou regulační molekulou hepcidinu

(Kautz *et al.*, 2014). Metodika stanovení lidského erytroferonu je nyní vyvíjena, jeho hladiny u zdravé populace a různých patologických stavů zahrnujících i poruchy erytrocytární membrány zatím proto nebyly vyšetřeny.

Prokázali jsme také alteraci erytrocytárních parametrů u pacientů s nosičstvím talasemické mutace: zvýšený počet erytrocytů, snížení hladiny Hb, MCV, MCH a MCHC. Zvýšení sTfR a GDF 15 je důsledkem zvýšené erythropoetické aktivity kostní dřeně, která je však z části neefektivní. Hladina GDF 15 byla zvýšená výrazněji u pacientů s talasemickým nosičstvím než u pacientů s poruchami erytrocytární membrány. Podobné závěry byly nedávno publikované u dětských pacientů s nosičstvím beta talasemické alely a také u dospělých jedinců s talasemií minor. Studie na dospělé populaci prokázala závažnější dopady na erythropoézu u pacientů s beta talasemií než u pacientů s alfa talasemií (Guimarães *et al.*, 2015; Jones *et al.*, 2015). V našem souboru byli pouze tři pacienti s alfa talasemií minor, proto jsme neprováděli statistickou analýzu. Rozdíly v klinických a laboratorních nálezech mezi pacienty s alfa a beta talasemií se mohou zvyrazňovat až v průběhu života

Všichni pacienti s talasemií měli hladinu sérového Fe a feritinu srovnatelnou s kontrolní skupinou, ale jejich hladina hepcidinu i poměr hepcidin/feritin snížený (přibližně 2x nižší ve srovnání s kontrolní skupinou). Tyto výsledky jsou v souladu s publikovanými daty pediatrických pacientů s beta talasemií (Jones *et al.*, 2015). Naopak Guimarães a kol. prokázali signifikantní snížení hladiny hepcidinu pouze u dospělých nositelů alfa talasemické alely, zatímco hladina hepcidinu dospělých pacientů s beta talasemií minor byla mírně vyšší ve srovnání s kontrolní skupinou, tento výsledek byl statisticky nesignifikantní (Guimarães *et al.*, 2015). Rozdíly mezi pacienty s beta talasemií mohou být způsobeny rozdíly mezi pediatrickou a dospělou populací nebo mohou být ovlivněny závažností dopadů talasemických alel. Nicméně pokud je poměr hepcidin/feritin zanesen do grafického znázornění proti hladině sTfR, vyčlení se pacienti s talasemií minor od kontrolní skupiny stejně jako pacienti s alfa a beta talasemií minor v případě studie provedené Guimarãesem a kol., což prokazuje alteraci erythropoézy a homeostázy Fe u pacientů s nosičstvím talasemické alely (Guimarães *et al.*, 2015).

Klinická závažnost anémie a hematologické a laboratorní nálezy u naší pacientky s TM jsou v souladu s publikovanými daty pacientů s TM, včetně neadekvátní suprese hepcidinu vzhledem ke stupni přetížení Fe (Origá *et al.*, 2007). Nízký poměr

hepcidin/feritin se současnou elevací sTfR a GDF 15 odrážejí zvýšenou neefektivní erythropoézou, která vede k vyšší potřebě Fe, což způsobuje zvýšení absorpce Fe a vyšší obrát recyklovaného Fe. Tato data odpovídají publikovaným pozorováním, že přetížení Fe u pacientů s TM je důsledkem pravidelné transfuzní terapie a narušené syntézy hepcidinu (*Pasricha et al., 2013*).

## 5.5 Závěr

Lze konstatovat, že u obou studovaných skupin pediatrických pacientů je přítomna alterace erythropoézy a metabolismu železa. Regulační mechanismy homeostázy železa jsou více narušené u pacientů s poruchami erytrocytární membrány než u pacientů s talasémií minor a současně méně než u pacientů s TM, což dosud nebylo publikováno. Naše výsledky potvrzují závěry publikovaných studií - index hepcidin/feritin/sTfR lze využít k odlišení pacientů s talasémií minor. Tito pacienti jsou více ohroženi rozvojem přetížení železem než zdravá populace. Pozvolná akumulace Fe v organizmu se může podobně jako u hemochromatózy typu I projevit až později v dospělém věku orgánovým postižením ve smyslu rozvoje diabetu, hepatopatie aj. Metabolismus železa je proto nutno i u talasémie minor pečlivě monitorovat.

Stejně jako u pacientů s talasémií minor, lze i u pacientů s vrozenými poruchami erytrocytární membrány využít index hepcidin/feritin/sTfR ke sledování vývoje onemocnění a potenciálního rizika přetížení železem.

## 6 *Metabolismus železa u dárců krve*

### 6.1 Cíl studie

Prevalence deficitu zásob železa u dárců krve v České republice dosud nebyla stanovená. Cílem studie je zhodnotit zásoby Fe a přínos vyšetření hladiny hepcidinu u dárců krve, kteří splnili kritéria pro darování krve a byli uschopněni k odběru.

### 6.2 Materiál a metody

Cílovou skupinu tvořili dobrovolní dárci krve, kteří byli náhodným výběrem vyzvaní k participaci na výzkumu v letech 2013 – 2014. Všichni dárci prošli klinickým vyšetřením lékařem a splnili podmínky pro darování dle platné vyhlášky 143/2008 Sb. a dle platných Doporučených postupů Transfuzní společnosti (*Vyhláška MZ ČR 143/2008 Sb., 2008; Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství, 2007*).

Provedení studie bylo schváleno Etickou komisí Fakultní nemocnice a Univerzity Palackého v Olomouci.

Celkem bylo do studie zařazeno 117 dárců krve (64 mužů a 53 žen), průměrný věk mužů byl 40.2 let, průměrný věk žen 35.5 let. Muži darovali před zařazením do studie průměrně 27krát, ženy 14krát. Odběr vzorků byl realizován po podepsání informovaného souhlasu s účastí na výzkumu. Vzorky séra byly zamrazeny na - 80 st. C a udržovány za stálých podmínek do vyšetření hladiny hepcidinu. Kontrolní skupinu při srovnání hladin hepcidinu tvořily zdravé subjekty s negativní anamnézou dárcovství krve.

**Vyšetření parametrů krevního obrazu** – analýza vzorků byla provedena na automatickém analyzátoru Sysmex.

**Hladiny plazmatického železa a feritinu** byly vyšetřeny standardními vyšetřovacími postupy.

**Vyšetření hladiny hepcidinu** - Použitá metoda měření hladiny hepcidinu je založena na extrakci na pevné fázi (SPE) a kapalinové chromatografii spřažené s hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS). Regresní rovnice získaná z kalibračních standardů byla použita pro zpětný výpočet koncentrace hepcidinu ve vzorku (*Mojzíkova et al., 2012*).

**Statistické zpracování dat** bylo provedeno regresní analýzou pomocí cenzorovaného regresního modelu Tobit, software Statistica 12 (StatSoft, Inc.). Za statisticky významné byly považovány výsledky na hladině významnosti 5%.



### 6.3 Výsledky

Nejprve byly vyhodnoceny hematologické parametry dárců (Tabulka 4). Všichni dárči splňovali požadavky způsobilosti k dárcovství. Hladina hemoglobinu byla u všech mužů  $\geq 135$  g/l, u žen  $\geq 125$  g/l, hodnota hematokritu  $\geq 0.40$  u mužů a  $\geq 0.38$  u žen. Muži měli signifikantně vyšší počet erytrocytů, hladinu hemoglobinu a hematokritu než ženy. U žen byly zaznamenány signifikantně vyšší hladiny leukocytů a trombocytů než u mužů. Bez rozdílu mezi pohlavími byly hodnoty středního objemu erytrocytů.

**Tabulka 4: Hematologické charakteristiky dárců zařazených do studie.**

	Počet dárců	Leu $10^9/l$	Ery $10^{12}/l$	Hb g/l	Hkt ratio	MCV fl	Trombocyty $10^9/l$
	113	5.8 (5.2-6.7)	4.86 (4.63-5.15)	144 (138-152)	0.43 (0.41-0.45)	88 (85.5-90.1)	223 (193-254)
<b>Ž</b>	51	6.3 (5.4-7.05)	4.62 (4.45-4.79)	137 (131.5-142)	0.41 (0.39-0.42)	88.7 (86.5-90.1)	236 (197-268.5)
<b>M</b>	62	5.7 (5.1-6.2)	5.09 (4.88-5.42)	149 (144-157.75)	0.45 (0.43-0.46)	87.5 (84.7-89.55)	217 (184.5-246.75)
<b>p</b>		<b>0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>NS</b>	<b>0.041</b>

**Hodnoty jsou uvedeny jako medián (1.kvartil – 3.kvartil). Ž ženy; M muži; Leu počet leukocytů; Ery počet erytrocytů; Hb hemoglobin; Hkt hematokrit; MCV střední objem erytrocytů; p hladina statistické významnosti mezi muži a ženami; NS nesignifikantní**

Výsledky měření parametrů metabolismu Fe jsou shrnuty v Tabulce 5. V hladinách plazmatického Fe jsme nezaznamenali statisticky významný rozdíl mezi muži a ženami (21.5 vs. 23.3  $\mu\text{mol/l}$ ). Hodnota Fe pod dolní hranici normy byla zjištěna pouze u 1 muže dárce; naopak 14 mužů a 11 žen mělo plazmatické Fe mírně zvýšené. Muži měli signifikantně vyšší hladinu feritinu (28  $\mu\text{g/l}$ ) než ženy (18  $\mu\text{g/l}$ ). Hladinu feritinu pod dolní referenční hodnotu (12  $\mu\text{g/l}$ ) jsme zjistili u 6 mužů (9.52%) a 9 žen (17.64%).

**Tabulka 5: Parametry metabolismu Fe dárců zařazených do studie.**

	Počet dárců	Fe $\mu\text{mol/l}$	Feritin $\mu\text{g/l}$	Hepcidin $\text{ng/ml}$	Index hepcidin/feritin <sup>±</sup>
	113	21.85 (16.6-28.15)	23 (15-36)	6.96 (3.39-10.91)	0.3755 (0.1877-0.5417)
<b>Ž</b>	51	23.3 (17.05-28.25)	18 (14.5-29)	7.14 (6.05-11.49)	0.4712 (0.2959-0.7179)
<b>M</b>	62	21.5 (16.3-27.7)	28 (15.5-47.5)	6.61 (2.5-10.43)	0.2909 (0.1516-0.4894)
<b>p</b>		<b>NS</b>	<b>0.009</b>	<b>NS</b>	<b>0.011</b>

*Hodnoty jsou uvedeny jako medián (1.kvartil – 3.kvartil).*

*Referenční meze: Fe [muži 6.6 – 28; ženy 7.2 – 29], feritin [12-300]<sup>l</sup>. Hodnoty kontrolní skupiny: medián (1.kvartil – 3.kvartil): hepcidin 27.6 (18-50.25), index hepcidin/feritin 0.3445 (0.2787-0.3889). **Ž** ženy; **M** muži; Fe hladina plazmatického železa; Ref. referenční meze; **p** hladina statistické významnosti mezi muži a ženami; NS nesignifikantní*

<sup>±</sup> index hepcidin/feritin byl stanoven u dárců s nadprahovou hodnotou hepcidinu

Na rozdíl od feritinu se hladina hepcidinu mezi oběma pohlavími dárců nelišila (6.61 ng/ml u mužů a 7.14 ng/ml u žen), byla však signifikantně nižší než hladina hepcidinu u kontrolní skupiny (27.6 ng/ml,  $p < 0.001$ ) (Mojzíkova et al., 2012). Celkem 58 mužů a 45 žen mělo hladinu hepcidinu pod 1. kvartilem kontrolní skupiny (18 ng/ml); z toho 23 dárců, 18 mužů (28%) a 5 žen (9.8%), mělo hladinu hepcidinu sniženou pod detekční limit (2.5 ng/ml). Průměrná hladina feritinu u dárců s hepcidinem pod detekční limit byla signifikantně nižší než u skupiny dárců s měřitelnou hodnotou hepcidinu ( $17.95 \pm 7.46$  vs.  $32.9 \pm 22.32$   $\mu\text{g/l}$ ).

U dárců s měřitelnou hodnotou hepcidinu jsme dále stanovovali také poměr hepcidinu k feritinu, který odráží adekvátnost hladiny hepcidinu vzhledem k zásobám Fe. U stavů s narušenou, akcelerovanou a/nebo neefektivní erythropoézou je tento index výrazně snížen díky supresivnímu účinku erythropoetické aktivity na hepcidin (Mojzíkova et al., 2012). Tento

index dosahoval u mužů hodnoty 0.2909; u žen byl 1.6krát vyšší (0.4712), což odpovídá signifikantně nižší hladině feritinu u žen než u mužů (1.6krát); ani v jedné ze skupin se index hepcidin/feritin však signifikantně nelišil od indexu vypočtenému pro zdravé kontroly (0.3445) (*Mojzíkova et al., 2012*). Tento výsledek ukazuje na fyziologickou erythropoetickou aktivitu u této skupiny dárců krve a na skutečnost, že hladina hepcidinu je u nich fyziologicky snižená vzhledem k nižším zásobám Fe.

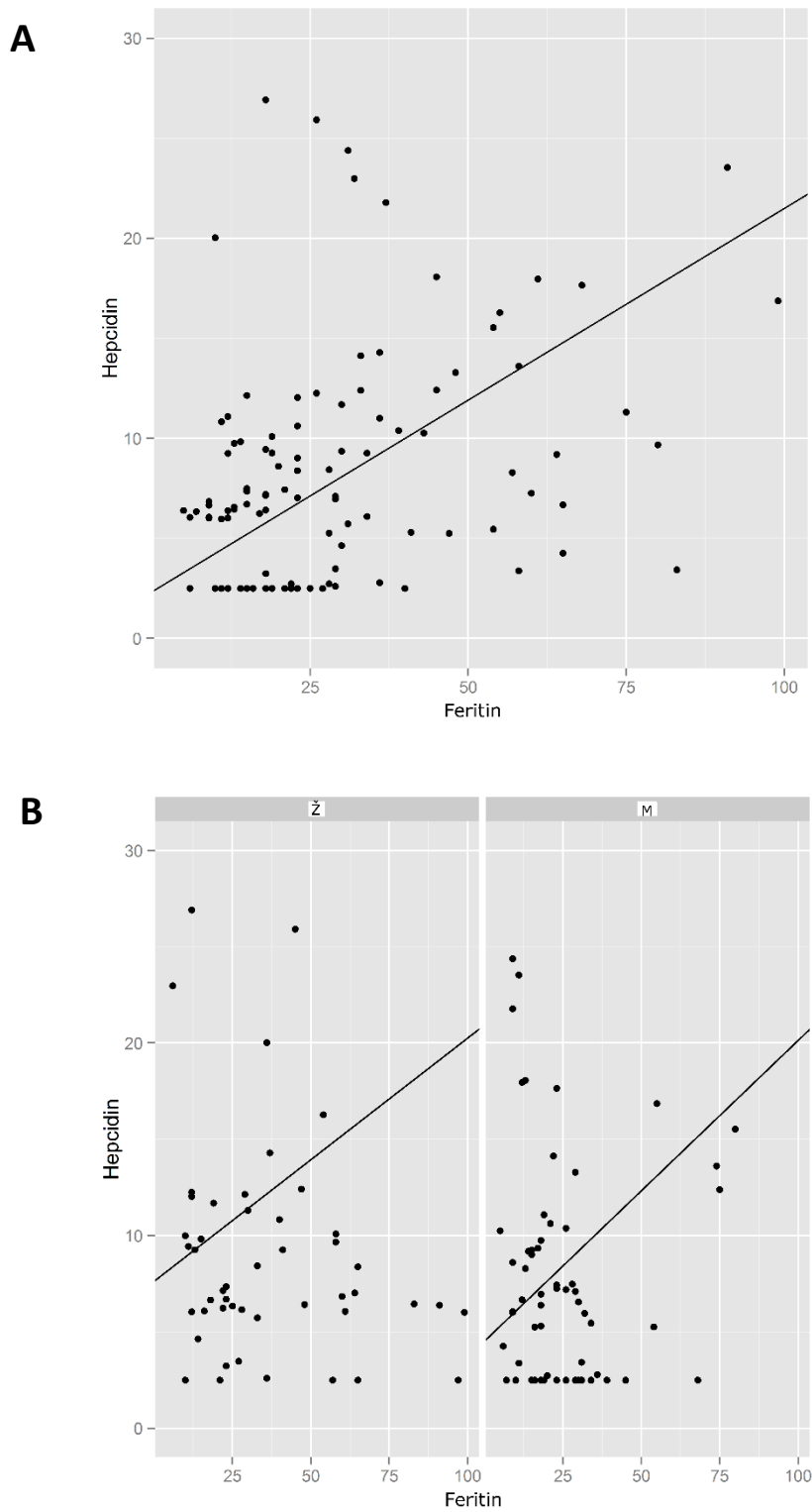
Na závěr byla provedena regresní analýza ke zjištění korelace vybraných parametrů krevního obrazu a metabolismu železa s hladinou hepcidinu. U mužů i u žen hladina feritinu pozitivně korelovala s hladinou hepcidinu (Tabulka 6; Graf 15). Korelaci hladiny hepcidinu s počtem odběrů jsme v našem souboru dárců nezaznamenali (Tabulka 6).

**Tabulka 6: Tobit regresní analýza závislosti hladin hepcidinu na vybraných parametrech krevního obrazu a metabolismus železa.**

p-value	Věk	Ery	Hb	Hkt	MCV	Trombo	Fe	Feritin	Počet odběrů
<b>Ž</b>	0.08	0.322	0.504	0.735	0.075	0.204	0.549	<b>0.015</b>	0.429
<b>M</b>	0.326	0.528	0.991	0.338	0.91	0.166	0.286	<b>&lt;0.001</b>	0.578

**Ž** ženy; **M** muži; **Ery** erytrocyty; **Hb** hemoglobin; **Hkt** hematokrit; **MCV** střední objem erytrocytů; **Trombo** trombocyty; **Fe** plazmatické železo.

**Graf 15: Graf korelace hladin hepcidinu a feritinu.**



*Hladina hepcidinu vykazuje pozitivní korelaci s hladinou feritinu u všech dárců (A) i u obou pohlaví odděleně (B). M muži; Ž ženy*

## 6.4 Diskuze

Česká republika se dlouhodobě potýká s relativním nedostatkem dárců krve. V roce 2013 bylo v České republice celkem 264 000 opakovaných/pravidelných dárců krve a 54 000 prvodárců (*Výroční zpráva zařízení transfuzní služby, 2013*). Identifikováním dárců krve s vyšším rizikem rozvoje deficitu zásob železa, by bylo možné zabránit jejich dočasnému vyřazení nebo ztrátě těchto osob z evidence dárců krve. Ve skupině prvodárců se k odběru během tří let vrátí 70%, pokud byl odběr realizovaný oproti 21%, jejichž odběr byl odložen kvůli nízké hladině hemoglobinu. U opakovaných dárců krve je situace obdobná, během tří let se vrátí po odkladu odběru z důvodu nízké hladiny hemoglobinu jen 64%, ze skupiny dárců bez odkladu se vrací 91% dárců (*Hillgrove et al., 2011*). Identifikací osob s vysokým rizikem rozvoje deficitu Fe by bylo možné předejít výskytu symptomů souvisejících s deficitem Fe, který je spojený se sníženou fyzickou a pracovní výkonností, zhoršenou schopností se soustředit, zvýšenou únavou a zhoršením ostatních kognitivních funkcí (*Falkingham et al., 2010; Murray-Kolb et al., 2007; Hinton, 2014*), což u nich může vést k rozhodnutí nepokračovat v dárcovství.

Laboratorně lze deficit Fe stanovit několika metodami, které jsou založené na měření hladin feritinu (*Cable et al., 2011*), solubilního TfR (*Pasricha et al., 2011*), transferinu a saturace transferinu, ZPP (*Baart et al., 2013*), všechny však mají své limity. Například feritin je ukazatelem prostých zásob Fe, ale neposkytuje informaci o buněčných potřebách Fe. Solubilní TfR se zvyšuje při nedostatečném přísunu funkčního Fe do buněk, jeho hladina ale současně stoupá se zvýšenou erythropoetickou aktivitou v kostní dřeni (*Pak et al., 2006*). Novým potenciálním markerem by mohl být hepcidin, který kontroluje hladinu Fe v krevním oběhu tím, že reguluje jeho uvolňování ze zásob a příjem z potravy. Navíc vlastní syntéza hepcidinu je regulována jak zásobami Fe a jeho plazmatickou hladinou, tak i aktuální erythropoetickou aktivitou (*Pak et al., 2006*) a odráží tak aktuální stav homeostázy železa. U anemie z deficitu železa je hladina hepcidinu výrazně snížena až nedetekovatelná.

Naše výsledky jsou v souladu s dosud publikovanými daty o výskytu deficitu Fe u dárců krve. Nejčastěji užívaným parametrem ke stanovení deficitu Fe je feritin. Studie z posledních let na dárcovské populaci poukazují na častý výskyt snížené hladiny feritinu u dárců krve (*Cable et al., 2011; Baart et al., 2013; Rigas et al., 2014; Goldman et al., 2014*). Studie Mast a kol. (*Mast et al., 2014*) ukázala na výhodu kombinované analýzy hladiny feritinu a hepcidinu. U dárců, u kterých byla zjištěna současně nízká hladina feritinu a hepcidinu, došlo při dalším

odběru k signifikantnímu snížení hemoglobinu o 0.51 g/l. Izolované snížení hepcidinu nebo feritinu naopak nebylo při následujícím odběru spojeno s poklesem hladiny hemoglobinu (*Mast et al., 2014*).

Deficit zásobního Fe se vyskytuje u dárců, kteří byli uschopněni k odběru a mají tedy vyhovující hladiny hemoglobinu, při hodnocení feritinu u 14.3% mužů a u 8.9% žen, v případě hepcidinu u 27.4% mužů a 24.7% žen (*Baart et al., 2013*). V naší dárcovské populaci byl deficit prostých zásob Fe určený hladinou feritinu dle očekávání nižší u mužů než u žen, což koresponduje s výsledky studie RISE (*Cable et al., 2011*). Zároveň současná analýza hladin hepcidinu pomohla odhalit vyšší podíl dárců potenciálně ohrožených deficitem Fe, než samostatné měření feritinu. Překvapivě ale mezi dárci krve s hladinou hepcidinu pod detekčním limitem metody bylo více mužů než žen, což je možné vysvětlit rozdílnou doporučenou frekvencí odběrů u mužů a žen. Velmi nízké hladiny hepcidinu před odběrem prokazují, že tito dárci již mají výrazný deficit železa pro erythropézu a při další depleci Fe by již nemuseli být schopni pokrýt potřeby organismu.

Stanovení hladiny hepcidinu u dárců krve tak poskytuje cenné informace o schopnosti dárce zvýšit absorpci Fe ze stravy a uvolnit Fe ze zásob – snižující se hladina hepcidinu vede ke zvýšení absorpce Fe ve střevě a redistribuci Fe ze zásob do aktivního kompartmentu (*Fleming, 2008*). Heparin je vylučován močí, a proto měření jeho hladiny v moči je teoreticky jedinou neinvazivní metodou ke zjištění deficitu Fe (*Sanad et al., 2011*) a mohlo by eventuálně doplnit již existující testy.

## 6.5 Závěr

Dárcovství krve je vždy spojeno se zásahem do metabolismu Fe. Při dnešních znalostech by bylo možné minimalizovat důsledky spojené s deficitem tohoto esenciálního prvku. V rámci péče o dárce je důležité identifikovat ty dárce, jejichž kompenzační zvýšení příjmu Fe je nedostačující k obnovení zásob Fe. Heparin jako centrální molekula řídící absorpci a redistribuci Fe je velmi užitečný indikátor metabolismu Fe. Stanovení hladiny hepcidinu u dárců, kteří splňují kritéria pro odběr, by v případě dárců s negativní bilancí Fe mohlo zabránit dalšímu prohlubování deficitu Fe. Uvedení vyšetření hladiny hepcidinu do rutinní praxe je však limitováno chyběním populačních norem a nesourodostí výsledků měření při použití komerčních setů ELISA a hmotnostní spektrometrie. Zavedení měření hladiny hepcidinu hmotnostní spektrometrií může výrazně zpřesnit diagnostiku subklinického deficitu Fe u dárců krve a lze předpokládat, že vzhledem k možnostem, které měření hladin hepcidinu poskytuje,

bude se nyní výzkum v oblasti metabolismu Fe zabývat právě optimalizací metod měření hepcidinu a jeho snadnou dostupností.

Z našich výsledků jasně vyplývá další důležitý poznatek: dárci krve nejsou vhodnou skupinou jedinců, kteří by mohli sloužit pro tvorbu populačních norem hladin hepcidinu vzhledem k patologickým hodnotám markerů metabolismu Fe.

## Reference

- Aisen P, Leibman A, Zweier J. Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin. *J Biol Chem.* 1978;253(6):1930-7.
- An, X, Mohandas, N. Disorders of red cell membrane. *Br J Haematol.* 2008; 141:367–375.
- Anderson CP, Shen M, Eisenstein RS, Leibold EA. Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1823(9):1468-83.
- Andriopoulos B Jr, Corradini E, Xia Y, Faasse SA, Chen S, Grgurevic L, Knutson MD, Pietrangelo A, Vukicevic S, Lin HY, Babitt JL. BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nat Genet.* 2009;41(4):482-7.
- Angastiniotis M, Modell B. Global epidemiology of hemoglobin disorders. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;850:251–269.
- Angelucci E, Baronciani D. Allogeneic stem cell transplantation for thalassemia major. *Haematologica.* 2008;93(12):1780-4.
- Anthony BA, Link DC. Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells. *Trends Immunol.* 2014 Jan;35(1):32-7.
- Arosio P, Levi S. Cytosolic and mitochondrial ferritins in the regulation of cellular iron homeostasis and oxidative damage. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1800(8):783-92.
- Ashby DR, Gale DP, Busbridge M, Murphy KG, Duncan ND, Cairns TD, Taube DH, Bloom SR, Tam FW, Chapman R, Maxwell PH, Choi P. Erythropoietin administration in humans causes a marked and prolonged reduction in circulating hepcidin. *Haematologica.* 2010;95(3):505-8.
- Athiyarath R, Arora N, Fuster F, Schwarzenbacher R, Ahmed R, George B, Chandy M, Srivastava A, Rojas AM, Sanchez M, Edison ES. Two novel missense mutations in iron transport protein transferrin causing hypochromic microcytic anaemia and haemosiderosis: molecular characterization and structural implications. *Br J Haematol.* 2013;163(3):404-7.
- Ayi, K, Turrini, F, Piga, A, et al. Enhanced phagocytosis of ring-parasitized in sickle trait and beta-thalassemia trait. *Blood.* 2004; 104:3364–3371.
- Baart AM, de Kort WL, Moons KG, Atsma F, Vergouwe Y. Zinc protoporphyrin levels have added value in the prediction of low hemoglobin deferral in whole blood donors. *Transfusion.* 2013;53(8):1661-9.
- Babitt JL, Huang FW, Wrighting DM, Xia Y, Sidis Y, Samad TA, Campagna JA, Chung RT, Schneyer AL, Woolf CJ, Andrews NC, Lin HY. Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat Genet.* 2006;38(5):531-9.
- Bastion Y, Coiffier B, Felman P, Assouline D, Tigaud JD, Espinouse D, Bryon PA. Massive mediastinal extramedullary hematopoiesis in hereditary spherocytosis: a case report. *Am J Hematol.* 1990;35(4):263-5.



- Basu S, Kumar A. Hair-on-end appearance in radiograph of skull and facial bones in a case of beta thalassaemia. *Br J Haematol.* 2009;144(6):807.
- Bauskin AR, Brown DA, Kuffner T, Johnen H, Luo XW, Hunter M, Breit SN. Role of macrophage inhibitory cytokine-1 in tumorigenesis and diagnosis of cancer. *Cancer Res.* 2006 May 15;66(10):4983-6. Review.
- Beard, JL, Dawson, H, Pinero, DJ. Iron metabolism: a comprehensive review. *Nutr Rev.* 1996; 54:295–317.
- Benz EJ, Schrier SL Landaw SA. Clinical manifestation and diagnosis of the talassemias. [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com). Last updated: Dec 17, 2014.
- Bolton-Maggs PH, Stevens RF, Dodd NJ, Lamont G, Tittensor P, King MJ; General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis. *Br J Haematol.* 2004;126(4):455-74.
- Bootcov MR, Bauskin AR, Valenzuela SM, Moore AG, Bansal M, He XY, Zhang HP, Donnellan M, Mahler S, Pryor K, Walsh BJ, Nicholson RC, Fairlie WD, Por SB, Robbins JM, Breit SN. MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF-beta superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Oct 14;94(21):11514-9
- Brabec V, Marík T, Feixová H, Slavíková V. [New tests for laboratory diagnosis of spherocytosis]. *Vnitr Lek.* 1991;37(11-12):883-7.
- Bruce LJ, Guizouarn H, Burton NM, Gabillat N, Poole J, Flatt JF, Brady RL, Borgese F, Delaunay J, Stewart GW. The monovalent cation leak in overhydrated stomatocytic red blood cells results from amino acid substitutions in the Rh-associated glycoprotein. *Blood.* 2009;113(6):1350-7.
- Cable RG, Glynn SA, Kiss JE, et al. NHLBI Retrovirus Epidemiology Donor Study-II. Iron deficiency in blood donors: analysis of enrollment data from the REDS-II Donor Iron Status Evaluation (RISE) study. *Transfusion.* 2011;51(3):511-22.
- Canonne-Hergaux F, Zhang AS, Ponka P, Gros P. Characterization of the iron transporter DMT1 (NRAMP2/DCT1) in red blood cells of normal and anemic mk/mk mice. *Blood.* 2001;98(13):3823-30.
- Carmona U, Li L, Zhang L, Knez M. Ferritin light-chain subunits: key elements for the electron transfer across the protein cage. *Chem Commun (Camb).* 2014;50(97):15358-61.
- Carr S, Rubin L, Dixon D, Star J, Dailey J. Intrauterine therapy for homozygous alpha-thalassaemia. *Obstet Gynecol.* 1995;85(5 Pt 2):876-9.
- Coleman M. Iron metabolism. In: Rodak BF, Fritsma GA, Keohane OA. *Hematology: clinical principles and applications.* 4. vyd., Elsevier, Missouri, 2012; 144-151
- Conrad, ME. Introduction: iron overloading and iron regulation. *Semin Hematol.* 1998; 35: 1–4.

Core AB, Canali S, Babitt JL. Hemojuvelin and bone morphogenetic protein (BMP) signaling in iron homeostasis. *Front Pharmacol.* 2014;5:104.

Da Costa L, Galimand J, Fenneteau O, Mohandas N. Hereditary spherocytosis, elliptocytosis, and other red cell membrane disorders. *Blood Rev.* 2013;27(4):167-78.

De Domenico I, Ward DM, Musci G, Kaplan J. Evidence for the multimeric structure of ferroportin. *Blood.* 2007;109:2205–2209.

De Domenico I, Ward DM, Nemeth E, Vaughn MB, Musci G, Ganz T, Kaplan J. The molecular basis of ferroportin-linked hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:8955–8960.

Dhermy, D, Schrevel, J, Lecomte, M-C. Spectrin-based skeleton in red blood cells and malaria. *Curr Opin Hematol.* 2007; 14:198–202.

Divoky V, Walczyskova S, Pospisilova D, Priwitzerova M, Takacova S, Kostelecka I, Divoka M, Rozmanova S, Jarosova M, Cermak J, Indrak K. [Rare forms of hereditary anaemia in the Czech and Slovak populations –  $\beta$ - and  $\delta\beta$ -thalassaemia and unstable haemoglobin variants] *Vnitr Lek* 2005;51:886-93.

Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL2007\_03: Posuzování způsobilosti k dárcovství krve a krevních složek, verze 7, 12. 4. 2007, dostupné z: [http://www.transfuznispolocnost.cz/index.php?page=dokumenty&identifikator\\_kategorie=DO PORUCENE\\_POSTUPY](http://www.transfuznispolocnost.cz/index.php?page=dokumenty&identifikator_kategorie=DO PORUCENE_POSTUPY).

Dragean CA, Duquesne L, Theate I, Ghaye B, Coche EE. Extramedullary haemopoiesis and spinal cord compression. *Lancet.* 2011;377(9761):251.

Falkingham M, Abdelhamid A, Curtis P, Fairweather-Tait S, Dye L, Hooper L. The effects of oral iron supplementation on cognition in older children and adults: a systematic review and meta-analysis. *Nutr J.* 2010 Jan 25;9:4.

Ferreira C, Bucchini D, Martin ME, Levi S, Arosio P, Grandchamp B, Beaumont C. Early embryonic lethality of H ferritin gene deletion in mice. *J Biol Chem.* 2000;275(5):3021-4.

Ferreira C, Santambrogio P, Martin ME, Andrieu V, Feldmann G, Hénin D, Beaumont C. H ferritin knockout mice: a model of hyperferritinemia in the absence of iron overload. *Blood.* 2001;98(3):525-32.

Finotti A, Breda L, Lederer CW, Bianchi N, Zuccato C, Kleanthous M, Rivella S, Gambari R. Recent trends in the gene therapy of  $\beta$ -thalassemia. *J Blood Med.* 2015;6:69-85.

Finsterer J, Stöllberger C. Myopathy associated with spherocytosis and left ventricular hypertrabeculation/noncompaction. *Eur J Heart Fail.* 2007;9(1):100

Fleming MD. The regulation of hepcidin and its effects on systemic and cellular iron metabolism. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2008:151-8.

Fung EB, Harmatz PR, Lee PD, Milet M, Bellevue R, Jeng MR, Kalinyak KA, Hudes M, Bhatia S, Vichinsky EP; Multi-Centre Study of Iron Overload Research Group. Increased prevalence

of iron-overload associated endocrinopathy in thalassaemia versus sickle-cell disease. *Br J Haematol.* 2006;135(4):574-82.

Galanello, R, Cao, A. Relationship between genotype and phenotype: thalassemia intermedia. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 850:325–333.

Gallagher PG. Abnormalities of the erythrocyte membrane. *Pediatr Clin North Am.* 2013;60(6):1349-62.

Gallagher PG. Update on the clinical spectrum and genetics of red blood cell membrane disorders. *Curr Hematol Rep.* 2004 Mar;3(2):85-91. Review.

Gallagher, PG. Hereditary elliptocytosis: spectrin and protein 4.1R. *Semin Hematol .* 2004; 41:142–164.

Ganz T and Nemeth E. Heparin and disorders of iron metabolism. *Annu Rev Med* 2011;62:347-60.

Ganz T. Heparin and iron regulation, 10 years later. *Blood.* 2011 Apr 28;117(17):4425-33.

Ganz T. Heparin in iron metabolism. *Curr Opin Hematol* 2004;11:251–4.

Gao J, Chen J, Kramer M, Tsukamoto H, Zhang AS, Enns CA. Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferrin receptor 2 is required for transferrin-induced heparin expression. *Cell Metab.* 2009;9(3):217-27.

Goldman M, Uzicanin S, Scalia V, O'Brien SF. Iron deficiency in Canadian blood donors. *Transfusion.* 2014;54(3 Pt 2):775-9.

Goldwurm S, Casati C, Venturi N, Strada S, Santambrogio P, Indraccolo S, Arosio P, Cazzola M, Piperno A, Masera G, Biondi A. Biochemical and genetic defects underlying human congenital hypotransferrinemia. *Hematol J.* 2000;1(6):390-8.

Goss C, Giardina P, Degtyaryova D, Kleinert D, Sheth S, Cushing M. Red blood cell transfusions for thalassemia: results of a survey assessing current practice and proposal of evidence-based guidelines. *Transfusion.* 2014;54(7):1773-81.

Goswami T, Andrews NC. Hereditary hemochromatosis protein, HFE, interaction with transferrin receptor 2 suggests a molecular mechanism for mammalian iron sensing. *J Biol Chem.* 2006;281(39):28494-8.

Greer SN, Metcalf JL, Wang Y, Ohh M. The updated biology of hypoxia-inducible factor. *EMBO J.* 2012;31(11):2448-60.

Guimarães JS, Cominal JG, Silva-Pinto AC, Olbina G, Ginzburg YZ, Nandi V, Westerman M, Rivella S, de Souza AM. Altered erythropoiesis and iron metabolism in carriers of thalassemia. *Eur J Haematol* 2015;94(6):511-8.

Gupta, P, Blazar, B, Gupta, K, et al. Human CD34+ bone marrow cells regulate stromal production of interleukin-6 and granulocyte colony-stimulating factor and increase the colony-stimulating activity of stroma. *Blood.* 1998; 91:3724–3733.

- Haddad A, Tyan P, Radwan A, Mallat N, Taher A.  $\beta$ -Thalassemia Intermedia: A Bird's-Eye View. *Turk J Haematol.* 2014;31(1):5-16.
- Haines D, Martin M, Carson S, Oliveros O, Green S, Coates T, Eile J, Schilling L, Dinu B, Mendoza T, Gerstenberger E, Trachtenberg F, Vichinsky E; Thalassemia Clinical Research Network. Pain in thalassaemia: the effects of age on pain frequency and severity. *Br J Haematol.* 2013;160(5):680-7.
- Heeney MM, Finberg KE. Iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). *Hematol Oncol Clin North Am.* 2014;28(4):637-52.
- Hillgrove T, Moore V, Doherty K, Ryan P. The impact of temporary deferral due to low hemoglobin: future return, time to return, and frequency of subsequent donation. *Transfusion.* 2011;51(3):539-47.
- Hinton PS. Iron and the endurance athlete. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2014;39(9):1012-8.
- Chen Y, Zhang S, Wang X, Guo W, Wang L, Zhang D, Yuan L, Zhang Z, Xu Y, Liu S. Disordered signaling governing ferroportin transcription favors breast cancer growth. *Cell Signal.* 2015;27(1):168-76.
- Chui, DHK, Waye, JS. Hydrops fetalis caused by  $\alpha$ -thalassemia: an emerging health care problem. *Blood.* 1998; 91:2213–2222.
- Iglauer A, Reinhardt D, Schröter W, Pekrun A. Cryohemolysis test as a diagnostic tool for hereditary spherocytosis. *Ann Hematol.* 1999;78(12):555-7.
- Jonášová A. Přetížení železem u chronicky transfundovaných nemocných a jeho terapie. *Postgr. Med.* 08/2012, dostupné: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/pretizeni-zelezem-u-chronicky-transfundovanych-nemocnych-a-jeho-terapie-467140>.
- Jones E, Pasricha SR, Allen A, Evans P, Fisher CA, Wray K, Premawardhena A, Bandara D, Perera A, Webster C, Sturges P, Olivieri NF, St Pierre T, Armitage AE, Porter JB, Weatherall DJ, Drakesmith H. Hcpidin is suppressed by erythropoiesis in hemoglobin E  $\beta$ -thalassemia and  $\beta$ -thalassemia trait. *Blood* 2015;125(5):873-80.
- Jubinsky PT, Krijanovski OI, Nathan DG, Tavernier J, Sieff CA. The beta chain of the interleukin-3 receptor functionally associates with the erythropoietin receptor. *Blood.* 1997 Sep 1;90(5):1867-73.
- Kanda J, Mizumoto C, Kawabata H, Tsuchida H, Tomosugi N, Matsuo K, Uchiyama T. Serum hepcidin level and erythropoietic activity after hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica.* 2008 Oct;93(10):1550-4.
- Karimi M, Bagheri MH, Tahmtan M, Shakibafard A, Rashid M. Prevalence of hepatosplenomegaly in beta thalassemia minor subjects in Iran. *Eur J Radiol.* 2009;69(1):120-2.

- Kautz L, Jung G, Valore EV, Rivella S, Nemeth E, Ganz T. Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nat Genet.* 2014;46(7):678-84.
- Kautz L, Meynard D, Monnier A, Darnaud V, Bouvet R, Wang RH, Deng C, Vaulont S, Mosser J, Coppin H, Roth MP. Iron regulates phosphorylation of Smad1/5/8 and gene expression of Bmp6, Smad7, Id1, and Atoh8 in the mouse liver. *Blood.* 2008;112(4):1503-9.
- Kawabata H, Yang R, Hiramata T, Vuong PT, Kawano S, Gombart AF, Koeffler HP. Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *J Biol Chem.* 1999;274(30):20826-32.
- King MJ, Behrens J, Rogers C, Flynn C, Greenwood D, Chambers K. Rapid flow cytometric test for the diagnosis of membrane cytoskeleton-associated haemolytic anaemia. *Br J Haematol.* 2000;111(3):924-33.
- Krause A, Neitz S, Mägert HJ, Schulz A, Forssmann WG, Schulz-Knappe P, Adermann K. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett.* 2000;480(2-3):147-50.
- Kwiatkowski JL, Kim HY, Thompson AA, Quinn CT, Mueller BU, Odame I, Giardina PJ, Vichinsky EP, Boudreaux JM, Cohen AR, Porter JB, Coates T, Olivieri NF, Neufeld EJ; Thalassemia Clinical Research Network. Chelation use and iron burden in North American and British thalassemia patients: a report from the Thalassemia Longitudinal Cohort. *Blood.* 2012;119(12):2746-53.
- Lakhal-Littleton S, Wolna M, Carr CA, Miller JJ, Christian HC, Ball V, Santos A, Diaz R, Biggs D, Stillion R, Holdship P, Larner F, Tyler DJ, Clarke K, Davies B, Robbins PA. Cardiac ferroportin regulates cellular iron homeostasis and is important for cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(10):3164-9. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(14):E1812.
- Lawen A, Lane DJ. Mammalian iron homeostasis in health and disease: uptake, storage, transport, and molecular mechanisms of action. *Antioxid Redox Signal.* 2013;18(18):2473-507.
- Le Blanc S, Garrick MD, Arredondo M. Heme carrier protein 1 transports heme and is involved in heme-Fe metabolism. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2012;302(12):C1780-5.
- Li PX, Wong J, Ayed A, Ngo D, Brade AM, Arrowsmith C, Austin RC, Klamut HJ. Placental transforming growth factor-beta is a downstream mediator of the growth arrest and apoptotic response of tumor cells to DNA damage and p53 overexpression. *J Biol Chem.* 2000 Jun 30;275(26):20127-35.
- Lim JH, Park JW, Min DS, Chang JS, Lee YH, Park YB, Choi KS, Kwon TK. NAG-1 up-regulation mediated by EGR-1 and p53 is critical for quercetin-induced apoptosis in HCT116 colon carcinoma cells. *Apoptosis.* 2007 Feb;12(2):411-21
- Liu XB, Yang F, Haile DJ. Functional consequences of ferroportin 1 mutations. *Blood Cells Mol Dis.* 2005;35(1):33-46.

Lorey F, Charoenkwan P, Witkowska HE, Lafferty J, Patterson M, Eng B, Waye JS, Finklestein JZ, Chui DH. Hb H hydrops foetalis syndrome: a case report and review of literature. *Br J Haematol.* 2001;115(1):72-8.

Lucarelli G, Gaziev J. Advances in the allogeneic transplantation for thalassemia. *Blood Rev.* 2008;22(2):53-63.

Martin A, Thompson AA. Thalassemias. *Pediatr Clin North Am.* 2013;60(6):1383-91.

Mast AE. Low hemoglobin deferral in blood donors. *Transfus Med Rev.* 2014;28(1):18-22.

McCarthy RC, Park YH, Kosman DJ. sAPP modulates iron efflux from brain microvascular endothelial cells by stabilizing the ferrous iron exporter ferroportin. *EMBO Rep.* 2014;15(7):809-15.

McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, Rolfs A, Sager G, Mudaly E, Mudaly M, Richardson C, Barlow D, Bomford A, Peters TJ, Raja KB, Shirali S, Hediger MA, Farzaneh F, Simpson RJ. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science.* 2001;291(5509):1755-9.

Mehta RP, Keohane EM. Thalassemias. In: Rodak BF, Fritsma GA, Keohane OA. *Hematology: clinical principles and applications.* 4. vyd., Elsevier, Missouri, 2012; 408-425

Metcalf, D. On hematopoietic stem cell fate. *Immunity.* 2007; 26:669–673.

Meynard D, Kautz L, Darnaud V, Canonne-Hergaux F, Coppin H, Roth MP. Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload. *Nat Genet.* 2009;41(4):478-81.

Mockenhaupt FP, Ehrhardt S, Gellert S et al. Alpha(+)-thalassemia protects African children from severe malaria. *Blood.* 2004; 104:2003–2006.

Mohandas, N, Gallagher, PG. Red cell membrane: past, present, future. *Blood.* 2008; 112:3939–3948.

Mojzíkova R, Koralkova P, Holub D, Zidova Z, Pospisilova D, Cermak J, Striezencova L, Luluhova Z, Indrak K, Sukova M, Partschova M, Kucerova J, Horvathova M, Divoky V. Iron status in patients with pyruvate kinase deficiency: neonatal hyperferritinaemia associated with a novel frameshift deletion in the PKLR gene (p.Arg518fs), and low hepcidin to ferritin ratios. *Br J Haematol* 2014;165(4):556-63.

Murray-Kolb LE, Beard JL. Iron treatment normalizes cognitive functioning in young women. *Am J Clin Nutr.* 2007 Mar;85(3):778-87.

Musallam KM, Taher AT, Duca L, Cesaretti C, Halawi R, Cappellini MD. Levels of growth differentiation factor-15 are high and correlate with clinical severity in transfusion-independent patients with  $\beta$  thalassemia intermedia. *Blood Cells Mol Dis.* 2011 Dec 15;47(4):232-4

Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, Ganz T. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest.* 2004;113(9):1271-6.

- Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, Kaplan J. Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. 2004;306(5704):2090-3.
- Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T. Heparin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood*. 2003;101(7):2461-3.
- Nemeth E. Heparin in beta-thalassemia. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1202:31-5.
- Niederkofler V, Salie R, Arber S. Hemojuvelin is essential for dietary iron sensing, and its mutation leads to severe iron overload. *J Clin Invest*. 2005;115(8):2180-6.
- Ogawa, M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood*. 1993; 81:2844–2853.
- Olivieri NF. The beta-thalassemias. *N Engl J Med*. 1999 Jul 8;341(2):99-109. Review. Erratum in: *N Engl J Med* 1999;341(18):1407.
- Origa R, Galanello R, Ganz T, Giagu N, Maccioni L, Faa G, Nemeth E. Liver iron concentrations and urinary heparin in beta-thalassemia. *Haematologica*. 2007;92(5):583-8.
- Oron V, Filon D, Oppenheim A, Rund D. Severe thalassaemia intermedia caused by interaction of homozygosity for alpha-globin gene triplication with heterozygosity for beta zero-thalassaemia. *Br J Haematol*. 1994;86(2):377-9.
- Pak M, Lopez MA, Gabayan V, Ganz T, Rivera S. Suppression of heparin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood* 2006;108(12):3730-5.
- Pantopoulos K. Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1012:1-13.
- Papanikolaou G, Tzilianos M, Christakis J, Bogdanos D, Tsimirika K, MacFarlane J, Goldberg YP, Sakellaropoulos N, Ganz T, Nemeth E. Heparin in iron overload disorders. *Blood* 2005;105(10):4103-5.
- Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Heparin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem*. 2001;276(11):7806-10.
- Parrow NL, Fleming RE. Bone morphogenetic proteins as regulators of iron metabolism. *Annu Rev Nutr*. 2014;34:77-94.
- Pasricha SR, Frazer DM, Bowden DK, Anderson GJ. Transfusion suppresses erythropoiesis and increases heparin in adult patients with  $\beta$ -thalassaemia major: a longitudinal study. *Blood* 2013;122(1):124-33.
- Pasricha SR, McQuilten ZK, Keller AJ, Wood EM. Hemoglobin and iron indices in nonanemic premenopausal blood donors predict future deferral from whole blood donation. *Transfusion*. 2011;51(12):2709-13.

- Pattanapanyasat, K, Yongvanitchit, K, Tongtawe, P, et al. Impairment of Plasmodium falciparum growth in thalassemic red blood cells: further evidence by using biotin labeling and flow cytometry. *Blood*. 1999; 93:3116–3119.
- Pepe A, Meloni A, Rossi G, Caruso V, Cuccia L, Spasiano A, Gerardi C, Zuccarelli A, D'Ascola DG, Grimaldi S, Santodirocco M, Campisi S, Lai ME, Piraino B, Chiodi E, Ascoti C, Gulino L, Positano V, Lombardi M, Gamberini MR. Cardiac complications and diabetes in thalassaemia major: a large historical multicentre study. *Br J Haematol*. 2013;163(4):520-7.
- Perrotta S, Gallagher PG, Mohandas N. Hereditary spherocytosis. *Lancet*, 2008;372:1411–1426
- Petrak J, Vyoral D. Hephaestin--a ferroxidase of cellular iron export. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37(6):1173-8.
- Peyssonnaud C, Zinkernagel AS, Schuepbach RA, Rankin E, Vaulont S, Haase VH, Nizet V, Johnson RS. Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *J Clin Invest*. 2007;117(7):1926-32.
- Pietrangolo A. Physiology of iron transport and the hemochromatosis gene. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002;282(3):G403-14.
- Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, Loréal O. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem*. 2001;276(11):7811-9.
- Polák P, Kosina P, Blechová Z, Koteň J, Rozsypal H, Chlábek R, Beneš J. Doporučený postup péče o pacienty s porušenou či zaniklou funkcí sleziny (hyposplenism/asplenií). Společnost infekčního lékařství, České vakcinologická společnost České lékařské společnosti J. E. Purkyně. Březen 2013. Dostupné: <http://www.infekce.cz/DopOPSII13.htm>
- Pospisilova D, Holub D, Zidova Z, Sulovska L, Houda J, Mihal V, Hadacova I, Radova L, Dzubak P, Hajdich M, Divoky V, Horvathova M. Hepcidin levels in Diamond-Blackfan anemia reflect erythropoietic activity and transfusion dependency. *Haematologica* 2014;99(7):e118-21.
- Prabhakaran K, Jacobs BL, Smaldone MC, Franks ME. Stuttering priapism associated with hereditary spherocytosis. *Can J Urol*. 2007;14(5):3702-4.
- Priwitzerova M, Pospisilova D, Prchal JT, et al. Severe hypochromic microcytic anemia caused by a congenital defect of the iron transport pathway in erythroid cells. *Blood*. 2004;103: 3991-3992.
- Rabhi S, Benjelloune H, Meziane M, Amrani M, Berrady R, Mikou O, Mernissi FZ, Bono W. Hereditary spherocytosis with leg ulcers healing after splenectomy. *South Med J*. 2011;104(2):150-2.
- Rachmilewitz EA, Giardina PJ. How I treat thalassemia. *Blood*. 2011;118(13):3479-88.



- Ramirez JM, Schaad O, Durual S, et al. Growth differentiation factor 15 production is necessary for normal erythroid differentiation and is increased in refractory anaemia with ring-sideroblasts. *Br J Haematol.* 2009;144:251–262.
- Rausa M, Ghitti M, Pagani A, Nai A, Campanella A, Musco G, Camaschella C, Silvestri L. Identification of Tmprss6 cleavage sites of hemojuvelin. *J Cell Mol Med.* 2015;19(4):879-88.
- Rice AE, Mendez MJ, Hokanson CA, Rees DC, Bjorkman PJ. Investigation of the biophysical and cell biological properties of ferroportin, a multipass integral membrane protein iron exporter. *J Mol Biol.* 2009;386:717–732.
- Rigas AS, Sørensen CJ, Pedersen OB et. al. Predictors of iron levels in 14,737 Danish blood donors: results from the Danish Blood Donor Study. *Transfusion.* 2014; 54:789-96.
- Rishi G, Wallace DF, Subramaniam VN. Heparin: regulation of the master iron regulator. *Biosci Rep.* 2015 Mar 31;35(3).
- Ronzoni L, Sonzogni L, Duca L, Graziadei G, Cappellini MD, Ferru E. Growth Differentiation Factor 15 expression and regulation during erythroid differentiation in non-transfusion dependent thalassemia. *Blood Cells Mol Dis* 2015;54(1):26-8.
- Rouault TA. The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat Chem Biol.* 2006;2(8):406-14.
- Sanad M, Gharib AF. Urinary hepcidin level as an early predictor of iron deficiency in children: A case control study. *Ital J Pediatr.* 2011;37:37.
- Sasaki Y, Noguchi-Sasaki M, Yasuno H, Yorozu K, Shimonaka Y. Erythropoietin stimulation decreases hepcidin expression through hematopoietic activity on bone marrow cells in mice. *Int J Hematol.* 2012;96(6):692-700.
- Semenza GL. Involvement of oxygen-sensing pathways in physiologic and pathologic erythropoiesis. *Blood.* 2009 Sep 3;114(10):2015-9.
- Shalev H, Perez-Avraham G, Kapelushnik J, Levi I, Rabinovich A, Swinkels DW, Brasse-Lagnel C, Tamary H. High levels of soluble serum hemojuvelin in patients with congenital dyserythropoietic anemia type I. *Eur J Haematol* 2013;90(1):31-6.
- Sham RL, Phatak PD, Nemeth E, Ganz T. Hereditary hemochromatosis due to resistance to hepcidin: high hepcidin concentrations in a family with C326 ferroportin mutation. *Blood.* 2009;114(2):493-4.
- Schechter AN. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood.* 2008;112(10):3927-38.
- Schmidt PJ, Toran PT, Giannetti AM, Bjorkman PJ, Andrews NC. The transferrin receptor modulates Hfe-dependent regulation of hepcidin expression. *Cell Metab.* 2008;7(3):205-14.

Sieff CA, Daley GQ, Zon LI. Anatomy and physiology of Hematopoiesis. In: Orkin SH, Nathan DG, Ginsburg D, Look AT, Fisher DE, Lux SE. Nathan and Oski's Hematology and oncology of infancy and childhood. 8. vyd. Elsevier, Philadelphia, 2015;215-312

Sieff CA, Schrier SL, Landaw SA. Regulation of erythropoiesis. Uptodate.com. Last update: duben 2015. Zdroj: www.uptodate.com.

Silvestri L, Pagani A, Nai A, De Domenico I, Kaplan J, Camaschella C. The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *Cell Metab.* 2008;8(6):502-11.

Sirichotiyakul, S, Tantipalakorn, C, Sanguanserm Sri, T, et al. Erythrocyte osmotic fragility test for screening of alpha-thalassemia-1 and beta-thalassemia trait in pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet.* 2004; 86:347–350.

Smith R. Hematopoiesis. In: Rodak BF, Fritsma GA, Keohane OA. Hematology: clinical principles and applications. 4. vyd., Elsevier, Missouri, 2012; 84-103.

Sodani P, Gaziev D, Polchi P, Erer B, Giardini C, Angelucci E, Baronciani D, Andreani M, Manna M, Nesci S, Lucarelli B, Clift RA, Lucarelli G. New approach for bone marrow transplantation in patients with class 3 thalassemia aged younger than 17 years. *Blood.* 2004;104(4):1201-3.

Taher A, Hershko C, Cappellini MD. Iron overload in thalassaemia intermedia: reassessment of iron chelation strategies. *Br J Haematol.* 2009;147(5):634-40.

Taher AT, Musallam KM, Karimi M, El-Beshlawy A, Belhoul K, Daar S, Saned MS, El-Chafic AH, Fasulo MR, Cappellini MD. Overview on practices in thalassemia intermedia management aiming for lowering complication rates across a region of endemicity: the OPTIMAL CARE study. *Blood.* 2010;115(10):1886-92.

Tamary H, Aviner S, Freud E, Miskin H, Krasnov T, Schwarz M, Yaniv I. High incidence of early cholelithiasis detected by ultrasonography in children and young adults with hereditary spherocytosis. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2003;25(12):952-4.

Tan M, Wang Y, Guan K, Sun Y. PTGF-beta, a type beta transforming growth factor (TGF-beta) superfamily member, is a p53 target gene that inhibits tumor cell growth via TGF-beta signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jan 4;97(1):109-14.

Tanno T, Bhanu NV, Oneal PA, Goh SH, Staker P, Lee YT, Moroney JW, Reed CH, Luban NL, Wang RH, Eling TE, Childs R, Ganz T, Leitman SF, Fucharoen S, Miller JL. High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat Med.* 2007 Sep;13(9):1096-101

Tanno T, Porayette P, Sripichai O, Noh SJ, Byrnes C, Bhupatiraju A, Lee YT, Goodnough JB, Harandi O, Ganz T, Paulson RF, Miller JL. Identification of TWSG1 as a second novel erythroid regulator of hepcidin expression in murine and human cells. *Blood.* 2009;114(1):181-6.

Tassiopoulos T, Rombos Y, Konstantopoulos K, Revenas K, Tassiopoulos S, Aessopos A. Spleen size in beta-thalassaemia heterozygotes. *Haematologia (Budap)*. 1995;26(4):205-9.

Theil EC. Ferritin: the protein nanocage and iron biomineral in health and in disease. *Inorg Chem*. 2013;52(21):12223-33.

Thein, SL. Pathophysiology of beta thalassemia-a guide to molecular therapies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005; 31–37.

Thomas ED, Buckner CD, Sanders JE, Papayannopoulou T, Borgna-Pignatti C, De Stefano P, Sullivan KM, Clift RA, Storb R. Marrow transplantation for thalassaemia. *Lancet*. 1982;2(8292):227-9.

Thornburg CD, Ware RE. The utility of the autohaemolysis test for children with congenital haemolytic anaemia. *Clin Lab Haematol*. 2003;25(1):25-8

Till, TE, McCulloch, EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse marrow cells. *Radiat Res*. 1961; 14:213–222.

Torti FM, Torti SV. Regulation of ferritin genes and protein. *Blood*. 2002;99(10):3505-16.

Valore EV, Ganz T. Posttranslational processing of hepcidin in human hepatocytes is mediated by the prohormone convertase furin. *Blood Cells Mol Dis*. 2008;40(1):132-8.

Vogiatzi MG, Macklin EA, Trachtenberg FL, Fung EB, Cheung AM, Vichinsky E, Olivieri N, Kirby M, Kwiatkowski JL, Cunningham M, Holm IA, Fleisher M, Grady RW, Peterson CM, Giardina PJ; Thalassaemia Clinical Research Network. Differences in the prevalence of growth, endocrine and vitamin D abnormalities among the various thalassaemia syndromes in North America. *Br J Haematol*. 2009;146(5):546-56.

Vokurka M, Krijt J, Sulc K, Necas E. Hepcidin mRNA levels in mouse liver respond to inhibition of erythropoiesis. *Physiol Res*. 2006;55(6):667-74.

Vulpe CD, Kuo YM, Murphy TL, Cowley L, Askwith C, Libina N, Gitschier J, Anderson GJ. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat Genet*. 1999;21(2):195-9.

Vyhláška MZ ČR 143/2008 Sb. o stanovení bližších požadavků pro zajištění jakosti a bezpečnosti lidské krve a jejích složek (vyhláška o lidské krvi).

Výroční zpráva zařízení transfuzní služby 2013, MZ ČR, dostupné z: [http://www.mzcr.cz/dokumenty/zprava-o-cinnosti-zarizeni-transfuzni-sluzby-za-rok-2013\\_9292\\_1952\\_3.html](http://www.mzcr.cz/dokumenty/zprava-o-cinnosti-zarizeni-transfuzni-sluzby-za-rok-2013_9292_1952_3.html).

Wallace DF, Harris JM, Subramaniam VN. Functional analysis and theoretical modeling of ferroportin reveals clustering of mutations according to phenotype. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010;298:C75–84.

Wallace DF, Summerville L, Crampton EM, Frazer DM, Anderson GJ, Subramaniam VN. Combined deletion of Hfe and transferrin receptor 2 in mice leads to marked dysregulation of hepcidin and iron overload. *Hepatology*. 2009;50(6):1992-2000.

Wallander ML, Leibold EA, Eisenstein RS. Molecular control of vertebrate iron homeostasis by iron regulatory proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1763(7):668-89.

Wang RH, Li C, Xu X, Zheng Y, Xiao C, Zerfas P, Cooperman S, Eckhaus M, Rouault T, Mishra L, Deng CX. A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell Metab*. 2005;2(6):399-409.

Ward DM, Kaplan J. Ferroportin-mediated iron transport: expression and regulation. *Biochem Biophys Acta*. 2012;1823(9):1426-33.

Weatherall DJ, Clegg, JB. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bull World Health Organ*. 2001;79:704–712.

Whitfield CF, Follweiler JB, Lopresti-Morrow L, Miller BA. Deficiency of alpha-spectrin synthesis in burst-forming units-erythroid in lethal hereditary spherocytosis. *Blood*. 1991;78(11):3043-51.

Whitman M. Smads and early developmental signaling by the TGFbeta superfamily. *Genes Dev*. 1998 Aug 15;12(16):2445-62. Review. PubMed PMID: 9716398.

Williams TN, Wambua S, Uyoga S et al. Both heterozygous and homozygous  $\alpha$  + thalassemia protect against severe and fatal Plasmodium falciparum malaria on the coast of Kenya. *Blood*. 2005; 106:368–371.

Woods, S, DeMarco, T, Friedland, M. Iron metabolism. *Am J Gastroenterol* . 1990; 85:1–8.

Worwood, M. The laboratory assessment of iron status-an update. *Clin Chem Acta*. 1997; 259:3–23.

Wu H, Klingmüller U, Besmer P, Lodish HF. Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors. *Nature*. 1995 Sep 21;377(6546):242-6.

Wu H, Liu X, Jaenisch R, Lodish HF. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell*. 1995 Oct 6;83(1):59-67.

Wu XG, Wang Y, Wu Q, Cheng WH, Liu W, Zhao Y, Mayeur C, Schmidt PJ, Yu PB, Wang F, Xia Y. HFE interacts with the BMP type I receptor ALK3 to regulate hepcidin expression. *Blood*. 2014;124(8):1335-43.

Yang F, Haile DJ, Wang X, Dailey LA, Stonehuerner JG, Ghio AJ. Apical location of ferroportin 1 in airway epithelia and its role in iron detoxification in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005;289(1):L14-23.

Yang YM, Donnell C, Wilborn W, Goodman WR, Files B, Moore RB. Splenic sequestration associated with sickle cell trait and hereditary spherocytosis *Am J Hematol*. 1992;40(2):110–116

Yu H, Lee H, Herrmann A, Buettner R, Jove R. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(11):736-46.

Zadrazil J, Horak P, Horcicka V, Zahalkova J, Strebl P, Hruby M. Endogenous erythropoietin levels and anemia in long-term renal transplant recipients. *Kidney and Blood Pressure Research* 2007;30(2):108-16.

Zhang DL, Senecal T, Ghosh MC, Ollivierre-Wilson H, Tu T, Rouault TA. Heparin regulates ferroportin expression and intracellular iron homeostasis of erythroblasts. *Blood*. 2011;118(10):2868-77.

Zhao N, Zhang AS, Enns CA. Iron regulation by hepcidin. *J Clin Invest*. 2013;123(6):2337-43.

## **Přílohy**

### **Seznam příloh:**

- Příloha 1**      **Původní práce publikovaná v časopise s IF (Haematologica, IF 5.184)**
- Příloha 2**      **Původní práce přijatá k publikaci v časopise s IF (Biomedical papers, IF 1.200)**
- Příloha 3**      **Původní práce přijatá k publikaci v recenzovaném časopise (Transfuze a hematologie dnes)**
- Příloha 4**      **Publikovaný abstrakt v zahraničním časopise s IF (Blood, IF 9.775)**

## **Příloha 1**

### Hepcidin levels in Diamond-Blackfan anemia reflect erythropoietic activity and transfusion dependency

Diamond-Blackfan anemia (DBA) is a rare congenital red cell aplasia associated with mutations in ribosomal proteins ( $\beta 2F$ ) in 49-71% of cases.<sup>1</sup> DBA is a clinically heterogeneous disorder with one-third of patients developing transfusion-acquired iron overload.<sup>2</sup> The severity of anemia and transfusion dependency in DBA is comparable to transfusion-dependent  $\beta$ -thalassaemia major. However, moderate to severe suppression of erythropoiesis in DBA<sup>2</sup> is in contrast to accelerated ineffective erythropoiesis in  $\beta$ -thalassaemia.<sup>3,4</sup> Knowledge of systemic iron regulation in DBA is limited.

In this study, we assessed selected markers of erythropoietic activity and iron metabolism including the key molecule of this process, hepcidin, in DBA patients from the Czech National DBA Registry (Table 1 and *Online Supplementary Table S1*).<sup>5</sup> The cohort was made up of 12 patients receiving regular transfusions with or without chelation therapy, 4 patients on steroids, 7 patients in remission without treatment and 2 patients treated with corticosteroids and occasional transfusions. Nine patients, mostly from the transfusion-dependent group, were concomitantly treated with leucine (*Online Supplementary Table S1*).<sup>6</sup>

In transfusion-dependent patients, reduced number of erythroblasts in the bone marrow (median 0.8%), together with markedly decreased soluble transferrin receptor

(sTfR, often under the lower limit of detection), confirmed severely suppressed erythropoiesis that corresponded to substantially elevated erythropoietin (EPO) levels (median 2452 IU/L) (Table 1). Analysis of iron parameters showed increased serum iron, transferrin saturation (TSAT) and high ferritin levels (median 1290 ng/mL) (Table 1). This suggests that erythropoiesis of these patients is not able to utilize transferrin-bound iron effectively. Liver biopsy in 5 selected transfusion-dependent patients consistently showed markedly elevated liver iron concentration (LIC) (Table 1). Moreover, massive iron stores were detected in both hepatocytes and Kupffer cells (figure 1A), distinguishing DBA from  $\beta$ -thalassaemia major with iron deposits predominantly in macrophages.<sup>4</sup> The macrophage iron loading can be attributed to non-effective erythrocyte-derived iron recycling.<sup>3,7</sup> Iron deposits in hepatocytes likely resulted from increased iron uptake by these cells. The involvement of non-transferrin-bound iron (NTBI) needs to be considered, as NTBI can be found in the plasma of patients with oversaturated transferrin and liver is the primary site for deposition of free iron from plasma.<sup>8,9</sup> Since 2009, all our transfusion-dependent patients have been monitored for potential cardiac, liver and pancreatic iron overload by magnetic resonance imaging (MRI).<sup>10</sup>

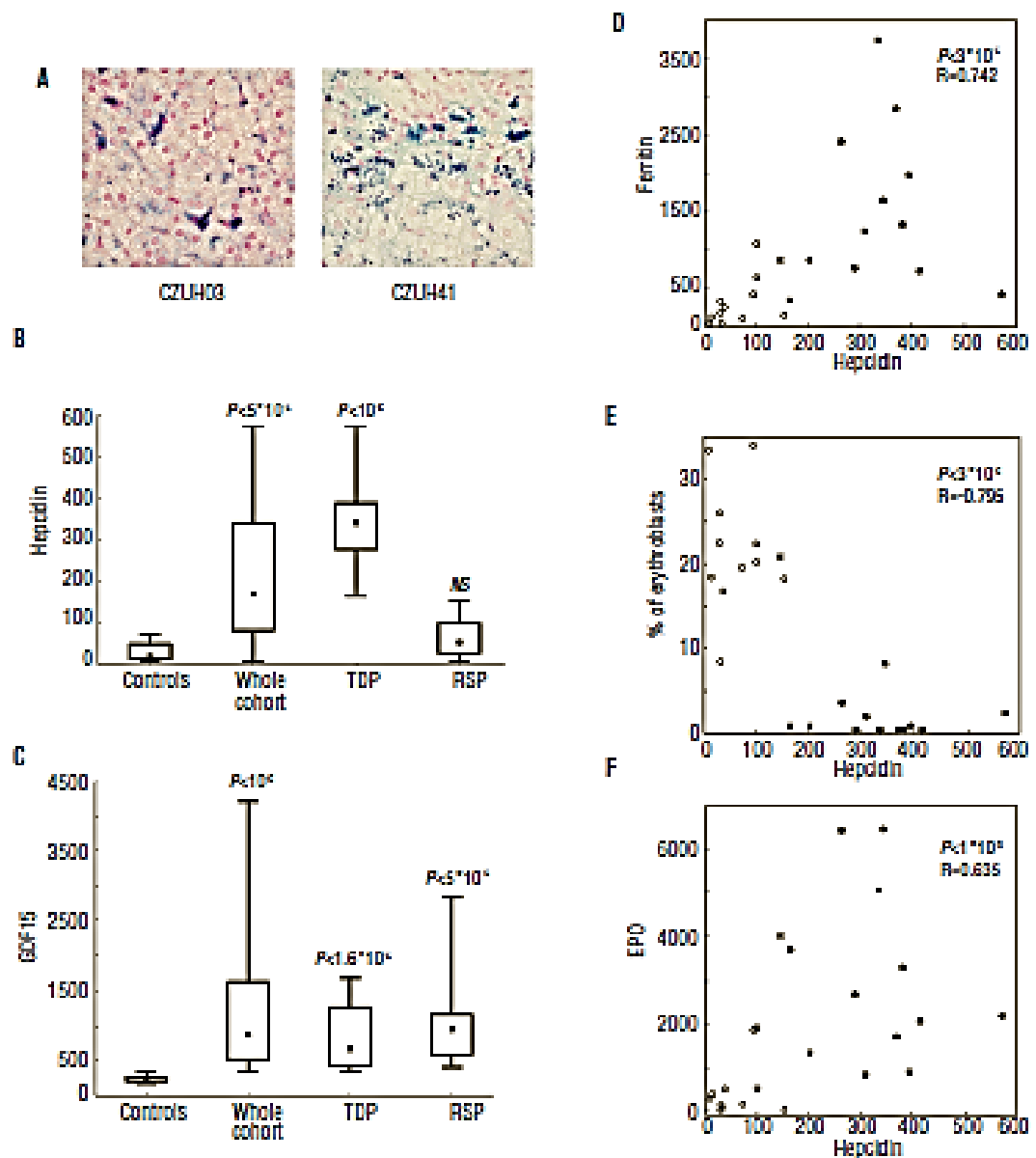
Contrary to transfusion-dependent DBA patients, patients who are currently in disease remission or on steroids showed improved erythropoiesis as documented by near normal/higher number of bone marrow erythroblasts and the levels of sTfR within the normal range (Table 1). These patients had slightly increased or even normal levels of ferritin and near normal serum iron and TSAT

Table 1. Parameters of iron status and erythropoietic activity in subgroups of Diamond-Blackfan anemia patients.

	TD <sup>a</sup> (n=12)	RP <sup>b</sup> (n=7)	SP <sup>c</sup> (n=4)	S,T <sup>d</sup> (n=2)	Reference range
Age (years)	7.6 (1.1-27.9)	35.3 (11.3-35.8)	22.6 (27.0-42.3)	25.8 25.9	-
Hepcidin (ng/mL)	341.5 (165.1-572.6)	72.1 (23.5-153.3)	24.7 (8.5-100.1)	173.9 144.9	27.6 (13.1-104.8) <sup>e</sup>
Ferritin (ng/mL)	1290 (343-3747)	177 (42-1079)	188 (44-537)	3150 863	22-275
Hepcidin/ferritin ratio	0.240 (0.09-1.35)	0.222 (0.09-1.04)	0.151 (0.10-0.13) <sup>f</sup>	0.06 0.17	0.35 (0.2-2.2) <sup>e</sup>
Fe ( $\mu$ mol/L)	41.5 (35.8-59.1)	31.1 (10.0-30.6)	21 (14.7-33.4)	39.6 43.2	7.2-25
TSAT (%)	91 (61-100)	38 (25-55)	64 (52-65)	93 94	21-48
LIC (mg/g d.w.)	7.9 (4.6-16.3)	ND	ND	ND	0.3-1.4
GDF15 (pg/mL)	676.2 (352.1-1694.8)	927.0 (564.3-2824.8)	1127.6 (408.8-2190.8)	4221.5 3497.1	223 (106-340) <sup>g</sup>
EB (%)	0.8 (0.4-1.2)	21.4 (8.4-34.1)	20.4 (16.8-33.4)	10.6 20.8	15.0-25.0
EPO (IU/L)	2452 (827-6415)	137 (20-1913)	441 (287-500)	615 4000	4.3-29.0
sTfR (ng/L)	ND <0.5-1.2	2.3 (1.3-3.2)	2.4 (1.8-3.8)	1.4 1.4	1.9-4.4 <sup>h</sup>

Values are shown as medians and the full range of variation. TD<sup>a</sup>: transfusion-dependent patients; RP<sup>b</sup>: patients in disease remission; SP<sup>c</sup>: patients treated with steroids; S,T<sup>d</sup>: patient on steroids and occasional transfusions; Fe: serum iron; TSAT: transferrin saturation; LIC: liver iron concentration; d.w.: dry weight; GDF15: growth differentiation factor 15; EB: erythroblasts in the bone marrow; EPO: serum erythropoietin; sTfR: soluble transferrin receptor; ND: not determined. Individual values are shown; numbers available for 5 patients; median could not be calculated as 3 of 12 patients had sTfR below the limit of detection (less than 0.5 ng/L). Detailed description of individual methods can be found in the *Online Supplementary Appendix*. Pre-transfusion complex were collected for TD<sup>a</sup>.





**Figure 1.** Hepatic iron distribution, hepcidin and GDF15 levels and correlation analyses. (A) Perla staining showing iron deposits in the liver of 2 transfusion-dependent DSA patients: CZUH03 at the age of 10 (LIC, 4.6 mg/g d.w.) and CZUH41 at the age of 5 (LIC 3 mg/g d.w.). Massive iron stores (blue stain) can be found in both hepatocytes and Kupfer cells. Similar pattern of iron staining was obtained for the normal transfusion-dependent DSA patients analysed (data not shown). (B) Significantly increased hepcidin levels in comparison with healthy controls were detected for the whole DSA cohort ( $n=25$ ) and transfusion-dependent DSA patients (TDP,  $n=12$ ). DSA patients in remission or treated with steroids (RSP,  $n=11$ ) had hepcidin levels comparable with the controls. (C) GDF15 levels were significantly elevated in the whole DSA cohort ( $n=25$ ), TDP ( $n=12$ ) and RSP ( $n=11$ ) when compared to healthy controls. (D-F) Hepcidin levels showed the following correlations: positive with ferritin (D), negative with the number of erythroblasts in the bone marrow (E) and positive with serum EPO (F). Closed and open circles depict TDP and RSP, respectively. Asterisk shows one patient on steroids and occasional transfusion; the other similarly treated patient (CZUH37) was excluded from statistical analyses due to concomitant occurrence of DSA and HFE C282Y homozygous mutation. The image in (A) was visualized with an Olympus IX 71 light microscope (Olympus, Hamburg, Germany) on final magnification 400 $\times$  and acquired with an Olympus DP 50 camera driven by DP controller software (provided by Olympus). Data in (B and C) are shown in a box plot depicting median (closed square), 25-75% range (box), and the highest and lowest values (the highest and the lowest whiskers, respectively). Image was assembled and labeled using Adobe Photoshop software (Adobe Systems, San Jose, CA, USA). NS: not significant.

(Table 1). This indicates that, in patients who achieved a remission state or who are hematologically stable on steroids, the improved erythropoietic activity increases iron utilization and consequently leads to amelioration of hyperferritinemia. The effect of leucine treatment on iron metabolism seems to be indirect (via improved erythropoiesis).<sup>1</sup>

Using reverse-phase liquid chromatography,<sup>2</sup> we observed significantly higher hepcidin levels for the whole DBA cohort in comparison with healthy controls (median 165.1 vs. 27.6 pg/mL;  $P < 0.00005$ ) (Figure 1B). When hepcidin was assessed in individual subgroups of DBA patients, patients on regular transfusions showed significantly elevated hepcidin (median 341.5 pg/mL), as previously shown for transfusion-dependent  $\beta$ -thalassaemia major patients.<sup>4</sup> Increased hepcidin above the median value of controls was detected even in the youngest patients aged 1.0 and 2.7 years (6-times and 20-times, respectively). This suggests that the absent or diminished erythropoiesis in the bone marrow, together with transfusions, is the driving factor for iron overload from early childhood. In contrast, DBA patients in remission or on steroids had hepcidin levels comparable to controls (medians 72.1 and 24.7 pg/mL, respectively) (Figure 1B). As erythropoiesis is known to produce a signal for hepcidin suppression,<sup>4</sup> DBA patients with restored erythropoietic activity are likely to be able to attenuate hepcidin expression and thus increase the iron pool available for improved erythropoiesis. In agreement with this concept, we detected a trend towards lower hepcidin-ferritin ratio in patients on steroids (median 0.151) or patients in remission (median 0.222) when compared to transfusion-dependent patients (median 0.240) (Table 1), although these individual values were not significantly different from the hepcidin-ferritin ratio of healthy controls (median 0.35).<sup>3</sup> Indeed, the hepcidin-ferritin ratio, which indicates suppression of hepcidin proportional to iron loading, is much higher in transfused DBA patients (range 0.09–1.35) than the hepcidin-ferritin ratio reported for transfusion-dependent  $\beta$ -thalassaemia major patients (range 0.02–0.3),<sup>4</sup> suggesting that the erythroid drive suppressing hepcidin is much stronger in  $\beta$ -thalassaemia and not completely attenuated by transfusions. On the other hand, the bone marrow of DBA patients receiving transfusions is probably not releasing the putative erythroid suppressor of hepcidin production.

In the 2 patients evaluated independently, hepcidin-ferritin ratio was more comparable with patients on steroids, reflecting their improved erythropoiesis (Table 1). Nevertheless, patient CZUH37 inherited a homozygous C282Y HFE mutation (Online Supplementary Table S2), which may contribute to inappropriately low levels of hepcidin (173.9 ng/mL) for the observed hyperferritinemia (3150 ng/mL).<sup>10</sup>

We next examined the levels of growth differentiation factor 15 (GDF15), a candidate negative regulator of hepcidin in  $\beta$ -thalassaemia and a marker of ineffective erythropoiesis.<sup>3</sup> Significantly increased levels of GDF15 were detected for the whole DBA cohort as well as for the groups receiving different treatments when compared to normal controls (Figure 1C). We suppose that elevated levels of GDF15 in DBA patients may reflect the increased apoptosis of bone marrow erythroblasts that we observed in DBA patients selected for the TUNEL assay (Online Supplementary Figure S4).<sup>3</sup>

Lastly, we assessed which of the aforementioned signals/markers contribute to the regulation of hepcidin synthesis in DBA. Hepcidin positively correlated with ferritin ( $P = 0.00003$ ) (Figure 1D), reflecting hepcidin stimulation by

the patients' iron overload. An inverse correlation between the percentage of bone marrow erythroblasts and hepcidin levels ( $P = 0.000003$ ) (Figure 1E) is consistent with negative regulation of hepcidin synthesis by erythropoietic activity. Although a negative correlation between EPO and the number of erythroblasts in the bone marrow (data not shown) confirms that EPO is stimulated in response to suppressed erythropoiesis and hypoxia, a positive correlation between hepcidin and EPO ( $P = 0.001$ ) (Figure 1F) demonstrates that hepcidin suppression by EPO requires active erythropoiesis in the bone marrow.<sup>10,11</sup> Similarly, no correlation between hepcidin or hepcidin-ferritin ratio and GDF15 indicates that GDF15 is not playing a hepcidin-regulatory role in DBA.

We conclude that DBA patients with different severities of anemia and different treatment strategies have diverse levels of hepcidin and iron overload. Hepcidin production in DBA reflects variable erythropoietic activity in the bone marrow and further contributes to the heterogeneity of this disease. It will be important to address whether some of these dissimilarities can be attributed to different types of disease-causing RP mutations.

Dagmar Pospisilova,<sup>1</sup> Dasan Holub,<sup>2</sup> Zuzana Zidova,<sup>1</sup> Lucie Sulivska,<sup>1</sup> Jiri Housa,<sup>1</sup> Vladimír Mihal,<sup>1</sup> Ivana Hladacova,<sup>4</sup> Lenka Radova,<sup>3</sup> Petr Dzubak,<sup>2</sup> Marian Hajduch,<sup>2</sup> Vladimír Divoky,<sup>1</sup> and Monika Horvathova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pediatrics, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University and University Hospital Olomouc; <sup>2</sup>Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc; <sup>3</sup>Department of Biology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University; <sup>4</sup>Department of Pediatric Hematology and Oncology, Charles University, 2<sup>nd</sup> Faculty of Medicine, Prague, and <sup>5</sup>Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Correspondence: monika.horvathova@upol.cz  
dagmar.pospisilova@fnol.cz  
doi:10.3324/haematol.2014.104034

Key words: Diamond-Blackfan anemia, hepcidin levels, erythropoietic activity, transfusion dependency.

DP, DH and ZZ contributed equally to this manuscript.

The online version of this article has a Supplementary Appendix.

Funding: this work was supported by grant No. NT141059 (Ministry of Health, Czech Republic) and partially by grants No. LF\_2013\_010 and LF\_2013\_015 (Internal Grant Agency of Palacky University). DH, PD and M Hajduch were supported by CZ.1.05/2.1.00/04.0/030 (Ministry of Education, Youth and Sports, Czech Republic). M Horvathova, LS and VD were supported by NT143587 (Ministry of Health, Czech Republic) and M Horvathova and VD partially by P303/11/1745 (Czech Science Foundation). LR was supported by 306242 NGS-PTL (the IFF grant).

Acknowledgments: we thank Zuzana Proazova, M.D. (Department of Clinical and Molecular Pathology, University Hospital Olomouc) for photomicrographs of the liver.

Information on authorship, contributions, and financial disclosures was provided by the authors and is available with the online version of this article at [www.haematologica.org](http://www.haematologica.org).

## References

- Boria I, Carelli E, Carda HT, Aspet A, Guardà F, Pavoni E, et al. The ribosomal basis of Diamond-Blackfan Anemia: mutation and database update. *Hum Mutat*. 2010;31(12):1269-79.
- Vlachos A, Ball S, Dahl N, Akar BP, Sheikh S, Ramenghi U, et al.

- Diagnosing and treating Diamond-Blackfan anemia: results of an international clinical consensus conference. *Br J Haematol.* 2008;142(6):859-76.
3. Tanno T, Noel B, Miller J. Growth differentiation factor 15 in erythroid health and disease. *Curr Opin Hematol.* 2010;17(5):184-90.
  4. Origa R, Calzavara R, Ganz T, Clugna N, Maccioni L, Foa G, et al. Liver iron concentrations and urinary hepcidin in beta-thalassemia. *Hematologica.* 2007;92(5):583-8.
  5. Mrazikova R, Kozalkova R, Hlinka D, Zidova Z, Pospisilova D, Cernak J, et al. Iron status in patients with pyruvate kinase deficiency: neonatal hyperferritinemia associated with a novel frameshift deletion in the *PFKFB3* gene (p.Arg518G) and low hepcidin in female cases. *Br J Haematol.* 2014;165(4):556-63.
  6. Pospisilova D, Cmejlova J, Ludikova B, Sary J, Cerna Z, Hak J, et al. The Czech National Diamond-Blackfan Anemia Registry: clinical data and ribosomal protein mutations update. *Blood Cells Mol Dis.* 2012;49(4):309-18.
  7. Pospisilova D, Cmejlova J, Hak J, Adam T, Cmejla R. Successful treatment of a Diamond-Blackfan anemia patient with amino acid leucine. *Hematologica.* 2007;92(5):e667.
  8. Ganz T, Nemeth E. Hepcidin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1823(5):1434-43.
  9. Herzog MW, Mucke-Haller MU, Cady B, Camaschella C. Two so large: regulation of mammalian iron metabolism. *Cell.* 2010;142(1):24-38.
  10. Emson P, Rapert M, Le Lan C, Loriai O. Non-transferrin bound iron: a key role in iron overload and iron toxicity. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1820(5):403-10.
  11. Hoffbrand AV, Taher A, Cappellini MD. How I treat transfusional iron overload. *Blood.* 2012;120(18):3657-69.
  12. Bendokas V, Nord A, Carlson S, Paltiel M, Hofstra T, Wood J, et al. Tissue iron evaluation in chronically transfused children shows significant levels of iron loading at a very young age. *Am J Hematol.* 2013;88(11):E233-5.
  13. van Dyk BA, Larabieva CM, Klaver SM, Jacobs EM, van Tits LJ, Janssen MC, et al. Serum hepcidin levels are unusually low in HFE-related haemochromatosis but differ between *C282Y*-homozygotes with elevated and normal ferritin levels. *Br J Haematol.* 2008;142(5):679-85.
  14. Vokurka M, Krta J, Sak R, Nacas E. Hepcidin mRNA levels in mouse liver respond to inhibition of erythropoiesis. *Physiol Res.* 2006;55(5):667-74.
  15. Fak M, Lopez MA, Calhoun V, Ganz T, Rivera S. Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood.* 2006;108(12):3730-5.

## **Příloha 2**

## Review of manuscript

### Conclusion: manuscript has been accepted

The Editorial Board of Biomedical papers is sending you the review of manuscript "Characterization of iron metabolism and erythropoiesis in erythrocyte membrane defects and thalassemia traits"

[To see the manuscript status «CLICK HERE».](#)

### Biomedical papers


#### Note:

Vazena autorko, posilam posudek na Vas rukopis. Veskere informace najdete v systemu, v PDF posudku. S pozdravem, J. Novakova



The banner features the journal's logo on the left, which consists of a shield containing the letters 'UP'. To the right of the logo, the text 'BIOMEDICAL PAPERS' is displayed in a large, bold, white font. Below this, in a smaller white font, is the text 'Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Republic'. At the bottom of the banner, there is a navigation bar with five buttons: 'About the Journal', 'Instruction to Authors', 'Editorial Board', 'Current Issue', and 'My Articles'. The 'My Articles' button is highlighted in yellow.

### MY ARTICLES, HISTORY

Status	Text
 ver. no. 3 Article in print	Article in print Characterization of iron metabolism and erythropoiesis in erythrocyte membrane defects and thalassemia traits

## Characterization of iron metabolism and erythropoiesis in erythrocyte membrane defects and thalassemia traits

Lucie Sulovska<sup>a\*</sup>, Dusan Holub<sup>b\*</sup>, Zuzana Zidova<sup>c</sup>, Martina Divoka<sup>d</sup>, Marian Hajduch<sup>b</sup>, Vladimir Mihal<sup>e</sup>, Jana Vrbkova<sup>b</sup>, Monika Horvathova<sup>c</sup>, Dagmar Pospisilova<sup>a</sup>

**Background and Aims.** Erythropoiesis is closely related to iron metabolism in a balanced homeostasis. Analyses of diverse erythroid and iron metabolism disorders have shown that disrupted erythropoiesis negatively affects iron homeostasis and vice versa. The aim of this study was to characterize the relationship between erythropoietic activity and iron homeostasis in pediatric patients with erythrocyte membrane defects and thalassemia traits.

**Methods.** Selected markers of erythropoietic activity (erythropoietin, soluble transferrin receptor - sTfR and growth differentiation factor 15) and iron status parameters (serum iron, ferritin and hepcidin) were evaluated in pediatric patients with erythrocyte membrane defects and thalassemia traits.

**Results.** The patients with erythrocyte membrane defects and thalassemia traits had altered iron homeostasis due to disturbed erythropoiesis. In comparison with healthy controls, they had a normal to low hepcidin/ferritin ratio and concomitantly elevated sTfR.

**Conclusion.** The findings suggest that pediatric patients with erythrocyte membrane defects and thalassemia traits are more susceptible to iron overload than the general population and that the (hepcidin/ferritin)/sTfR ratio can be used to monitor any worsening of the disease.

**Key words:** hepcidin, erythropoietic activity, erythrocyte membrane defects, thalassemia trait

Received: June 15, 2015; Accepted with revision: October 16, 2015  
<http://dx.doi.org/10.5507/bp.2015.054>

<sup>a</sup>Department of Pediatrics, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc and University Hospital Olomouc, Czech Republic

<sup>b</sup>Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc

<sup>c</sup>Department of Biology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc

<sup>d</sup>Department of Hemato-oncology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc and University Hospital Olomouc.

\*The authors contributed equally to this manuscript

Corresponding author: Monika Horvathova, e-mail: [monika.horvathova@upol.cz](mailto:monika.horvathova@upol.cz)

### INTRODUCTION

Anemia, one of the most common pathological conditions of childhood, can adversely affect development owing to inappropriate oxygen supply to developing organs and tissues. The most frequent cause is nutritional iron deficiency known as iron deficiency anemia (IDA) which results in hypochromic and microcytic red blood cells. IDA however must be distinguished from inherited microcytic anemias, especially  $\beta$ -thalassemia, which is characterized by imbalanced production of globin chains. Anemia can also be associated with excessive destruction of red blood cells (hemolysis); the most common causes of inherited hemolytic anemia in the Czech population are erythrocyte membrane defects, predominantly hereditary spherocytosis.

### Thalassemia

Thalassemias are a heterogeneous group of inherited disorders characterized by reduced or absent synthesis of one or several globin chains which are a part of the hemoglobin (Hb) molecule<sup>1</sup>. Under physiological conditions, the ratio of  $\alpha$ - and non- $\alpha$ -globin chains (i.e. predominantly  $\beta$ -globins in adults) in red blood cells is balanced (1:1). A

reduced amount of  $\alpha$ - or  $\beta$ -globin chain produced by a mutant allele is referred as  $\alpha^+$  or  $\beta^+$  thalassemia while a total absence of  $\alpha$ - or  $\beta$ -globin chain production is called  $\alpha^0$  or  $\beta^0$  thalassemia. The pathophysiology and clinical symptoms of thalassemia are related to the extent of imbalance between  $\alpha$ - and  $\beta$ -globin chain synthesis. Heterozygous carriers of a  $\beta$ -thalassemia allele are usually asymptomatic, with hypochromic and microcytic erythrocytes, mild anemia accompanied by compensatory increase in the number of red blood cells (erythrocytosis) and slightly increased erythropoiesis in bone marrow. This type of thalassemia is known as  $\beta$ -thalassemia minor or  $\beta$ -thalassemia trait and represents the most common cause of hereditary microcytic anemia in the Czech Republic. More profound imbalance in  $\alpha$ - and  $\beta$ -globin chain synthesis leads to  $\beta$ -thalassemia intermedia; patients exhibit moderate anemia with signs of hemolysis, ineffective erythropoiesis and splenomegaly. Some patients may require occasional transfusions. The incidence of  $\beta$ -thalassemia intermedia in the Czech Republic is very low. The most severe form of  $\beta$ -thalassemia is  $\beta$ -thalassemia major. Hb levels at diagnosis may be below 3.0 g/dL (normal range: 12.0 - 15.0 g/dL.) and patients require regular transfusion therapy<sup>1</sup>. To date, no cases of  $\beta$ -thalassemia major have



1 been reported in the Czech population but sporadic cases  
 2 have been diagnosed in immigrants. The clinical picture of  
 3  $\alpha$ -thalassaemia is dependent on the degree of reduction of  
 4  $\alpha$ -globin chain synthesis; i.e. on total number of mutated  
 5  $\alpha$ -globin genes. Four  $\alpha$ -globin genes are present in the  
 6 normal diploid human genome. Individuals with deletion/  
 7 inactivation of one allele are asymptomatic and consid-  
 8 ered silent carriers; the incidence in the Czech Republic  
 9 may be relatively high. Individuals who inherit two mu-  
 10 tant alleles are usually clinically asymptomatic with mild  
 11 hypochromic microcytic anemia and slightly increased  
 12 red blood cell count. This condition, called  $\alpha$ -thalassaemia  
 13 minor or  $\alpha$ -thalassaemia trait, is relatively rare in the Czech  
 14 Republic (M. Divoká, unpublished data). Hemoglobin  
 15 H disease results from mutation affecting three  $\alpha$ -globin  
 16 genes and presents with moderate to severe anemia.  
 17 Sporadic cases may be found in the Czech population.  
 18 The inactivation of all four  $\alpha$ -globin genes is lethal and  
 19 leads to hydrops fetalis and fetal death<sup>1</sup>.

#### 21 Erythrocyte membrane defects

22 Hereditary defects of erythrocyte membrane proteins  
 23 manifest as clinically and genetically heterogeneous dis-  
 24 orders. The result is large numbers of abnormally shaped  
 25 erythrocytes, i.e. spherical (for hereditary spherocytosis  
 26 - HS) or elliptical (for hereditary elliptocytosis - HE)  
 27 rather than the normal biconcave disk shape<sup>2</sup>. These ab-  
 28 normal erythrocytes have a shorter than average life-span  
 29 for normal red blood cells and die prematurely. This leads  
 30 to a compensatory increase in reticulocyte count which  
 31 is more pronounced in HS than HE. The patient may be  
 32 asymptomatic or present with varying degree of hemo-  
 33 lytic anemia, increased serum bilirubin and splenomegaly.  
 34 Transfusion therapy for the most severe cases of HS and  
 35 HE may lead to iron overload which can cause severe  
 36 health problems<sup>3</sup>.

#### 38 Hepcidin and iron metabolism

39 Erythropoiesis and iron metabolism reciprocate in the  
 40 coordinated supply of iron and globin synthesis, essential  
 41 for normal red blood cell production. Analyses of diverse  
 42 erythroid and iron metabolism disorders have shown that  
 43 disrupted erythropoiesis negatively affects iron homeosta-  
 44 sis and vice versa.

45 Iron (Fe) is vital for a number of metabolic processes,  
 46 most importantly, oxygen transport as a part of the Hb  
 47 molecule. However, because of its potential toxicity, iron  
 48 levels must be strictly regulated. Hepcidin, the key mol-  
 49 ecule regulating plasma iron levels, is produced by hepa-  
 50 tocytes<sup>4</sup>. Hepcidin binds to an iron exporter, ferroportin  
 51 expressed in the cytoplasmic membrane. This induces  
 52 ferroportin internalization and degradation, resulting in  
 53 blocking iron release from sites of iron absorption (duo-  
 54 dal enterocytes), iron recycling (macrophages) and iron  
 55 storage (hepatocytes). Hepcidin synthesis is stimulated in  
 56 response to increased iron stores and inflammation. It is  
 57 attenuated in response to iron deficiency and accelerated  
 58 erythropoiesis due to anemia, ineffective erythropoiesis  
 59 and hypoxia<sup>5</sup>. The molecules that induce hepcidin syn-  
 60 thesis in response to increased iron levels and inflamma-

tion are relatively well-defined<sup>6,7</sup>. On the other hand, the  
 identity of negative regulators of hepcidin is still elusive.  
 Growth differentiation factor 15 (GDF15) was proposed  
 as a candidate molecule in the suppression of hepcidin  
 production in patients with  $\beta$ -thalassaemia<sup>8</sup>. Later analyses  
 showed that GDF15 was elevated in disease states associ-  
 ated with ineffective erythropoiesis<sup>9</sup>. More recent data  
 indicate the existence of other negative erythroid regula-  
 tors of hepcidin synthesis<sup>8</sup>. It is accepted that these signals  
 are released by erythroid precursors in bone marrow<sup>8</sup> and  
 override the signals of iron stores<sup>5</sup>.

Imbalances in iron metabolism (including hepcidin  
 levels) and their interconnection with defective erythro-  
 poiesis have been widely studied in  $\beta$ -thalassaemia (inter-  
 media and major) (ref.<sup>10</sup>), congenital dyserythropoietic  
 anemia<sup>11</sup>, pyruvate kinase deficiency<sup>12</sup> and Diamond-  
 Blackfan anemia<sup>13</sup>. In this study, we investigated the re-  
 lationship between iron metabolism and erythropoietic  
 activity in pediatric patients with erythrocyte membrane  
 defects and thalassaemia traits.

## 83 MATERIALS AND METHODS

### 85 Characterization of the cohort

86 The cohort consisted of 20 patients with erythro-  
 cyte membrane defect (18 with HS and 2 with HE) (age  
 87 range 2-18 years), 13 with thalassaemia minor: 10 with  
 88 the  $\beta$ -thalassaemia trait and 3 with the  $\alpha$ -thalassaemia trait  
 89 (age range 3-17 years) and 1 patient with thalassaemia  
 90 major (TM) (age 7 years), an immigrant from Moldova.  
 91 Thalassaemia carriers did not require any treatment. The  
 92 patient with TM was on regular transfusion therapy (1  
 93 transfusion unit every three weeks). A control group  
 94 included 47 children examined prior to planned minor  
 95 surgery (inguinal or umbilical hernia, plastic surgery).  
 96 The study and informed consent as per the Declaration  
 97 of Helsinki were approved by the Ethics Committee of  
 98 Palacky University Hospital, Olomouc, Czech Republic.  
 99 None of the subjects had signs of an inflammatory pro-  
 100 cess at the time of examination as documented by normal  
 101 C-reactive protein (CRP) levels (not shown).  
 102

### 104 Hematological and biochemical analysis

105 Blood was taken during routinely performed venous  
 106 puncture; for the TM patient a pre-transfusion sample was  
 107 collected. Blood counts and erythrocyte characteristics  
 108 were examined on Sysmex XE-500 analyzer (Sysmex) for  
 109 all subjects included in the study. Biochemical serum pa-  
 110 rameters of iron metabolism and inflammation: serum  
 111 iron (Fe), ferritin, transferrin saturation (TSAT), soluble  
 112 transferrin receptor (sTfR) and CRP levels were deter-  
 113 mined using standard methods; for the control group,  
 114 samples from 10 to 13 children were analyzed. The se-  
 115 rum erythropoietin (EPO) concentration was measured  
 116 by a solid-phase chemiluminescent immunochemical re-  
 117 action<sup>14</sup>. Laboratory reference values are given for EPO  
 118 instead of direct control group measurements.

119 The diagnosis of HS and HE was made on the basis of  
 120 elevated bilirubin levels (mean 29  $\mu$ mol/L, patients range

1 8–70  $\mu\text{mol/L}$ , normal range 5–21  $\mu\text{mol/L}$ ), positive re-  
 2 sults of cryohemolysis test and blood smear assessment.  
 3 Thalassemias were diagnosed on the basis of hemoglobin  
 4 electrophoresis and globin gene Sanger sequencing<sup>15</sup>.

#### 6 Hepcidin analysis

7 The serum hepcidin levels were measured by reverse-  
 8 phase liquid chromatography using the UltiMate 3000  
 9 Nano LC System (Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale,  
 10 CA, USA) coupled to the QTRAP 5500 mass spectrom-  
 11 eter (AB SCIEX, Framingham, MA, USA) as we previ-  
 12 ously described<sup>12</sup>. Hepcidin was determined for 47 healthy  
 13 controls, 12 thalassemia carriers and 20 patients with  
 14 erythrocyte membrane defect.

#### 16 GDF15 measurements

17 The serum levels of growth differentiation factor 15  
 18 (GDF15) were quantified according to the manufacturer's  
 19 instructions using the Human GDF15 Quantikine ELISA  
 20 Kit (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA). GDF15  
 21 measurements were performed on 9 thalassemia carriers  
 22 and 11 patients with erythrocyte membrane defect.

#### Statistical analysis

ANOVA and Dunnett's test for normally distributed  
 variables or non-parametric Kruskal-Wallis test with mul-  
 tiple comparisons were used for the statistical evaluation.  
 All statistical analyses were done using the STATISTICA,  
 (StatSoft, Inc., software version 12). The significance level  
 was set at 5% for all analyses.

## RESULTS

### Hematological data and erythropoietic activity

We first analyzed the hematological data. Carriers of  
 $\alpha$ -thalassemia were evaluated together with  $\beta$ -thalassemia  
 carriers due to similarities in clinical picture. They showed  
 mild to severe anemia with a compensatory increase in  
 RBC counts (Table 1). Hemoglobin (Hb), mean corpus-  
 cular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin  
 (MCH) and mean corpuscular hemoglobin concentration  
 (MCHC) were significantly lower compared to healthy  
 controls. In the erythrocyte membrane defect group, the  
 anemia was milder, with significantly reduced RBC count

Table 1. Hematological parameters.

	Controls	Thalassemia carriers	Erythrocyte membrane defects	Thalassemia major
RBC ( $10^{12}/\text{L}$ )	4.78 $\pm$ 0.60	5.55** $\pm$ 0.315	4.23* $\pm$ 0.71	2.97
Hb (g/dL)	13.0 $\pm$ 1.3	10.6*** $\pm$ 1.1	12.0 $\pm$ 1.9	8.2
MCV (fL)	82.56 $\pm$ 6.87	59.1*** $\pm$ 5.68	79.1 $\pm$ 5.73	79.8
MCH (pg)	28.29 $\pm$ 2.62	19.23*** $\pm$ 2.27	28.45 $\pm$ 1.86	27.6
MCHC (g/dL)	34.32 $\pm$ 1.22	32.46* $\pm$ 1.21	36.09** $\pm$ 0.87	34.6
Ret (ratio)	0.010 $\pm$ 0.003	0.012 $\pm$ 0.004	0.066*** $\pm$ 0.045	0.012

Values are shown as means  $\pm$  SD; single values are given for the patient with thalassemia major. RBC, red blood cells count; Hb, hemoglobin; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration, Ret, reticulocytes count. Statistical significance relative to control group: \*Pvalue<0.05; \*\*Pvalue<0.01; \*\*\*Pvalue<0.001.

Table 2. Parameters of erythropoietic activity.

	Controls	Thalassemia carriers	Erythrocyte membrane defects	Thalassemia major
sTfR (mg/L)	3.7 $\pm$ 0.74	6.89 $\pm$ 5.02	9.58** $\pm$ 4.89	19
EPO (IU/L)	[4.3-29]	18.0 $\pm$ 22.67	34.04 $\pm$ 30.45	> 4000
GDF 15 (pg/mL)	205 $\pm$ 27	653** $\pm$ 545	387 $\pm$ 131	8316.7

Values are shown as means  $\pm$  SD; single values are given for the patient with thalassemia major. sTfR, soluble transferrin receptor; EPO, erythropoietin; GDF 15, growth differentiation factor 15; - reference range. Statistical significance relative to control group: \*\*Pvalue<0.01.

Table 3. Iron status parameters.

	Controls	Thalassemia carriers	Erythrocyte membrane defects	Thalassemia major
%TSAT	33.07 $\pm$ 14.09	30.9 $\pm$ 10.86	29.05 $\pm$ 10.22	59.9
Serum Fe ( $\mu\text{M/L}$ )	20.87 $\pm$ 8.37	16.75 $\pm$ 5.57	15.04 $\pm$ 4.57	22
Ferritin ( $\mu\text{g/L}$ )	34.62 $\pm$ 20.1	40.23 $\pm$ 39.15	99.54** $\pm$ 45.52	2872
Hepcidin (ng/mL)	25.86 $\pm$ 26.46	14.73 $\pm$ 14.27	15.34 $\pm$ 16.56	56.2
Hepcidin/ferritin	0.658 $\pm$ 0.564	0.341 $\pm$ 0.149	0.177* $\pm$ 0.173	0.02
(hepcidin/ferritin)/sTfR	0.184 $\pm$ 0.189	0.072 $\pm$ 0.050	0.023*** $\pm$ 0.021	0.001

Values are shown as means  $\pm$  SD; single values are given for the patient with thalassemia major. TSAT, transferrin saturation; Fe, iron; sTfR, soluble transferrin receptor. Statistical significance relative to control group: \*\*Pvalue<0.01, \*\*\*Pvalue<0.001.



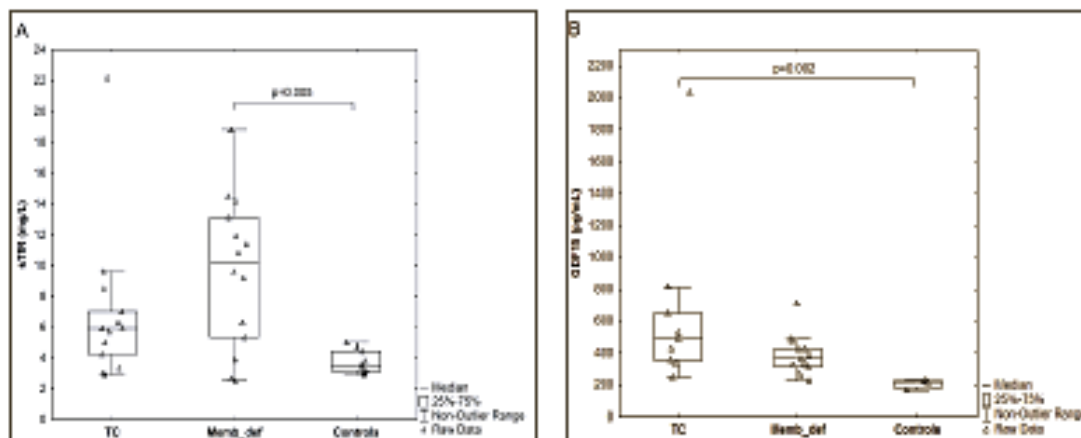


Fig. 1. Elevated markers of erythropoietic activity. (A) sTfR was increased in both patients' groups when compared to the controls ( $n=9$ ), but only in patients with erythrocyte membrane defect (Memb\_def;  $n=14$ ) the difference reached statistical significance; thalassemia carriers (TC,  $n=13$ ). (B) The elevation of GDF15 in comparison to the controls was significant for TC ( $n=9$ ), but not for Memb\_def ( $n=11$ ). sTfR, soluble transferrin receptor; GDF15, growth differentiation factor 15. The graphs show individual values (triangles), 25-75% range with median (box and horizontal line, respectively) and the non-outlier range (the highest and the lowest whiskers, respectively).

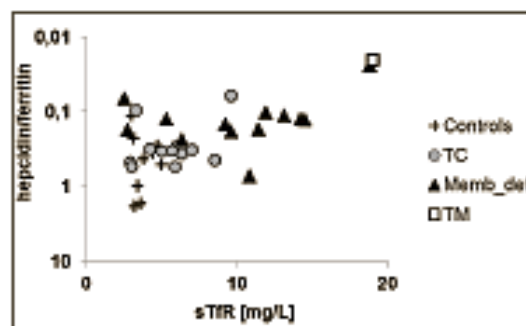


Fig. 2. Differentiation of patients based on the plot of hepcidin/ferritin ratio against sTfR<sup>11</sup>. Patients with erythrocyte membrane defect (Memb\_def,  $n=13$ ), thalassemia carriers (TC,  $n=12$ ) and thalassemia major (TM,  $n=1$ ) dislocate from healthy controls ( $n=9$ ).

and moderate changes in RBC characteristics (Table 1) with the exception of MCHC, which was significantly increased. In addition, compensatory reticulocytosis in response to chronic hemolysis was observed in the majority of patients with erythrocyte membrane defect causing the number of reticulocytes to be significantly different from the control group (Table 1).

We next examined the markers of erythropoietic activity, i.e. serum erythropoietin (EPO) and soluble transferrin receptor (sTfR). EPO was elevated above the reference range (4.3 - 29 IU/L) only in the group of erythrocyte membrane defects (mean 34 IU/L, Table 2); in thalassemia carriers the mean value fell within the reference range (mean 18.0 IU/L, Table 2). sTfR was also significantly higher for patients with erythrocyte membrane defect (mean 9.58 mg/L) than in healthy controls (3.7 mg/L, Table 2 and Fig. 1A). In the thalassemia carri-

ers' group mean sTfR (6.89 mg/L) was 1.9 times higher than mean sTfR of the controls (Table 2 and Fig. 1A). Although the difference was not statistically significant, 10 out of 13 thalassemia carriers had sTfR above the mean control value (Fig. 1A). This indicates increased erythropoietic activity in the bone marrow of thalassemia carriers and patients with erythrocyte membrane defect. To assess the degree of ineffective erythropoiesis<sup>14,17</sup>, serum growth differentiation factor 15 (GDF15) was measured using ELISA. The mean GDF15 level was increased in both groups (thalassemia carriers, 653 pg/mL; erythrocyte membrane defects, 387 pg/mL) compared to the controls (205 pg/mL), but only in thalassemia carriers did the difference reach statistical significance (Table 2 and Fig. 1B).

Our only patient with thalassemia major (TM), who is a Moldovan immigrant living in the Czech Republic,

presented with the most severe anemia (Hb of 8.2 g/dL), reduced RBC number, elevated sTfR and EPO levels and the highest GDF15 (Table 1 and 2).

#### Iron status and hepcidin

To assess any disturbance in iron homeostasis, selected parameters of iron metabolism were evaluated. As shown in Table 3, serum iron (sFe) and transferrin saturation (TSAT) were comparable in all groups. Patients with erythrocyte membrane defect had significantly increased levels of serum ferritin (mean 99.54 µg/L; mean for controls, 34.62 µg/L). Ferritin levels of thalassemia carriers did not differ from healthy controls (Table 3). Hepcidin levels were reduced in thalassemia carriers (mean 14.73 ng/mL) and erythrocyte membrane defects (mean 15.34 ng/mL) compared to controls (mean 25.86 ng/mL, Table 3), but this was not statistically significant. We therefore calculated the hepcidin/ferritin ratio which represents a measure of appropriate response of hepcidin to iron stores. As shown in Table 3, this ratio was significantly lower in the erythrocyte membrane defects group (0.177) compared to healthy individuals (0.658). The reduction of hepcidin/ferritin ratio in thalassemia carriers (to 0.341) reached only borderline statistical significance; even though it was twice as low as in the controls. This indicates inappropriate suppression of hepcidin synthesis.

Along with the changes in hematological parameters, alterations in iron status in our TM patient was consistent with the data published on large cohorts of TM patients<sup>31,32</sup>. She showed normal sFe, but significant hyperferritinemia (ferritin level of 2872 µg/L, Table 3). Her serum hepcidin was twice as high (56.2 ng/mL) as in healthy controls (25.86 ng/mL). However, the hepcidin/ferritin ratio, which was 0.02 (control hepcidin/ferritin ratio is 0.658) indicated that hepcidin was disproportionately low with respect to iron loading (Table 3).

Finally, we calculated the ratio of (hepcidin/ferritin) to sTfR which combines the parameters of iron status and erythropoietic activity. Recently, it has been suggested that this formula distinguishes adult thalassemia carriers from healthy controls and reflects the severity of the anemia<sup>20</sup>. As shown in Table 3, this ratio is reduced in both thalassemia carrier group (0.072) and erythrocyte membrane defects (0.023) compared to healthy individuals (0.184) confirming disordered interaction between iron metabolism and erythropoiesis. When sTfR is plotted against the hepcidin/ferritin ratio, thalassemia carriers and patients with erythrocyte membrane defect, tend to diverge from controls (Fig. 2); showing slight to moderate reduction in hepcidin/ferritin ratio and concomitant increase in sTfR that is consistent with accelerated bone marrow erythropoiesis. The TM patient had the lowest (hepcidin/ferritin)/sTfR ratio (0.001) and can be found in the upper right corner on the graph plotting sTfR against hepcidin/ferritin with the lowest hepcidin/ferritin and highest sTfR (Fig. 2). This result confirms increased bone marrow erythropoiesis and inadequate suppression of hepcidin to the degree of iron loading.

## DISCUSSION

A number of congenital anemias are coupled with disrupted iron balance and secondary iron overload. The molecular pathophysiology involves suppression of hepcidin; the key molecule inhibiting iron absorption and recycling<sup>21</sup>. An important finding is that erythroid signals dominate over iron store signals<sup>3</sup>. As a result, patients with ineffective erythropoiesis and concomitantly increased iron levels have inappropriately low hepcidin with respect to iron loading which leads to the accumulation of excessive iron in parenchymal tissues. These relatively suppressed hepcidin levels, explain iron overload in patients with  $\beta$ -thalassemia intermedia that are transfusion independent<sup>16</sup>. On the other hand, the primary cause of iron overload in  $\beta$ -thalassemia major is regular transfusion therapy; hepcidin is higher than in  $\beta$ -thalassemia intermedia due to the suppressive effect of transfusions on ineffective erythropoiesis<sup>15</sup>. Recently, it was shown that carriers of  $\beta$ - or  $\alpha$ -thalassemia allele too, have altered iron metabolism parameters and erythropoiesis despite the absence of clinical symptoms<sup>20,22</sup>.

In this study, we analyzed for the first time, whether and how disrupted erythropoiesis in erythrocyte membrane defects, namely HS and HE, influences iron metabolism. The anemia in these patients was hyperchromic and milder than for thalassemia carriers. Due to chronic hemolysis it was accompanied by increased reticulocyte count. However, serum EPO was higher than in thalassemia carriers and together with significantly elevated sTfR, reflected increased erythropoietic activity in the bone marrow. In addition, slightly increased levels of GDF15 indicated some degree of ineffective erythropoiesis<sup>7</sup>.

The evaluation of parameters of iron metabolism revealed normal serum Fe, but significantly elevated ferritin levels. As in thalassemia carriers, hepcidin and hepcidin/ferritin ratio were reduced 1.7 and 3.7 times, respectively, compared to the controls. The patients with erythrocyte membrane defects also had a significantly lower (hepcidin/ferritin)/sTfR index than controls and dislocated from them on the graph when sTfR was plotted against hepcidin/ferritin. The erythrocyte membrane defects were shifted more to the top right on the graph than thalassemia carriers indicating more pronounced disruption in the erythropoiesis-hepcidin-iron stores axis. These results also suggest that hepcidin synthesis is inappropriately attenuated in patients with HS and HE. The direct signals need to be identified because hepcidin inhibition by EPO is indirect and requires active bone marrow erythropoiesis<sup>11,21,24</sup> and GDF15 is considered a marker of ineffective erythropoiesis rather than the main suppressor of hepcidin<sup>17</sup>. Very promising is the description of an erythroid regulator, named erythroferone which stimulates hepcidin synthesis in response to chronic bleeding and EPO administration<sup>8</sup>. The human assay for erythroferone measurements which would enable us to determine its levels under physiological and different pathological conditions, including erythrocyte membrane defects, is currently under development.

We also showed that pediatric thalassemia carriers have altered RBC parameters; raised RBC count and reduced Hb level, MCV, MCH and MCHC. Elevated sTfR and GDF15 indicate increased but ineffective erythropoiesis in the bone marrow. Similar data were recently published for schoolchildren with  $\beta$ -thalassemia trait from Sri Lanka<sup>22</sup> and also for adult thalassemia carriers<sup>20</sup>. However, the study on adult thalassemia carriers showed that the  $\beta$ -thalassemia trait is associated with more profound negative effects on erythropoiesis than the  $\alpha$ -thalassemia trait<sup>20</sup>. We were unable to make such a comparison because of only three  $\alpha$ -thalassemia carriers included in our cohort. Although their parameters were comparable with  $\beta$ -thalassemia carriers, it will be important to analyze larger numbers of children with  $\alpha$ -thalassemia trait to draw final conclusions. Alternatively, the clinical and laboratory difference between  $\alpha$ - and  $\beta$ -thalassemia carriers may become more obvious over time. It is also likely that the difference reflects the heterogeneity at the molecular level; mutant alleles causing more profound imbalance in globin production would be associated with more severe alteration in erythropoiesis.

In the thalassemia carrier group, all individuals were iron replete with sFe and ferritin indistinguishable from healthy controls. However, they showed reduced hepcidin levels and reduced hepcidin/ferritin ratio (both parameters approximately twice). These results are consistent with the data obtained on pediatric  $\beta$ -thalassemia carriers from Sri Lanka<sup>22</sup>. On the other hand, Guimaraes et al.<sup>20</sup> found that only adult  $\alpha$ -thalassemia carriers had significantly decreased hepcidin, while hepcidin of adult  $\beta$ -thalassemia carriers was insignificantly higher than in controls. Again, we cannot draw any conclusions due to the minimal number of  $\alpha$ -thalassemia carriers we analyzed. The differences between  $\beta$ -thalassemia carriers may again reflect differences between pediatric age and adulthood or may eventually be also influenced by variable severity of the different  $\beta$ -thalassemia alleles. Nevertheless, when the hepcidin/ferritin ratio was plotted against sTfR, our thalassemia carriers dislocate from the control group like the  $\alpha$ - and  $\beta$ -thalassemia carriers in Guimaraes's study<sup>20</sup>. This result is consistent with the altered erythropoiesis and iron homeostasis in the thalassemia trait.

The clinical picture of anemia and the hematological and biochemical laboratory findings of our patient with TM were in agreement with the published data on TM subjects, including inappropriate suppression of hepcidin with respect to the degree of iron overload<sup>18</sup>. The low hepcidin/ferritin ratio and elevated sTfR and GDF15 reflect increased ineffective erythropoiesis which signals higher iron demand leading to increased iron absorption and recycling. This is consistent with the finding that iron overload in TM is a result of regular transfusion therapy and disturbed hepcidin synthesis<sup>18</sup>.

## CONCLUSIONS

Pediatric patients with erythrocyte membrane defect and thalassemia carriers showed alterations in erythro-

poiesis and iron metabolism. The regulation of iron homeostasis appeared to be more disbalanced in erythrocyte membrane defects than in thalassemia carriers, but to a lesser extent than in the TM subject. We propose that the degree of alteration may reflect the severity of disease-causing mutation. We confirmed the results of Guimaraes et al.<sup>20</sup>, that the (hepcidin/ferritin)/sTfR ratio distinguishes thalassemia carriers from healthy controls and showed that it also differentiates patients with erythrocyte membrane defect. We propose that these individuals may be more susceptible to iron overload than the general population. As suggested for thalassemia carriers<sup>20</sup>, the (hepcidin/ferritin)/sTfR ratio can be used to follow up patients with erythrocyte membrane defects for evolution of the disease with a focus on alterations in erythropoietic activity and potential risk of iron overload. This ratio may also eventually help to make treatment choices including timing of splenectomy in patients with erythrocyte membrane defect and excessive hemolysis.

## ACKNOWLEDGEMENT

The work was supported by the Ministry of Health Czech Republic, grant num.: NT13587, MH and DP were supported by Czech Science Foundation, grant num.: 15-13732S; MH and ZZ were supported by the Internal Grant of Palacky University, grant num.: LF\_2015\_015.

Author contributions: LS: data collection and analysis, contributed to GDF15 measurements, manuscript writing; DH: measured the levels of hepcidin; ZZ: determined GDF15 levels; MD performed Hb electrophoresis, Sanger sequencing and cryohemolysis tests; MH: responsibility for the hepcidin assay; VM: collected the patients' material and provided clinical information; JW: performed statistical analyses; MH, DP: study design, results interpretation; All authors contributed to the editing of the manuscript.

Conflict of interest statement: None declared.

## REFERENCES

- Weatherall DJ. Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. *Nat Rev Genet* 2001;2(4):245-55.
- Fiel FB, Weatherall DJ. The  $\alpha$ -thalassaemias. *N Engl J Med* 2014;371(20):1908-16.
- An X, Mohandas N. Disorders of red cell membrane. *Br J Haematol* 2008;141(3):367-75.
- Ganz T. Hepcidin in iron metabolism. *Curr Opin Hematol* 2004;11:251-4.
- Ganz T and Nemeth E. Hepcidin and disorders of iron metabolism. *Annu Rev Med* 2011;62:347-60.
- Tanno T, Bhanu NV, Ornel FA, Goh SH, Staker P, Lee YT, Moroney JW, Reed CH, Luban NL, Wang RH, Elling TE, Childs R, Ganz T, Leitman SF, Fucharoen S, Miller JL. High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat Med* 2007;13(9):1096-101.
- Tanno T, Miller JL. Iron loading and overloading due to ineffective erythropoiesis. *Adv Hematol* 2010;2010:358283.
- Kautz L, Jung G, Valore EV, Rivella S, Nemeth E, Ganz T. Identification of erythropoietin as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nat Genet* 2014;46(7):678-84.

## **Příloha 3**



# TRANSFUZE A HEMATOLOGIE *dnes*



Titl|

MUDr. Lucie Sulovská

Dětská klinika, FN a LF Univerzity Palackého v Olomouci

I. P. Pavlova 6, Olomouc

---

dne: 19. 10. 2015

Vážená kolegyně,

dovolujeme si Vás informovat, že Váš rukopis s titulem „**Metabolismus železa u dárců krve**“ byl na základě výsledků recenzního řízení dne 19. 10. 2015 přijat redakcí časopisu *Transfuze a hematologie dnes* a bude publikován v čísle **4/2015**. Gratulujeme.

Prosíme, abyste ve svých dalších publikacích tuto práci citovala.

Děkujeme, těšíme se na další spolupráci, přejeme Vám další neméně kvalitní publikace a doufáme, že i v budoucnu budete při rozhodování o místě prezentace Vašich rukopisů myslet na náš časopis.

S pozdravem

za redakci časopisu *Transfuze a hematologie dnes*

MUDr. Jiří Masopust

vedoucí redaktor

## **Metabolismus železa u dárců krve**

*Sulovská L<sup>1</sup>, Holub D<sup>2</sup>, Galuszková D<sup>3</sup>, Sulovská I<sup>3</sup>, Hajdúch M<sup>2</sup>, Horváthová M<sup>4</sup>,  
Pospíšilová D<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Dětská klinika, Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci

<sup>2</sup> Ústav molekulární a translační medicíny, Olomouc

<sup>3</sup> Transfuzní oddělení, Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty Univerzity Palackého  
v Olomouci

<sup>4</sup> Ústav biologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci



## **Souhrn**

**Úvod:** Metabolismu železa je velmi úzce spjat s erythropoetickou aktivitou kostní dřeně. Dárcovství krve zasahuje do homeostázy železa a může vést k vyčerpání zásob železa dárce. Cílem práce je zhodnotit vybrané parametry metabolismu železa a jejich význam při prevenci rozvoje deficitu železa u dárců krve.

**Metody:** U dárců krve, kteří vyhověli kritériím pro darování krve dle platných Doporučených postupů Transfuzní společnosti, byl vyšetřen krevní obraz, hladina plazmatického železa a feritinu. Celkem bylo vyšetřeno 117 dárců krve (64 mužů a 53 žen), kteří byli způsobilí k darování krve. Hladina hepcidinu byla stanovena proteomickou analýzou založenou na reverzní kapalinové chromatografii spřažené s hmotnostní spektrometrií (LC-MS).

**Výsledky:** Muži měli signifikantně vyšší počet erytrocytů, hladinu hemoglobinu, hematokritu a feritinu než ženy. Hladina feritinu pozitivně korelovala s hladinou hepcidinu u obou pohlaví. Šest mužů (9.52%) a devět žen (17.64%) mělo hladinu feritinu pod 12 ng/ml. Výrazně sníženou hladinu hepcidinu (pod 2.5 ng/ml) jsme zaznamenali u 18 mužů (28%) a 5 žen (9.8%).

**Závěr:** Hladina hepcidinu lépe odráží skutečnou spotřebu železa funkční erythropoézou, a proto je vyšetření hepcidinu vhodným markerem ke zhodnocení stavu metabolismu železa u dárců krve.

Klíčová slova: hepcidin, metabolismus železa, dárcovství krve, deficit železa

## **Summary**

**Introduction:** Iron metabolism is closely related to bone marrow erythropoietic activity. Blood donation alters iron homeostasis and may lead to depletion of donors' iron stores. The aim of this study is to evaluate selected parameters of iron metabolism and their role in the prevention of iron deficiency in blood donors.

**Material and methods:** Blood count, serum iron level, ferritin and hepcidin level were evaluated in blood donors who meet the criteria for blood donation in accordance with Recommendation of Society for Transfusion Medicine. A group of 117 blood donors (64 men and 53 women) who were eligible to donate blood were examined. The level of hepcidin was determined by proteomic analysis based on reverse liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS).

**Results:** Men had significantly higher erythrocyte count, hemoglobin, hematocrit and ferritin than women. Ferritin level positively correlated with the level of hepcidin in both men and women. Six men (9.52%) and nine women (17.64%) had serum ferritin below 12 ng/ml. Markedly reduced levels of hepcidin (below 2.5 ng/ml) were detected in 18 men (28%) and 5 women (9.8%).

**Conclusion:** Hepcidin better reflects iron required for erythropoiesis and can be used as a marker for monitoring of iron status in blood donors.

Key words: hepcidin, iron metabolism, blood donation, iron deficiency



## Úvod

Železo (Fe) patří mezi nejdůležitější biogenní prvky ve všech živých organismech. Na buněčné úrovni se Fe účastní řady enzymatických reakcí (je kofaktorem peroxidáz, hydroxyláz, oxidáz či ribonukleotidreduktázy), které jsou nezbytné pro přežití buněk a pro jejich dělení. Nedostatek Fe může vést k zástavě růstu buňky i k buněčné smrti. Za fyziologických podmínek je hladina Fe udržována v úzkém rozmezí, protože jak nedostatek, tak jeho akumulace v organismu může mít závažné negativní důsledky pro buněčné pochody.

Největší množství Fe v lidském organismu je obsaženo v molekule hemoglobinu (60-70% celkového Fe) a myoglobinu (5%), kde má nezastupitelnou úlohu při vazbě, přenosu a uvolňování kyslíku k zajištění dostatečné oxygenace tkání. Dalších 25% Fe je uloženo v zásobních proteinech feritinu a hemosiderinu, odkud je v případě potřeby uvolněno a využito. Pouze 1% Fe cirkuluje v plazmě vázané na molekulu transferinu a po navázání na transferinové receptory (TfR) v buněčné membráně je Fe přijato buňkami k utilizaci. Přibližně 3,5% celkového Fe je vázáno na metaloproteiny a enzymy (cytochrom P450, katalázy, peroxidázy), které jsou nezbytné pro přežití buněk. [1]

Denní potřeba Fe u člověka je přibližně 25 mg Fe, převážná část je využita v kostní dřeni při erythropoéze. Denně je enterocyty v duodenu vstřebáno 1 - 2 mg Fe, toto množství může být zvýšeno na 3 – 4 mg, pokud to aktuální situace vyžaduje (např. po akutním krvácení).

### ***Metabolismus a regulace homeostázy železa***

Metabolismus Fe je řízený jak na buněčné úrovni, tak na úrovni systémové. Na úrovni organismu se uplatňuje účinek hormonu hepcidinu (hepatic antimicrobial peptide, LEAP-1, liver expressed antimicrobial protein 1), který je klíčovou regulační molekulou metabolismu Fe. Cílovým receptorem pro hepcidin je ferroportin, jediný dosud popsáný transmembránový přenašeč Fe iontů z intracelulárního prostoru do plazmy. Po vazbě hepcidinu na FPN dochází k endocytóze a degradaci komplexu hepcidin-FPN. Fe je tedy zadrženo intracelulárně a nemůže být dále využito. Tento mechanismus je uplatňován na bazolaterální membráně enterocytů v duodenu, v intracytoplazmatických inkluzích a na plazmatické membráně makrofágů v játrech, slezině a kostní dřeni, v hepatocytech a ovlivňuje tak příjem železa ze stravy a jeho uvolňování ze zásob, což jsou klíčové procesy pro udržování homeostázy Fe v organismu. FPN v buňkách syncytiotrofoblastu je esenciální pro materno-fetální přestup Fe přes placentu.

Většina ostatních buněk exprimuje pouze malé množství FPN pro regulaci vlastního buněčného metabolismus Fe [2]. Syntéza hepcidinu je ovlivněna hladinou sérového Fe a jeho zásobami v organismu, zánětem, erythropoetickou aktivitou a hypoxií [3].

### ***Nedostatek železa u dárců krve***

Dárcovství krve je vždy spojeno se ztrátou určitého množství Fe z organismu a dárci krve jsou tedy ohroženi rozvojem deficitu zásob Fe a sideropenické anémie. Při odběru jedné jednotky plné krve o objemu 450 ml dochází ke ztrátě 200 – 250 mg Fe [4]. Toto množství představuje 5-10% celkové zásoby Fe v těle. Longitudinální multicentrická studie REDS-II Donor iron status evaluation (RISE) zjišťovala prevalenci deficitu zásobního Fe (ferritin < 12 ng/ml) a latentní sideropenie (definované poměrem log solubilního TfR/ferritinu  $\leq 2.07$ ) u dárců krve, kteří splňovali kritéria pro darování krve; hladina hemoglobinu u mužů i u žen byla vyšší než 125 g/l. Deficit zásobního Fe byl prokázán u 47% opakovaných dárců - mužů a latentní sideropenie u 18%. U žen byly výsledky ještě více alarmující – 62% mělo nedostatečné zásoby Fe a 27% latentní sideropenii [5].

Hladina ferritinu je ukazatelem prostých zásob Fe, ale není ovlivněna aktuálními erythropoetickými signály kostní dřeně. Zároveň je ferritin reaktantem akutní fáze zánětlivé odpovědi organismu a jeho syntéza je stimulována zánětlivým procesem. Jsou proto stále hledány další možnosti, které včas pomohou identifikovat dárce ohrožené deficitem Fe. Ke zjištění prevalence subklinického deficitu je možné využít stanovení hladiny zinek–protoporfyrinu (ZPP) v erytrocytech. Metoda je založená na měření hladiny ZPP v erytrocytech. Při nedostatku železa se v posledním kroku syntézy do hemu inkorporuje do protoporfyrinu IX místo Fe zinek a zvyšuje se tak hladina ZPP. Do studie nizozemských autorů realizované v letech 2008 - 2010 ve dvou transfuzních centrech (Nijmegen a Utrecht) bylo zařazeno celkem 5280 dárců krve (2897 mužů a 2383 žen). Prevalence subklinického deficitu železa stanovená obsahem ZPP v erytrocytech dárců byla u mužů 6.9% a 9.8% u žen. Rozdílné výsledky předchozích dvou studií mohou být vysvětleny různou frekvencí odběrů a odlišnou požadovanou hladinou hemoglobinu v předodběrovém vzorku krve [6].

### ***Měření hepcidinu***

Stanovení hladin hepcidinu, jakožto klíčového regulátoru metabolismu železa, je v současnosti doporučováno při diferenciální diagnostice anémií chronických chorob, anémií u chronického poškození ledvin, hypochromních mikrocytárních anémií a hemochromatózy

[7]. Heparin by proto mohl sloužit i jako nový a doplňující diagnostický marker deficitu železa u všech dárců krve. Nicméně měření hladiny hepcidinu zůstává stále problematické. Ke stanovení hladiny hepcidinu byla vyvinuty metody založené na radioizotopově nebo enzymaticky značené imunoanalýze (ELISA) nebo na hmotnostní spektrometrii. Výhodou metod ELISA je především jejich lepší dostupnost v podobě komerčně vyráběných setů, nevýhodou je jejich nedostatečná validace, nižší přesnost při měření velmi nízkých koncentrací hepcidinu v séru a především skutečnost, že mnohé z nich nedetekují biologicky aktivní hepcidin-25. Jedinou společností se standardizovanou a validovanou metodou ELISA je Intrinsic LifeSciences (Los Angeles, USA) [8, 9, 10]. Při použití metod hmotnostní spektrometrie lze naopak stanovit i krajní a především velmi nízké koncentrace hepcidinu, její využití je však spojeno s nákladnějším vybavením laboratoře přístrojovou technikou a náročným procesem jejího zavedení [11]. Tato metoda byla zavedena v některých laboratořích na světě, včetně naší laboratoře [12, 13]. Hlavní limitací metody v důsledku neexistence mezinárodního standardu pro hepcidin-25, je absence univerzálních referenčních mezí a již patologických hodnot, na základě kterých by byla vypracovaná příslušná doporučení pro léčbu stavů s narušeným metabolismem železa [14]. Otázka standardizace hmotnostní spektrometrie pro stanovení hladin hepcidinu je tedy klíčová pro její rutinní využití v klinické praxi.

Cílem této práce bylo zhodnotit zásoby Fe a možný přínos vyšetření hladiny hepcidinu u dárců krve, kteří splnili kritéria pro darování krve a byli uschopněni k odběru. Podobná studie stanovující prevalenci deficitu zásob železa u dárců krve v České republice dosud nebyla provedena.

## **Materiál a metodika**

Cílovou skupinu tvořili dobrovolní dárci krve, kteří byli náhodným výběrem vyzvaní k participaci na výzkumu v letech 2013 – 2014. Všichni dárci prošli klinickým vyšetřením lékařem a splnili podmínky pro darování dle platné vyhlášky 143/2008 Sb. a dle platných Doporučených postupů Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP [15, 16]. Provedení studie bylo schváleno Etickou komisí Fakultní nemocnice a Univerzity Palackého v Olomouci. Celkem bylo do studie zařazeno 117 dárců krve (64 mužů a 53 žen), průměrný věk mužů byl 40,2 let, průměrný věk žen 35,5 let. Muži darovali před zařazením do studie průměrně 27x, ženy 14x. Odběr vzorků byl realizován po podepsání informovaného souhlasu s účastí na výzkumu. Vzorky séra byly zamrazeny na - 80 st. C a udržovány za stálých podmínek do

vyšetření hladiny hepcidinu. Kontrolní skupinu při srovnání hladin hepcidinu tvořily zdravé subjekty (muži a ženy) s negativní anamnézou dárčovství krve.

**Vyšetření parametrů krevního obrazu** – analýza vzorků byla provedena na automatickém analyzátoru Sysmex KX-21N (Sysmex Corporation, Kobe, Japan).

**Hladiny plazmatického železa** byla stanovena fotometricky na přístroji Cobas 8000 (Hitachi, Tokyo, Japan). **Ke stanovení hladiny feritinu** byla použita chemiluminiscenční metoda a analyzátor Architect i2000SR (Abbott Laboratories, Illinois, USA).

**Vyšetření hladiny hepcidinu** - Použitá metoda měření hladiny hepcidinu je založena na extrakci na pevné fázi (SPE) a kapalinové chromatografii spřažené s hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS). Regresní rovnice získaná z kalibračních standardů byla použita pro zpětný výpočet koncentrace hepcidinu ve vzorku. Metoda byla již dříve detailně popsána a validována v laboratořích Intrinsic LifeSciences LLC (La Jolla, CA, USA) [12, 13].

**Statistické zpracování dat** bylo provedeno regresní analýzou pomocí cenzorovaného regresního modelu Tobit, software Statistica 12 (StatSoft, Inc.). Za statisticky významné byly považovány výsledky na hladině významnosti 5%.

## Výsledky

Nejprve byly vyhodnoceny hematologické parametry dárců (Tabulka 1). Všichni dárči splňovali požadavky způsobilosti k dárčovství. Hladina hemoglobinu byla u všech mužů  $\geq 135$  g/l, u žen  $\geq 125$  g/l, hodnota hematokritu  $\geq 0.40$  u mužů a  $\geq 0.38$  u žen. Muži měli signifikantně vyšší počet erytrocytů, hladinu hemoglobinu a hematokritu než ženy. U žen byly zaznamenány signifikantně vyšší hladiny leukocytů a trombocytů než u mužů. Bez rozdílu mezi pohlavími byly hodnoty středního objemu erytrocytů.

Výsledky měření parametrů metabolismu Fe jsou shrnuty v Tabulce 2. V hladinách plazmatického Fe jsme nezaznamenali statisticky významný rozdíl mezi muži a ženami (21.5 vs. 23.3  $\mu\text{mol/l}$ ). Hodnota Fe pod dolní hranici normy byla zjištěna pouze u 1 muže dárce; naopak 14 mužů a 11 žen mělo plazmatické Fe mírně zvýšené. Muži měli signifikantně vyšší hladinu feritinu (28  $\mu\text{g/l}$ ) než ženy (18  $\mu\text{g/l}$ ). Hladinu feritinu pod dolní referenční hodnotu (12  $\mu\text{g/l}$ ) jsme zjistili u 6 mužů (9.52%) a 9 žen (17.64%).

Na rozdíl od feritinu se hladina hepcidinu mezi oběma pohlavími dárců nelišila (6.61 ng/ml u mužů a 7.14 ng/ml u žen), byla však signifikantně nižší než hladina hepcidinu u kontrolní skupiny (27.6 ng/ml,  $p < 0.001$ ) [12]. Celkem 58 mužů a 45 žen mělo hladinu

hepcidinu pod 1. kvartilem kontrolní skupiny (18 ng/ml); z toho 23 dárců, 18 mužů (28%) a 5 žen (9.8%), mělo hladinu hepcidinu sniženou pod detekční limit (2.5 ng/ml). Průměrná hladina feritinu u dárců s hepcidinem pod detekční limit byla signifikantně nižší než u skupiny dárců s měřitelnou hodnotou hepcidinu ( $17.95 \pm 7.46$  vs.  $32.9 \pm 22.32$   $\mu\text{g/l}$ ).

U dárců s měřitelnou hodnotou hepcidinu jsme dále stanovovali také poměr hepcidinu k feritinu, který odráží adekvátnost hladiny hepcidinu vzhledem k zásobám Fe. U stavů s narušenou, akcelerovanou a/nebo neefektivní erytropoézou je tento index výrazně snížený díky supresivnímu účinku erytropoetické aktivity na hepcidin [12]. Tento index dosahoval u mužů hodnoty 0.2909; u žen byl 1.6x vyšší (0.4712), což odpovídá signifikantně nižší hladině feritinu u žen než u mužů (1.6x); ani v jedné ze skupin se index hepcidin/feritin však signifikantně nelišil od indexu vypočtenému pro zdravé kontroly (0.3445) [12]. Tento výsledek ukazuje na fyziologickou erytropoetickou aktivitu u této skupiny dárců krve a na skutečnost, že hladina hepcidinu je u nich fyziologicky snižená vzhledem k nižším zásobám Fe.

Na závěr byla provedena regresní analýza ke zjištění korelace vybraných parametrů krevního obrazu a metabolismu železa s hladinou hepcidinu. U mužů i u žen hladina feritinu pozitivně korelovala s hladinou hepcidinu (Tabulka 3, Obrázek 1). Korelaci hladiny hepcidinu s počtem odběrů jsme v našem souboru dárců nezaznamenali (Tabulka 3).

## Diskuze

Česká republika se dlouhodobě potýká s relativním nedostatkem dárců krve. V roce 2013 bylo v České republice celkem 264 000 opakovaných/pravidelných dárců krve a 54 000 prvodárců [17]. Identifikováním dárců krve s vyšším rizikem rozvoje deficitu zásob železa, by bylo možné zabránit jejich dočasnému vyřazení nebo ztrátě těchto osob z evidence dárců krve. Ve skupině prvodárců se k odběru během tří let vrátí 70%, pokud byl odběr realizovaný oproti 21%, jejichž odběr byl odložen kvůli nízké hladině hemoglobinu. U opakovaných dárců krve je situace obdobná, během tří let se vrátí po odkladu odběru z důvodu nízké hladiny hemoglobinu jen 64%, ze skupiny dárců bez odkladu se vrací 91% dárců [18]. Identifikací osob s vysokým rizikem rozvoje deficitu Fe by bylo možné předejít výskytu symptomů souvisejících s deficitem Fe, který je spojený se sníženou fyzickou a pracovní výkonností, zhoršenou schopností se soustředit, zvýšenou únavou a zhoršením ostatních kognitivních funkcí [19, 20, 21], což u nich může vést k rozhodnutí nepokračovat v dárcovství.

Laboratorně lze deficit Fe stanovit několika metodami, které jsou založené na měření hladin feritinu [5], solubilního TfR transferinu a saturace transferinu [7], ZPP [6], všechny však mají své limity. Například feritin je ukazatelem prostých zásob Fe, ale neposkytuje informaci o buněčných potřebách Fe. Solubilní TfR se zvyšuje při nedostatečném přísunu funkčního Fe do buněk, jeho hladina ale současně stoupá se zvýšenou erythropoetickou aktivitou v kostní dřeni [7]. Novým potenciálním markerem by mohl být hepcidin, který kontroluje hladinu Fe v krevním oběhu tím, že reguluje jeho uvolňování ze zásob a příjem z potravy. Navíc vlastní syntéza hepcidinu je regulována jak zásobami Fe a jeho plazmatickou hladinou, tak i aktuální erythropoetickou aktivitou [22] a odráží tak aktuální stav homeostázy železa. U anemie z deficitu železa je hladina hepcidinu výrazně snižena až nedetekovatelná.

Naše výsledky jsou v souladu s dosud publikovanými daty o výskytu deficitu Fe u dárců krve. Nejčastěji užívaným parametrem ke stanovení deficitu Fe je feritin. Studie z posledních let na dárcovské populaci poukazují na častý výskyt snížené hladiny feritinu u dárců krve [5, 23, 24, 25]. Studie Mast a kol. [26] ukázala na výhodu kombinované analýzy hladiny feritinu a hepcidinu. U dárců, u kterých byla zjištěna současně nízká hladina feritinu a hepcidinu, došlo při dalším odběru k signifikantnímu snížení hemoglobinu o 5.1 g/l. Izolované snížení hepcidinu nebo feritinu naopak nebylo při následujícím odběru spojeno s poklesem hladiny hemoglobinu [26].

Deficit zásobního Fe se vyskytuje u dárců, kteří byli připuštěni k odběru a mají tedy vyhovující hladiny hemoglobinu, při hodnocení feritinu u 14.3% mužů a u 8.9% žen, v případě hepcidinu u 27.4% mužů a 24.7% žen [6]. V naší dárcovské populaci byl deficit prostých zásob Fe určený hladinou feritinu dle očekávání nižší u mužů než u žen, což koresponduje s výsledky studie RISE [5]. Zároveň současná analýza hladin hepcidinu pomohla odhalit vyšší podíl dárců potenciálně ohrožených deficitem Fe, než samostatné měření feritinu. Překvapivě ale mezi dárci krve s hladinou hepcidinu pod detekčním limitem metody bylo více mužů než žen, což by bylo možné vysvětlit rozdílnou doporučenou frekvencí odběrů u mužů a žen. Velmi nízké hladiny hepcidinu před odběrem prokazují, že tito dárci již mají výrazný deficit železa pro erythropoézu a při další depleci Fe by již nemuseli být schopni pokrýt potřeby organismu. Protože prezentovaná studie odráží vliv dlouhodobého dárcovství na metabolismus železa a hladinu hepcidinu a statisticky jsme neprokázali korelaci mezi celkovým počtem odběrů a hladinou hepcidinu, plánujeme v následné prospektivní studii zhodnotit vliv frekvence odběrů na hladinu hepcidinu a další parametry metabolismu Fe.

Stanovení hladiny hepcidinu u dárců krve tak poskytuje cenné informace o schopnosti dárce zvýšit absorpci Fe ze stravy a uvolnit Fe ze zásob – snižující se hladina hepcidinu vede ke zvýšení absorpce Fe ve střevě a redistribuci Fe ze zásob do aktivního kompartmentu [27]. Heparin je vylučován močí, a proto měření jeho hladiny v moči je teoreticky jedinou neinvazivní metodou ke zjištění deficitu Fe [28] a mohlo by eventuálně doplnit již existující testy. Před uvedením vyšetření hladiny hepcidinu do rutinní praxe je však nutná standardizace metody a vytvoření populačních norem. Cena stanovení hladiny hepcidinu v naší laboratoři dle předběžné kalkulace odpovídá přibližně 1.5 násobku ceny vyšetření feritinu.

## **Závěr**

Dárcovství krve je vždy spojeno se zásahem do metabolismu Fe. Při dnešních znalostech by bylo možné minimalizovat důsledky spojené s deficitem tohoto esenciálního prvku. V rámci péče o dárce je důležité identifikovat ty dárce, jejichž kompenzační zvýšení příjmu Fe je nedostačující k obnovení zásob Fe. Heparin jako centrální molekula řídící absorpci a redistribuci Fe je velmi užitečný indikátor metabolismu Fe. Stanovení hladiny hepcidinu u dárců, kteří splňují kritéria pro odběr, by v případě dárců s negativní bilancí Fe mohlo zabránit dalšímu prohlubování deficitu Fe. Zavedení měření hladiny hepcidinu hmotnostní spektrometrií může výrazně zpřesnit diagnostiku subklinického deficitu Fe u dárců krve a lze předpokládat, že vzhledem k možnostem, které měření hladin hepcidinu poskytuje, bude se nyní výzkum v oblasti metabolismu Fe zabývat právě optimalizací metod měření hepcidinu a jeho snadnou dostupností.

### **Podíl autorů:**

**LS** realizace studie, příprava rukopisu;

**DH, MH** stanovení hladiny hepcidinu;

**DG, IS** klinické vyšetření dárců;

**M Horváthová, DP** interpretace výsledků, revize rukopisu.

### **Poděkování**

Práce byla podporována grantem Ministerstva zdravotnictví ČR č. NT13587.

## Reference

1. Doig K. Disorders of iron and heme metabolism. In: Rodak BF, Fritsma GA, Keohane OA. Hematology: clinical principles and applications. 4. vyd., Elsevier, Missouri, 2012; 271-284.
2. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J et al. Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. 2004;306(5704):2090-3.
3. Ganz T, Nemeth E. The hepcidin-ferroportin system as a therapeutic target in anemias and iron overload disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011;2011:538-42.
4. Waldvogel-Abramovski S, Waeber G, Gassner C et al. Iron and transfusion medicine. *Blood Rev*. 2013;27(6):289-95.
5. Cable RG, Glynn SA, Kiss JE, et al. NHLBI Retrovirus Epidemiology Donor Study-II. Iron deficiency in blood donors: analysis of enrollment data from the REDS-II Donor Iron Status Evaluation (RISE) study. *Transfusion*. 2011;51(3):511-22.
6. Baart AM, de Kort WL, Moons KG, Atsma F, Vergouwe Y. Zinc protoporphyrin levels have added value in the prediction of low hemoglobin deferral in whole blood donors. *Transfusion*. 2013;53(8):1661-9.
7. Pasricha SR, McQuilten ZK, Keller AJ, Wood EM. Hemoglobin and iron indices in nonanemic premenopausal blood donors predict future deferral from whole blood donation. *Transfusion*. 2011;51(12):2709-13.
8. Ganz T, Olbina G, Girelli D, Nemeth E, Westerman M. Immunoassay for human serum hepcidin. *Blood*. 2008;112(10):4292-7.
9. Young MF, Glahn RP, Ariza-Nieto M et al. Serum hepcidin is significantly associated with iron absorption from food and supplemental sources in healthy young women. *Am J Clin Nutr*. 2009;89(2):533-8.
10. Melis MA, Cau M, Congiu R et al. A mutation in the *TMPRSS6* gene, encoding a transmembrane serine protease that suppresses hepcidin production, in familial iron deficiency anemia refractory to oral iron. *Haematologica*. 2008;93(10):1473-9.
11. Macdougall IC, Malyszko J, Hider RC, Bansal SS. Current status of the measurement of blood hepcidin levels in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010 Sep;5(9):1681-9
12. Mojzíkova R, Koralková P, Holub D et al. Iron status in patients with pyruvate kinase deficiency: neonatal hyperferritinaemia associated with a novel frameshift deletion in the *PKLR* gene (p.Arg518fs), and low hepcidin to ferritin ratios. *Br J Haematol* 2014;165(4):556-63.



13. Pospíšilová D, Houda J, Holub D et al. Význam stanovení hladiny hepcidinu u vybraných typů anémií v dětském věku. *Transfuze Hematol. dnes.* 2012;19 (2):58-65.
14. Kroot JJ, van Herwaarden AE, Tjalsma H, Jansen RT, Hendriks JC, Swinkels DW. Second round robin for plasma hepcidin methods: first steps toward harmonization. *Am J Hematol.* 2012 Oct;87(10):977-83.
15. Vyhláška MZ ČR 143/2008 Sb. o stanovení bližších požadavků pro zajištění jakosti a bezpečnosti lidské krve a jejích složek (vyhláška o lidské krvi).
16. Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL2007\_03: Posuzování způsobilosti k dárcovství krve a krevních složek, verze 7, 12. 4. 2007, dostupné z: [http://www.transfuznispolocnost.cz/index.php?page=dokumenty&identifikator\\_kategorie=DO PORUCENE\\_POSTUPY](http://www.transfuznispolocnost.cz/index.php?page=dokumenty&identifikator_kategorie=DO PORUCENE_POSTUPY).
17. Výroční zpráva zařízení transfuzní služby 2013, MZ ČR, dostupné z: [http://www.mzcr.cz/dokumenty/zprava-o-cinnosti-zarizeni-transfuzni-sluzby-za-rok-2013\\_9292\\_1952\\_3.html](http://www.mzcr.cz/dokumenty/zprava-o-cinnosti-zarizeni-transfuzni-sluzby-za-rok-2013_9292_1952_3.html).
18. Hillgrove T, Moore V, Doherty K, Ryan P. The impact of temporary deferral due to low hemoglobin: future return, time to return, and frequency of subsequent donation. *Transfusion.* 2011;51(3):539-47.
19. Falkingham M, Abdelhamid A, Curtis P, Fairweather-Tait S, Dye L, Hooper L. The effects of oral iron supplementation on cognition in older children and adults: a systematic review and meta-analysis. *Nutr J.* 2010 Jan 25;9:4.
20. Murray-Kolb LE, Beard JL. Iron treatment normalizes cognitive functioning in young women. *Am J Clin Nutr.* 2007 Mar;85(3):778-87.
21. Hinton PS. Iron and the endurance athlete. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2014;39(9):1012-8.
22. Pak M, Lopez MA, Gabayan V, Ganz T, Rivera S. Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood.* 2006;108(12):3730-5.
23. Baart AM, van Noord PA, Vergouwe Y et al. High prevalence of subclinical iron deficiency in whole blood donors not deferred for low hemoglobin. *Transfusion.* 2013;53(8):1670-7.
24. Rigas AS, Sørensen CJ, Pedersen OB et. al. Predictors of iron levels in 14,737 Danish blood donors: results from the Danish Blood Donor Study. *Transfusion.* 2014; 54:789-96.
25. Goldman M, Uzicanin S, Scalia V, O'Brien SF. Iron deficiency in Canadian blood donors. *Transfusion.* 2014;54(3 Pt 2):775-9.
26. Mast AE. Low hemoglobin deferral in blood donors. *Transfus Med Rev.* 2014;28(1):18-22.

27. Fleming MD. The regulation of hepcidin and its effects on systemic and cellular iron metabolism. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2008:151-8.
28. Sanad M, Gharib AF. Urinary hepcidin level as an early predictor of iron deficiency in children: A case control study. *Ital J Pediatr*. 2011;37:37.

MUDr. Lucie Sulovská (*luciesulovska@email.cz*)

Dětská klinika, FN a LF Univerzity Palackého v Olomouci

I. P. Pavlova 6, Olomouc

## Přílohy

**Tabulka 1: Hematologické charakteristiky dárců zařazených do studie.**

	Počet dárců	Leu 10 <sup>9</sup> /l	Ery 10 <sup>12</sup> /l	Hb g/l	Hkt ratio	MCV fl	Trombocyty 10 <sup>9</sup> /l
	113	5.8 (5.2-6.7)	4.86 (4.63-5.15)	144 (138-152)	0.43 (0.41-0.45)	88 (85.5-90.1)	223 (193-254)
Ž	51	6.3 (5.4-7.05)	4.62 (4.45-4.79)	137 (131.5-142)	0.41 (0.39-0.42)	88.7 (86.5-90.1)	236 (197-268.5)
M	62	5.7 (5.1-6.2)	5.09 (4.88-5.42)	149 (144-157.75)	0.45 (0.43-0.46)	87.5 (84.7-89.55)	217 (184.5-246.75)
<i>p</i>		<b>0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>NS</b>	<b>0.041</b>

*Hodnoty jsou uvedeny jako medián (1.kvartil – 3.kvartil). Ž ženy; M muži; Leu počet leukocytů; Ery počet erytrocytů; Hb hemoglobin; Hkt hematokrit; MCV střední objem erytrocytů; p hladina statistické významnosti mezi muži a ženami; NS nesignifikanční*

**Tabulka 2: Parametry metabolismu Fe dárců zařazených do studie.**

	Počet dárců	Fe μmol/l	Feritin μg/l	Hepcidin ng/ml	Index hepcidin/feritin <sup>±</sup>
	113	21.85 (16.6-28.15)	23 (15-36)	6.96 (3.39-10.91)	0.3755 (0.1877-0.5417)
Ž	51	23.3 (17.05-28.25)	18 (14.5-29)	7.14 (6.05-11.49)	0.4712 (0.2959-0.7179)
M	62	21.5 (16.3-27.7)	28 (15.5-47.5)	6.61 (2.5-10.43)	0.2909 (0.1516-0.4894)
<i>p</i>		<b>NS</b>	<b>0.009</b>	<b>NS</b>	<b>0.011</b>

*Hodnoty jsou uvedeny jako medián (1.kvartil – 3.kvartil). Referenční meze: Fe [muži 6.6 – 28; ženy 7.2 – 29], feritin [12-300]<sup>1</sup>. Hodnoty kontrolní skupiny, medián (1.kvartil – 3.kvartil): hepcidin 27.6 (18-50.25), index hepcidin/feritin 0.3445 (0.2787-0.3889). Ž ženy; M muži; Fe hladina plazmatického železa; Ref. referenční meze; p p-value statistické významnosti mezi muži a ženami; NS nesignifikantní*

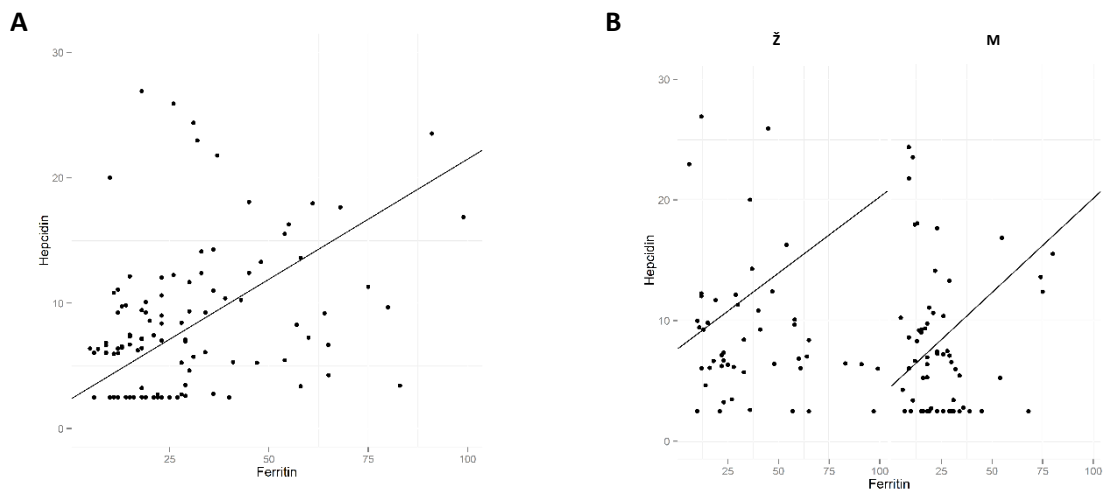
<sup>±</sup> index hepcidin/feritin byl stanoven u dárců s nadprahovou hodnotou hepcidinu

**Tabulka 3: Tobit regresní analýza závislosti hladin hepcidinu na vybraných parametrech krevního obrazu a metabolismus železa.**

<i>p</i> -value	Věk	Ery	Hb	Hkt	MCV	Trombo	Fe	Feritin	Počet odběrů
<b>Ž</b>	0.08	0.322	0.504	0.735	0.075	0.204	0.549	<b>0.015</b>	0.429
<b>M</b>	0.326	0.528	0.991	0.338	0.91	0.166	0.286	<b>&lt;0.001</b>	0.578


**Ž** ženy; **M** muži; **Ery** erytrocyty; **Hb** hemoglobin; **Hkt** hematokrit; **MCV** střední objem erytrocytů; **Trombo** trombocyty; **Fe** plazmatické železo.

**Obrázek 1:** Graf korelace hladin hepcidinu a feritinu.




Hladina hepcidinu vykazuje pozitivní korelaci s hladinou feritinu u všech dárců (A) i u obou pohlaví odděleně (B). *M* muži; *Ž* ženy

## **Příloha 4**



**55th ASH® Annual Meeting and Exposition**  
 New Orleans, LA • December 7-10, 2013

**ABSTRACTS, PROGRAM, & PERSONAL SCHEDULER**



Start/Search

Browse by Day

Browse by Program

Browse by Author

Browse by Keyword

Personal Scheduler

ASH Meeting Home

ASH Home

**2478 Erythropoiesis and Iron Metabolism In Diamond-Blackfan Anemia**

**Program:** Oral and Poster Abstracts  
**Session:** 508. Bone Marrow Failure: Poster II

**Sunday, December 8, 2013, 6:30 PM-8:30 PM**  
 Hall E (Ernest N. Morial Convention Center)

**Dagmar Pospisilova, MD, PhD<sup>1\*</sup>, Dusan Holub<sup>2\*</sup>, Zuzana Zidova, MSc<sup>3\*</sup>, Barbora Ludikova<sup>4\*</sup>, Lucie Sulovska<sup>1\*</sup>, Vladimír Divoky, PhD<sup>2</sup> and Monika Horvathova, PhD<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Department of Pediatrics, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University and University Hospital, Olomouc, Czech Republic  
<sup>2</sup>Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University and University Hospital, Olomouc, Czech Republic  
<sup>3</sup>Department of Biology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic  
<sup>4</sup>Department of Biology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University and University Hospital, Olomouc, Czech Republic

Diamond-Blackfan anemia (DBA) is a rare congenital red cell aplasia characterized by macrocytic anemia, reticulocytopenia and reduced number of erythroblasts in the bone marrow. Etiology and symptoms of DBA are closely associated with mutations of genes coding for 12 ribosomal proteins. Approximately 40% of patients are dependent on regular transfusions. In chronically transfused DBA patients, severe iron overload with tissue hemosiderosis with the need for iron chelation develops and has a substantial impact on morbidity and mortality of DBA patients. Liver is the most affected organ, but extra-hepatic iron accumulation, although less well documented, appears to occur early and at high frequency. Despite these facts a detailed analysis of iron metabolism in DBA is missing.

-Author name in bold denotes the presenting author  
 -Asterisk \* with author name denotes a Non-ASH member

 denotes an abstract that is clinically relevant.

 denotes that this is a recommended PHD Trainee Session.

 denotes that this is a ticketed session.

We therefore aimed to determine selected markers of erythropoietic activity and iron metabolism including the levels of the key regulator of iron homeostasis, hepcidin, in 14 DBA patients from the Czech National DBA Registry. Ten patients receive regular transfusions, two are treated with steroids and two are in the remission. None of the patients had signs of an inflammatory process at the time of the examination. Following markers of iron metabolism were analysed: iron, total iron binding capacity, transferrin saturation, ferritin and soluble transferrin receptor (TfR). Serum hepcidin was measured by proteomic analysis. Levels of growth differentiation factor 15 (GDF 15), a putative marker of erythropoietic activity, were measured by ELISA. Pearls' staining was used for the liver iron detection. In all transfusion dependent patients, low levels of soluble TfR and reduced number of erythroblasts in the bone marrow confirm severely suppressed erythropoiesis which corresponded with dramatically elevated serum erythropoietin (EPO) levels. Analysis of iron parameters showed increased transferrin saturation and high ferritin levels. The two patients who are currently in the remission had near normal blood counts and iron parameters. Liver biopsy on 5 selected patients revealed excessive iron accumulation in both liver hepatocytes and macrophages which can be attributed to increased iron uptake and non-effective erythrocytes-derived iron recycling, respectively. Measurement of hepcidin levels showed significant elevation in DBA cohort in comparison with healthy controls (p>0.0005). The highest hepcidin was detected for transfusion dependent patients, the lowest (near normal) for patients in remission. As erythropoiesis is known to produce a signal for hepcidin suppression, patients in remission with restored erythropoietic activity are likely able to attenuate hepcidin expression and increase the pool of iron available for improved erythropoiesis. On the other hand repeated blood transfusions contribute to the suppression of erythropoiesis thus likely relieving hepcidin synthesis and worsening iron recycling. We also found that elevated hepcidin positively correlated with ferritin levels. No correlation was detected with EPO or GDF15, the putative negative regulator of hepcidin production. These results indicate that EPO is an indirect suppressor of hepcidin synthesis and that GDF15 possibly plays a hepcidin-regulatory role in the disease states associated with ineffective erythropoiesis but not in DBA.

In conclusion we propose that in DBA patients iron overload develops as a consequence of the combination of repeated transfusions and absent or reduced erythropoiesis in the bone marrow. At the systemic level the increased hepcidin promotes iron retention in macrophages and thus is responsible for impaired iron recycling.

**Acknowledgements:** Grant support: Ministry of Health, Czech Republic, grant No. NT11059 to DP and NT/13587 to VD, Czech Grant Agency, grant No. P305/11/1745, and Internal Grant of Palacky University Olomouc (LF\_2013\_010). We thank dr. Thomas Ganz for validation of our HPLC-MS-based hepcidin measurements.

**Disclosures:** No relevant conflicts of interest to declare.

See more of: 508. Bone Marrow Failure: Poster II  
 See more of: Oral and Poster Abstracts

[<< Previous Abstract](#) | [Next Abstract >>](#)



### **Publikovaná abstrakta**

Sulovská L, Holub D., Židová Z., Divoká M., Mihál V., Vrbková J., Horváthová M., Pospíšilová D. Charakteristiky metabolismu železa a erythropoézy u dětských pacientů s poruchami erytrocytární membrány a talasémia minor. XVII. Slovensko - Český hematologický a transfuziologický zjazd s mezinárodní účastí, 24.–27. 9. 2015, Bratislava.

Sulovská L., Holub D., Židová Z., Divoká M., Mihál V., Vrbková J., Horváthová M., Pospíšilová D. Charakteristiky metabolismu železa a erythropoézy u dětských pacientů s poruchami erytrocytární membrány a talasémia minor. XXV. Konference dětských hematologů a onkologů České a Slovenské republiky, 16.–18. 10.2015, Brno.

Sulovská L., Pospíšilová D., Ravčuková B., Freiburger T. Současný výskyt neonatální aloimunitní trombocytopenie a Wiskottova – Aldrichova syndromu u novorozence. IX. Český pediatrický kongres s mezinárodní účastí, 19.–22. 5. 2010, Olomouc.

Sulovská L., Pospíšilová D. Trombocytopenie s renálním selháním. XXIV. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, XIV. Konference ošetrovatelských profesí v hematologii, XIII. Konference zdravotních laborantů v hematologii, 3rd Symposium on Advances in Molecular Hematology, 24.-26.6.2010, Olomouc.

Sulovská L., Pospíšilová D., Ravčuková D., Ravčuková B., Freiburger T., Litzmann J., Novák Z., Kopřiva F. Úskalí diagnostiky trombocytopenie u novorozence. XX. Konference dětských hematologů a onkologů České a Slovenské republiky, 8.-10.10 2010, Praha

Sulovská L., Pospíšilová D., Hrachovinová I., Flögelová H., Novák Z., Stejskalová I. Izolovaná těžká trombocytopenie předcházející rozvoji trombotické trombocytopenické purpury. XX. Konference dětských hematologů a onkologů České a Slovenské republiky, 8.-10.10 2010, Praha

Sulovská L., Novák Z., Zápalka M., Kopřiva F., Nohýnková E., Pospíšilová D. Jedno vyšetření, žádné vyšetření. XXIX. Dny praktické a nemocniční pediatrie, 27.-28.5.2011, Olomouc

Sulovská L, Pospíšilová D, Flögelová H, Stejskalová I, Novák Z, Hrachovinová I. When thrombocytopenia is not immune thrombocytopenia. 20th Meeting of European Society of Paediatric Clinical Research, 1.-2.7.2011, Brno.

Sulovská L., Ludíková B., Karásková E., Michálková K., Pospíšilová D. „Tři v jednom“ aneb příběh jednoho chlapce a tří příčin anémie. XXI. Konference dětských hematologů a onkologů České a Slovenské republiky, 7.-9.10 2011, Ústí nad Labem.

Sulovská L., Pospíšilová D., Smolka V., Michálková K., Mejstříková E., Stejskalová I., Novák Z., Mihál V. Hemofagocytující lymfohistiocytóza - kazuistika. XXI. Konference dětských hematologů a onkologů České a Slovenské republiky, 7.-9.10 2011, Ústí nad Labem.

Sulovská L., Novák Z., Ludíková B., Michálková K., Geierová M., Mihál V., Pospíšilová D. Lymfadenopatie dvakrát jinak. XXX. Dny praktické a nemocniční pediatrie, 25.-26.5.2012, Olomouc.

Sulovská L. Pospíšilová D. Wiskottův-Aldrichův syndrom ve světle nových poznatků. XVIII. Pařízkovy dny, 29.3.-30.3.2012, Ostrava.

Sulovská L., Čelková M., Pospíšilová D., Müllerová I., Neklanová M., Novák Z. Akutní intracerebrální krvácení jako důsledek trombózy sagitálního a transverzálního sinu. XXIV. konference dětských hematologů a onkologů České a Slovenské republiky, 10.-12.10.2014, Olomouc.

#### **Publikace v recenzovaném časopise**

Sulovská L., Stejskalová I., Flögelová H., Hrachovinová I., Pospíšilová D. Když trombocytopenie není imunitní trombocytopenická purpura. *Pediatrie pro praxi*. 2013;14(3):192-194.

Ludíková B., Mojžíková R., Pospíšilová P., Houda J., Sulovská L., Divoká M., Hak J., Procházková D., Divoký V., Pospíšilová D. Deficit pyruvátkinázy v dětském věku. *Česko-slovenská pediatrie*.2012;67(3):152-159.

Pavelka J., Krbková L., Zárošská E., Nohýnková E., Pospíšilová D., Sulovská L. Kazuistika – viscerální leishmanióza dítěte. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*.2012;18(6):198-200