

Univerzita Palackého v Olomouci
Lékařská fakulta

**Vybrané poruchy erythropoézy a energetického
metabolizmu erytrocytů v dětském věku**

DISERTAČNÍ PRÁCE

MUDr. Barbora Ludíková

Olomouc, prosinec 2013

Doktorand:

Doktorský studijní program:

Školící pracoviště:

Školitel:

MUDr. Barbora Ludíková

Pediatric

Dětská klinika Lékařské fakulty Univerzity

Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnice Olomouc

Doc. MUDr. Dagmar Pospíšilová, Ph.D.

Prohlašuji, že disertační práci jsem vypracovala samostatně pod odborným vedením své školitelky Doc. MUDr. Dagmar Pospíšilové, Ph.D. a v disertační práci jsem uvedla veškerou použitou literaturu.

Poděkování

Chtěla bych projevít své upřímné poděkování všem, kteří mi pomohli s realizací mé práce. Zejména své školitelce Doc. MUDr. Dagmar Pospíšilové, Ph.D. za cenné rady a vloženou důvěru. Dále prof. MUDr. Vladimíru Mihálovi, CSc. za poskytnutí pracovního zázemí a za rady, které mi v průběhu studia uděloval.

Mé díky patří samozřejmě všem kolegům z laboratoří Ústavu biologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, Ústavu molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a Dětské kliniky Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnice Olomouc.

Práce byla podporována granty: Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví ČR: NT11059, 00023736, NT13587, NS9951, NT11208 a granty Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR: MSM6198959205.

Děkuji své rodině za dlouhodobou podporu a důvěru.

V Olomouci dne 20.12.2013

MUDr. Barbora Ludíková

Obsah:

Seznam zkratk	7
Úvod	9
A. TEORETICKÁ ČÁST	11
1 Erytropoéza	11
1.1 Hematopoéza	11
1.2 Vývoj erytrocytů	12
1.3 Transkripční faktory	14
1.4 Růstové faktory	15
1.5 Funkce erytrocytů	16
1.6 Vliv stresu na erytropoézu	17
1.7 Energetický metabolismus erytrocytu	17
1.7.1 Embdenův- Meyerhofův cyklus	18
1.7.2 Hexózo-monofosfátový zkrat (Pentósový cyklus)	19
2 Diamondova-Blackfanova anémie	20
2.1 Definice	20
2.2 Etiologie a dědičnost	20
2.3 Ribozomopatie	21
2.3.1 Modely ribozomální haploinsuficience	22
2.3.2 Ribozomální dysfunkce u DBA	23
2.3.3 Aktivace p53 při ribozomální dysfunkci	24
2.3.4 Další ribozomopatie	25
2.4 Klinické příznaky	25
2.5 Diagnostika	25
2.6 Léčba	26
2.7 Vývoj onemocnění	28
3 Deficit pyruvátkinázy	29
3.1 Definice	29
3.2 Etiologie	29
3.3 Mutace genu pro pyruvátkinázu	31
3.4 Klinické příznaky	31
3.5 Diagnostika	32
3.6 Léčba	33

4	Parvovirus B 19 a jeho vliv na erythropoézu	34
4.1	Definice	34
4.2	Struktura viru, prostup viru do buněk	34
4.2.1	Replikace viru a buněčná apoptóza	36
4.2.2	Vliv viru na imunitní systém	37
4.3	Průběh infekce	38
4.4	Klinické příznaky	38
4.5	Diagnostika	41
4.6	Léčba	41
	B. PRAKTICKÁ ČÁST	42
5	Databáze pacientů s Diamondovou-Blackfanovou anémií	42
5.1	Klinický popis pacientů a epidemiologické výsledky	42
5.2	Odpověď na léčbu	45
5.3	Metodiky vyšetření	46
5.3.1	Stanovení aktivity eADA	46
5.3.2	Stanovení hladiny erythropoetinu	46
5.3.3	Cytologické vyšetření nátěrů kostní dřeně	47
5.3.4	Analýza erytroidních progenitorů kostní dřeně	47
5.3.5	Statistika	48
5.3.6	Analýza mutací ribozomálních proteinů	48
5.3.7	Zpracování a analýza vzorků kostní dřeně pacientů s DBA metodami průtokové cytometrie	49
5.3.7.1	<i>Zpracování buněk kostní dřeně ke stanovení odpovědi na leucin a lithium in vitro</i>	49
5.3.7.2	<i>Analýza proteosyntézy (Click It kit/Invitrogen)</i>	49
5.3.7.3	<i>Analýza progenitorových buněk</i>	50
5.4	Výsledky provedených laboratorních vyšetření	50
5.5	Mutace ribozomálních proteinů	53
5.5.1	Mutace RPS19	53
5.5.2	Mutace RPS17	54
5.5.3	Mutace RPS26	54
5.5.4	Mutace RPL5	55
5.5.5	Mutace RPL11	56

5.6	Rodiny	56
5.7	Korelace genotyp – fenotyp	58
5.8	Diskuze	59
6	Deficit pyruvátkinázy	62
6.1	Soubor pacientů	62
6.2	Metody	64
6.2.1	Stanovení aktivity pyruvátkinázy a G6PD	64
6.2.2	Sekvenace genu PKLR a HFE1	64
6.2.3	Stanovení hladiny hepcidinu	64
6.3	Výsledky	65
6.4	Diskuze	68
7	Parvovirus B19	71
7.1	Pacienti	71
7.2	Metody a vyšetření	73
7.2.1	Sérologické vyšetření	73
7.2.2	Izolace DNA ze vzorků kostní dřeně	73
7.2.3	Kvantifikace DNA Parvoviru B19 metodou qPCR	73
7.3	Výsledky	74
7.4	Diskuze	79
	Souhrn	81
	Summary	83
	Literatura	85
	Publikační činnost související s disertační prací	97

Seznam zkratek

2,3 – DPG	2,3 difosofglycerát
5637CM	5637 stabilizující medium buněčné linie karcinomu močového měchýře
AMKL	akutní megakaryoblastická leukémie
ATP	adenosintrifosfát
B19V	Parvovirus B 19
BFU-E	burst-forming units-erythroid
CFU-E	colony forming units-erythroid
CFU-GEMM	myeloidní multipotentní buňka
DBA	Diamondova-Blackfanova anémie
DLBCL	difuzní velkobuněčný lymfom
DS	Downův syndrom
eADA	erytrocytární adenosindeaminázy
EPO	erythropoetin
EPOR	erythropoetinový receptor
Fe	železo
FOG-1	friend of GATA-1
GM-CSF	granulocytární makrofágová kolonie stimulující faktor
Hb	hemoglobin
HDM2	lidský double minute 2 protein
HGF	hepatocytární růstový faktor
HSC	multipotentní hematopoetická kmenová buňka
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
IL-1 β	interleukin-1 β
IL-3	interleukin -3
IL-6	interleukin-6
IVIG	imunoglobuliny
KO	krevní obraz
Leu	leucinu
Li	lithium
MDM2	myší double minute 2 protein
MDS	myelodysplastický syndrom
N-ACC	N-Acetylcystein
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NLS	nukleární lokalizační signál
NS1	nestrukturální protein
PARV4	Parvovirus 4
PHA	phytohemaglutinin
PK	pyruvátkináza
RIA	radioimmunoassay
RF	růstový faktor
RP	ribozomální protein
SCF	růstový faktor kmenových buněk
SCT	transplantace kmenových buněk
SGA	hmotnost neodpovídající gestačnímu věku
SNP	jednonukleotidový polymorfismus

TMD	transientní myeloproliferativní onemocnění
TNF- α	tumor necrosis factor alfa
VP	kapsidový protein
VP1u	VP1 unikátní oblast

Úvod

Erytropoéza je definována jako produkce erytrocytů. Jedná se o proces nezbytný pro život, který je jednou ze základních součástí hematopoézy. Vzhledem k velmi složitému systému regulace erytropoézy, ve kterém je zapojeno více než 1000 genů, a k nezbytnosti dostatečného přísunu energie a řady substrátů, jako jsou aminokyseliny, železo, vitamín B2, B6, B12 a kyselina listová, mohou vzniknout poruchy na mnoha úrovních tohoto procesu. Cílem práce je poukázat na specificky definované vrozené a získané poruchy erytropoézy a poruchy energetického metabolismu erytrocytů v dětském věku, které jsou sice vzácné, ale svým průběhem a vlivem na další život dítěte mohou být velmi závažné. Práce je zaměřena na onemocnění Diamondovou-Blackfanovou anémií, deficitem pyruvátkinázy a anemií při infekci Parvovirem B19.

Diamondova-Blackfanova anémie je vzácná vrozená aplazie erytropoézy s incidencí 4-7 případů na 1 milion živě narozených. Je charakterizovaná normochromní makrocytární anémií, retikulocytopenií a normocelulární kostní dřeně se selektivním nedostatkem erytroidních prekurzorových buněk. Patří mezi syndromy selhání kostní dřeně. Téměř u poloviny pacientů s DBA jsou přítomny další anomálie (vrozené vady ledvin, srdce, kostní změny aj.). Nejtypičtější patologií je malý vzrůst. Anémie je různé tíže. V některých případech jsou nemocní závislí na podávání kortikosteroidů či erytrocytárních přípravků. Důsledkem deficitní erytropoézy a opakovaných transfúzí je přetížení organismu železem, které způsobuje další komplikace onemocnění.

Deficit pyruvátkinázy je nejčastější enzymatickou abnormalitou glykolytické dráhy a spolu s deficitem glukózo-6-fosfátdehydrogenázy nejčastější příčinou nesférocytární hemolytické anémie. Klinické příznaky jsou různorodé od kompenzované anémie bez klinických příznaků přes poporodní anémii, neonatální ikterus, exacerbaci hemolýzy při infekcích, až po těžkou anémii se závislostí na pravidelné transfuzní léčbě. Přesto, že se jedná o druhou nejčastější enzymopatii, v České republice bylo u dětí zatím popsáno pouze několik případů. U našich pacientů jde o první dětské pacienty s průkazem kauzální mutace genu pro pyruvátkinázu.

Parvovirus B19 je běžný lidský patogen, který je původcem řady definovaných klinických jednotek, mezi které patří erythema infectiosum (pátá nemoc), artritida s horečnatým průběhem, hydrops plodu a tranzitní aplastická krize. Infekce tímto virem může mít na druhé straně charakter běžné sezónní virové infekce bez specifických příznaků. U primárně zdravých jedinců bývá průběh onemocnění mírný, kdežto u pacientů s imunodeficitem nebo

hematologickým onemocněním dochází obvykle k rozvoji specifických příznaků infekce, jako je tranzitní aplastická krize, chronická anémie u imunosuprimovaných pacientů, trombocytopenie a leukopenie.

Práce poukazuje na pokroky dosažené hlavně při diagnostice těchto onemocnění a upozorňuje i na jejich možné atypické a rozmanité projevy. Prezentuje a vyhodnocuje registr pacientů s DBA a také představuje pacienty se zcela nově prokázanými kauzálními mutacemi způsobujícími daná onemocnění.

A. TEORETICKÁ ČÁST

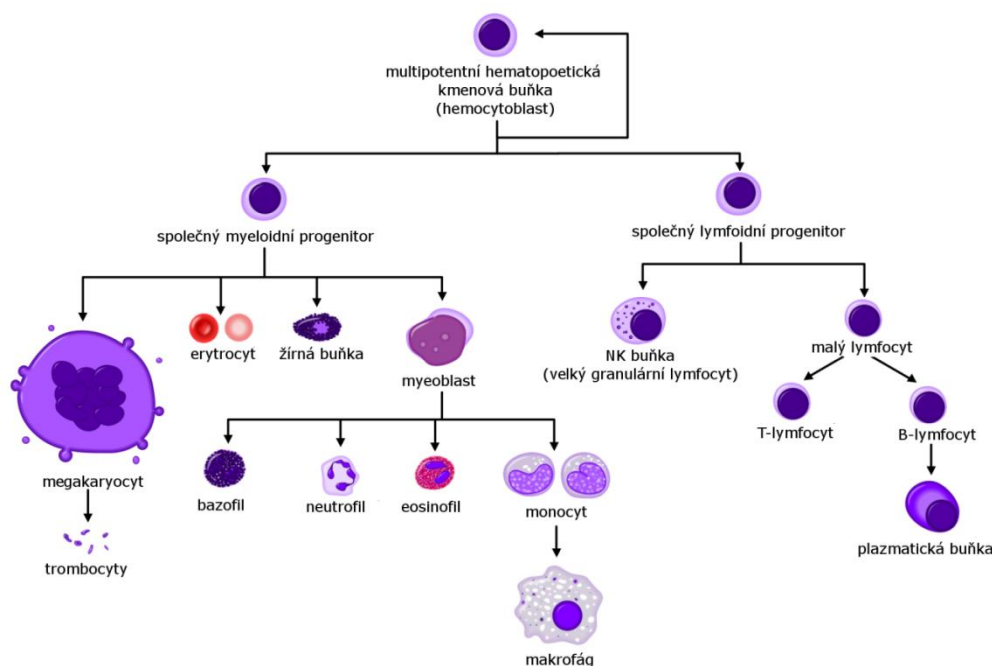
1 Erytropoéza

1.1 Hematopoéza

Hematopoéza - krvetvorba je proces, který zajišťuje tvorbu zralých krevních elementů cirkulujících v periferní krvi.

U zdravého dospělého člověka probíhá hematopoéza v kostní dřeni. Jejím základem jsou multipotentní hematopoetické kmenové buňky (HSC), které se vyvíjejí podobně jako ostatní typy kmenových buněk z konstantního „poolu“ pluripotentních embryonálních kmenových buněk. HSC jsou převážně v klidovém stavu, dělí se minimálně a mají schopnost sebeobnovy. Proto se zachovává jejich ustálený počet. Dávají vznik devíti různým buněčným liniím: erytrocytům, trombocytům, neutrofilům, eozinofilům, monocytům, T a B lymfocytům, NK buňkám a dendritickým buňkám (obr. 1). Diferenciací HSC vzniká další generace buněk: buňky progenitorové. Vlivem specifických růstových faktorů vznikají z progenitorových buněk unipotentní buňky prekursorové, které jsou již zcela specifické pro jednotlivé buněčné linie.

Obrázek č. 1 Hematopoéza



Kostní dřeň je schopna během jedné hodiny v klidovém stavu vyprodukovat 10^{10} erytrocytů a 10^8 až 10^9 leukocytů [1]. Tento vysoký počet buněk odráží vysoké nároky lidského organismu na dodávku kyslíku jednotlivým tkáním a orgánům a zachování integrity imunitního systému. Normální krvetvorba vyžaduje podpůrnou tkáň, tzv. stroma kostní dřeně, které obsahuje buňky extracelulární matrix a růstové faktory (RF). Tyto jsou produkované fibroblasty a endoteliemi a řídí především tvorbu krvetvorných kmenových buněk v kostní dřeni a proliferaci progenitorových buněk jednotlivých vývojových řad. Součástí hematopoetického prostředí jsou také cytokiny produkované leukocyty a makrofágy. Regulují viabilitu, růst a diferenciaci buněk jednotlivých vývojových řad.

1.2 Vývoj erytrocytů

V prvních několika týdnech embryonálního vývoje se jaderné červené krvinky tvoří extraembryonálně v mezodermu krevních ostrůvků žloutkového váčku, které se diferencují z hemangioblastu, což je společná kmenová buňka hematopoetických a endoteliálních buněk. Mezi 16. a 35. dnem se dále nezávisle na žloutkovém váčku tvoří kmenové buňky i intraembryonálně, a to v mezodermu dorzální části aorty. Erytropoéza je první buněčná linie hematopoézy diferencující se již v průběhu embryonálního vývoje. Během druhého trimestru gestace se přesunuje produkce erytrocytů převážně do jater a částečně také do sleziny a lymfatických uzlin. Počátkem třetího trimestru se začínají objevovat první okrsky erytropoézy v kostní dřeni. V posledním měsíci gestace a po porodu se již erytropoéza odehrává výhradně v kostní dřeni. Přibližně do věku 5 let všechny dlouhé a ploché kosti lidského těla jsou schopné produkovat erytrocyty. Kostní dřeň dlouhých kostí s výjimkou proximální části humeru a tibie postupně tukově degeneruje a od 20 let věku zde erytropoéza již zcela ustává. U dospělého jedince je produkce erytrocytů lokalizovaná do žeber, těl obratlů, hrudní kosti a ilické kosti.

Erytropoéza je velmi přísně regulovaný děj, při kterém vzniká v kostní dřeni přibližně 2×10^{11} erytrocytů za den, což umožňuje udržování fyziologických hladin hemoglobinu ve velmi malém rozmezí. Produkce erytrocytů může být za určitých podmínek kompenzačně zvýšena, a to šet až desetkrát. Dochází k tomu zejména při akutních krevních ztrátách nebo hemolýze. Proces erytropoézy začíná diferenciací části stabilního poolu pluripotentních kmenových buněk k nejprimitivnějším erytroidním progenitorovým buňkám. Ty se postupně vyvíjejí do morfologicky definovaných erytroidních prekurzorů, které postupně vyzrávají v erytrocyty.

Na lokalizaci a uvolnění dozrávajících forem erytrocytů v ostrůvcích kostní dřeně se podílejí adhezivní receptory.

Celý tento děj je regulován transkripčními faktory, které ovlivňují expresi adhezivních receptorů a receptorů hematopoetických růstových faktorů. Zatímco hematopoetické růstové faktory, jako jsou interleukin 3 (IL-3), granulocytární makrofágový kolonie stimulující faktor (GM-CSF) a růstový faktor kmenových buněk (SCF) ovlivňují nárůst počtu progenitorových buněk, nejdůležitějším růstovým faktorem zodpovědným za konečnou diferenciaci a zvýšení počtu erytroidních progenitorů a prekurzorů je erythropoetin (EPO).

Linie erytroidních progenitorových buněk vzniká vývojem z bipotentních nebo multipotentních progenitorů [1]. Buňkami nejčasnějších stádií erythropoézy jsou buňky tvořící tzv. „burst-forming units-erythroid“ (BFU-E). Název vznikl jednak podle morfologie kolonií v *in vitro* kulturách a jednak podle toho, že při přidání erythropoetinu a dalších hematopoetických růstových faktorů dochází v buňkách vzniklých během prvních buněčných dělení k diferenciaci do buněk dalšího vývojového stádia, tzv. „colony forming unit-erythroid“ (CFU-E). CFU-E se za přítomnosti EPO, během sedmi dnů, dále diferencují do prvních unipotentních prekurzorových buněk: erytroblastů.

Erytroidní prekurzory u dospělého a dítěte staršího tří let tvoří asi třetinu buněk kostní dřeně. Při vývoji do stádia zralého erytrocytu dochází k řadě za sebou následujících mitotických dělení [2-4]. Vyznačuje se zmenšováním buněk i jádra, které nakonec nabývá pyknotického vzhledu a je vyloučeno z buňky. Díky pokračující syntéze hemoglobinu postupně vzrůstá eozinofilie cytoplazmy. První morfologicky jasně definovatelnou buňkou erytroidní řady je proerytroblast (pronormoblast). Jedná se o velkou nezralou buňku, jejíž cytoplazma je pro vysoký obsah polyzomů bazofilní. Následuje bazofilní erytroblast (normoblast), menší buňka se stále bazofilní cytoplazmou, ve které se nacházejí první stopy hemoglobinu. Dalším vývojovým stádiem je polychromatofilní erytroblast, u kterého se stupňuje tvorba hemoglobinu na polyribosomech a cytoplazma ztrácí bazofilii. Při dalším vyzářování je vytvořen ortochromní normoblast, který se již dále nedělí. Normoblast je přeměněn v retikulocyt po enukleaci jádra. Plně zralou buňkou je bezjaderný erytrocyt (normocyt) bikonkávního tvaru, ve kterém nejsou přítomny organely a jehož hlavní součástí je hemoglobin.

Za fyziologických podmínek je každý proerytroblast v průběhu pěti dnů schopen vytvořit osm retikulocytů. Tento časový úsek může být výrazně kratší (2-3 dny), a to v případě, kdy dojde k akutnímu vzniku anémie. V tomto případě je vynecháno až několik dělení a vyzářování je tak výrazně urychleno. Vznikající erytrocyty jsou makrocytární, na svém povrchu mohou nést

antigeny, které následně zkracují jejich přežívání, nebo mohou chybět jiné známky zralosti buněk. Tento typ erytropoézy je obvykle spojen s charakteristickým nálezem cirkulujících Pappenheimerových tělísek (granula železa), bazofilního tečkování (ribozomy), Heinzových tělísek (hemoglobinové inkluze) a Howellových-Jollyových tělísek (zbytky jádra).

1.3 Transkripční faktory

Transkripční faktory hrají důležitou roli při diferenciaci jednotlivých linií krevních elementů. Mezi nejdůležitější transkripční faktory patří zejména Tal-1/SCL a GATA2 působící s největší pravděpodobností již na úrovni hematopoetických kmenových buněk, a GATA1, FOG-1 a EKLF, které jsou specifické již pouze pro erytropoézu. Tal-1/SCL hraje zásadní roli v embryonální i postnatální krvevorbě. U obratlovců je rovněž důležitý pro cévní remodelaci u embrya [5]. Je exprimován na primitivních hematopoetických prekurzorech a zralejších formách erytroidních, megakaryocytárních a endoteliálních buněk [6,7]. Cílené umlčení tohoto genu u myši vede k úmrtí plodu v důsledku nedostatečné krvevorbě. Tento nález, spolu s *in vitro* snížením tvorby CFU-M [8,9,10] svědčí pro roli Tal-1/SCL nejspíše již na úrovni pluripotentních nebo myeloidních-erytroidních kmenových buněk. Zvýšená exprese tohoto faktoru v erytroidních nebo bipotentních buněčných liniích vede ke zvýšení erytroidní diferenciace [11]. Nejsou známy žádné údaje o zvýšené expresi v hematopoetických kmenových buňkách.

GATA-2 transkripční faktor se v zárodcích zebřiček (*Danio rerio*) nachází převážně v oblastech, které jsou předurčeny pro krvevorbě, a také je hojně exprimován v progenitorových buňkách [12,13,14]. Cílené umlčení GATA-2 genu vede ke snížení primitivní krvevorbě v žloutkovém váčku a následné smrti embrya v 10. až 11. dni [15]. Definitivní krvevorbě v játrech a kostní dřeni je také výrazně snížena. Údaje o *in vitro* diferenciaci ukazují na výrazné snížení kolonií erytroidních a žírných buněk a na nižší počet kolonií makrofágů. Tyto nálezy nasvědčují tomu, že GATA-2 slouží jako regulátor genů řídících reaktivitu hematopoetických růstových faktorů nebo proliferaci kmenových a/nebo mladých progenitorových buněk. Nálezy výrazně snížené exprese GATA-2 mRNA v CD34+ buňkách u pacientů s aplastickou anémií podporují domněnku, že aberantní exprese tohoto transkripčního faktoru může hrát roli při rozvoji tohoto onemocnění [16].

Expres GATA-1 transkripčního faktoru je omezena na multipotentní progenitorové buňky a erytroidní, megakaryocytární, žírné a eozinofilní linie [17-20]. Analýza chimérických myši,

kterým byly ve fázi blastocysty aplikovány GATA-1^{-/-} embryonální kmenové buňky, prokázala selhání těchto buněk při dalším vývoji ke zralým erytrocytům, přičemž role těchto buněk při vyzrávání ostatních hematopoetických linií a tkání zůstala zachována [21,22]. *In vitro* diferenciační testy u těchto buněk prokázaly zástavu diferenciaci proerytoblastů a jejich apoptózu [23-25]. Při nepřítomnosti GATA-1 transkripčního faktoru u myšího plodu dochází k jeho úmrtí. Příčinou je těžká anémie vyvíjející se kvůli zástavě zrání primitivních erytroidních buněk. Ztráta GATA-1 u dospělých myší vede ke stavu, který připomíná aplastickou krizi erythropoézy u člověka [26]. Konstitutivní mutace GATA-1, která zasahuje do interakce s jeho základním kofaktorem FOG-1 (*friend of GATA-1*), je spojena s familiární dyserythropoetickou anémií, poruchou megakaryocytárního zrání a makrotrombocytopenií [27]. U dětí s Downovým syndromem (DS) s tranzientním myeloproliferativním onemocněním (TMD) nebo s akutní megakaryoblastickou leukémií (AMKL) byla popsána získaná mutace v 5' oblasti GATA-1. Vzniká tak GATA-1 protein, který je zkrácený na jeho N-konci [28,29]. Tato mutace je téměř vždy přítomna při narození, je tedy získaná již *in utero*. Literatura udává, že tato mutace byla v novorozeneckém věku nalezena přibližně u 10 % dětí s DS, ne u všech však došlo k rozvoji TMD nebo AMKL [30].

1.4 Růstové faktory

Regulace proliferace a zrání erytroidních kmenových buněk závisí na interakci řady růstových faktorů. Jedním z nejdůležitějších je erythropoetin (EPO). Jedná se o růstový faktor produkovaný v ledvinách, který je nezbytný pro závěrečné vyzrávání erytroidních buněk. Jeho hlavní funkce je na úrovni CFU-E, protože při jeho chybění *in vitro* tyto buňky nepřežijí. Vzhledem k tomu, že většina CFU-E je cyklující, jejich přežívání v přítomnosti EPO může být úzce spojeno s jejich proliferací a diferenciací do stádia zralých erytrocytů. EPO také působí na zralé BFU-E, které jej potřebují pro přežití a terminální zrání. Časnější vývojová stádia BFU-E však dokáží přežít i po odnětí EPO, pokud jsou přítomny jiné hematopoetické růstové faktory, jako je IL-3 nebo GM-CSF [31]. EPO je zásadní růstový faktor pro finální diferenciaci erytroidních progenitorových buněk. Po vazbě na jeho receptor (EPOR) reguluje cestou aktivace JAK2-STAT5 a MAPK-NF-κB signální dráhy exprese erytroidně-specifických genů. U myší s homozygotní mutací genu pro EPO nebo jeho receptor (EPOR) jsou BFU-E a CFU-E tvořeny normálně, ale nediferencují do zralých erytrocytů [32]. Jak EPO^{-/-} tak EPOR^{-/-} myší embrya zmírají v důsledku poruchy finální erythropoézy.

Erytropoéza vycházející ze žloutkového vřáku je jen částečně narušena, což naznačuje možnost existence populace na EPO nezávislých primárních erythropoetických prekursorů.

Růstový faktor pro kmenové buňky (SCF) nemá schopnost samostatně stimulovat tvorbu erytroidních kolonií, ale byl u něj popsán synergický vliv na růst BFU-E kultivovaných v přítomnosti EPO [33-36]. SCF hraje zásadní roli při normálním vývoji CFU-E. Myši, kterým chybí SCF nebo jeho receptor c-kit, jsou těžce anemické a mají snížený počet CFU-E ve fetální tkáni jater [37].

Studie na buněčných liniích obsahujících receptor pro SCF a EPO (c-Kit a EPOR), a/nebo transfekovanou cDNA pro tyto dva receptory prokázaly, že SCF podporuje proliferaci těchto buněk pouze v přítomnosti EPOR [38].

Dalšími růstovými faktory uplatňujícími se v procesu erytropoézy jsou IL-3 a GM-CSF. Jejich receptory mají společné beta řetězce s EPOR. Oba cytokiny podporují *in vitro* erytropoézu závislou na erythropoetinu tím, že ovlivňují primární hematopoetické kmenové buňky. Sdílení beta řetězců vysvětluje synergické účinky IL-3 a GM-CSF na EPO-řízenou erytropoézu [39].

Inzulín a inzulínu podobný růstový faktor I (IGF-1) patří mezi další faktory, které mohou pozitivně regulovat produkci erytrocytů, a to buď přímo, nebo nepřímo. Studie vysoce purifikovaných CFU-E v kulturách bez séra ukazují, že inzulín a IGF-1 působí přímo na tyto buňky v přítomnosti EPO [40].

Synergické účinky na růst BFU-E jsou popisovány u aktivinu a hepatocytárního růstového faktoru (HGF-1) [41,42]. Erytropoéza je ovlivňována rovněž některými hormony (kortikosteroidy, tyroxin, testosteron, estrogen, somatotropní hormon).

1.5 Funkce erytrocytů

Hlavní funkcí erytrocytů je transport hemoglobinu, který přenáší kyslík z plic do tkání. V lidském organismu je hemoglobin vázán uvnitř erytrocytů. V erytrocytech se nachází katalytický enzym karboanhydráza, která katalyzuje reverzibilní reakci mezi CO₂ a H₂O za vzniku bikarbonátu a zvyšuje rychlost této reakce až tisíckrát. Tato reakce umožňuje transportovat velké množství CO₂ z tkání do plic ve formě bikarbonátu. Hemoglobin je také jedním z pufrůvácích systémů, proto se erytrocyty z velké části podílejí na udržování acidobazické rovnováhy v krvi.

1.6 Vliv stresu na erythropoézu

Množství oxyhemoglobinu a tím míra dodávky kyslíku do tkání jsou základními regulátory erythropoézy [43]. Erythropoetin má za úkol zprostředkovávat požadavky organismu na potřebu kyslíku. Tuto funkci plní díky interakci se specifickými receptory, které se nacházejí na povrchu erytroidních progenitorových buněk a erytroblastů [44-48]. Při hypoxii dojde ke zvýšení transkripce genu pro EPO prostřednictvím HIF-1a a HIF-1b [49,50].

In vivo za normální situace nedochází k vývoji erytroblastů z BFU-E. Ten je však umožněn při extrémním anemickém stresu. BFU-E dozrávají do jedné CFU-E, která se dokáže dále dělit a vlivem nižších koncentrací erythropoetinu, tvoří poměrně malé kolonie proerytroblastů. Díky anemickému stresu nedochází k téměř žádnému nebo jen velmi malému nárůstu mitotického dělení erytroidních prekurzorů [51].

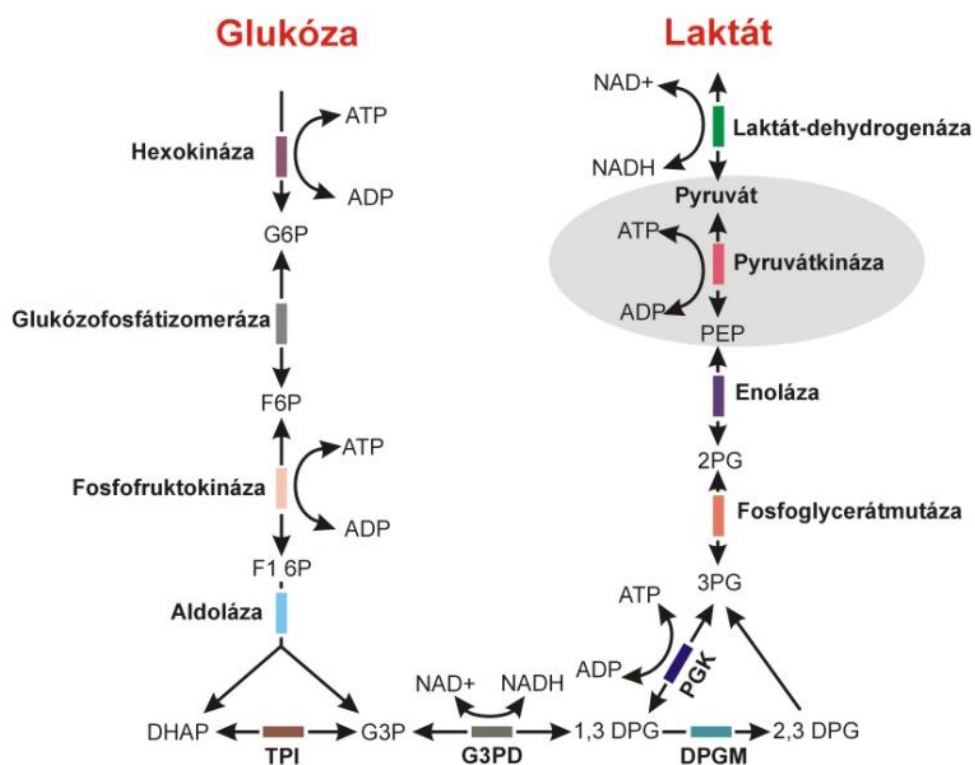
Místo toho se objevují následující změny:

- pozdní BFU-E a CFU-E díky vazbě EPO na jeho receptor proliferují a diferencují se na proerytroblasty.
- správný průběh vývoje od nezralých BFU-E přes CFU-E a na proerytroblasty je přerušeno. Vysoké hladiny EPO umožňují, nebo samy indukují, diferenciaci nezralých progenitorů na proerytroblasty. Lidské progenitory mají jen malou schopnost produkovat erytroblasty, které jsou schopné syntetizovat velké množství fetálního hemoglobinu [52]. Při erytroidním stresu jsou erytrocyty obvykle makrocytární a nesou na svém povrchu *i* antigen. Tyto dvě vlastnosti vznikají spíše díky krátké době vyplavení buněk z kostní dřeně jako reakce na EPO, než ze samotné charakteristiky buněk obsahujících fetální hemoglobin.

1.7 Energetický metabolismus erytrocytu

Erytrocyty nepodléhají oxidativní fosforylaci a neukládají glykogen. Musí tedy k získání energie neustále odbourávat glukózu z krevního řečiště přes Embden-Meyerhofův cyklus a hexóza monofosfátový zkrat. Uvnitř erytrocytu je glukóza za pomoci sorbitolu přeměněna na glukózo-6-fosfát (G6P) nebo na fruktózu. G6P může být zpracována jednou ze tří cest: 1. většina (90 %) vstupuje do Embdenova-Meyerhofova cyklu, kde je přeměněn na laktát, pyruvát a ATP; 2. část (5 až 10 %) vstupuje do hexóza-monofosfátového zkratu, kde je přeměněna na redukováné meziprodukty, které také následně mohou vstoupit do Embdenova-Meyerhofova cyklu; 3. nepatrný zlomek G6P (<1 %) je převeden na glukózo-1-fosfát a poté na glykogen (obr. 2).

Obrázek č. 2 Schéma glykolytické dráhy



Zdroj: internetový vyhledavač – www.google.com- images, Staženo: 23.11.2011
<http://rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb/mb1/part2/glycolysis.htm>

1.7.1 Embdenův- Meyerhofův cyklus

Embdenův-Meyerhofův cyklus je hlavním zdrojem ATP, 2,3-difosfoglycerátu (2,3-DPG) a redukované formy nikotinamidadeninukleotidu (NADH) v erytrocytu. Většina energie je v erytrocytech vytvořena právě přes tento cyklus a následně uložena ve formě ATP nebo glutationu, či pyridinových nukleotidů (NADH a NADPH). Touto cestou se metabolizuje asi 90 % z erytrocytární glukózy. Katabolismem 1 molu glukózy jsou získány 2 moly ATP a 2 moly laktátu. Získání pouze 2 molů ATP z 1 molu glukózy se může zdát nepodstatné ve srovnání s Krebsovým cyklem, kdy 1 mol glukózy je schopen vytvořit 38 molů ATP. Nicméně, tato produkce ATP je dostatečná k obnovení 150 až 200 % erytrocytárního ATP za hodinu.

Embdenův-Meyerhofův cyklus je také hlavním zdrojem NADH, kofaktorem nezbytným pro NADH methemoglobin reduktázu, která udržuje železo v hemu v redukovaném stavu. Bez této reakce by došlo k oxidaci hemového železa na methemoglobin.

Rapoportův-Lueberingův zkrat v Embdenově-Meyerhofově cyklu produkuje 2,3-DPG, sloučeninu, která se nachází ve vysokých koncentracích v erytrocytech. 2,3-DPG se reverzibilně váže s větší afinitou na tetramery deoxyhemoglobinu než na oxyhemoglobin. Touto vazbou na deoxyhemoglobin reguluje uvolnění zbývajícího kyslíku vázaného na hemoglobinu a zvyšuje schopnost erytrocytů uvolnit kyslík ve tkáních, které ho nejvíce potřebují.

1.7.2 Hexózo-monofosfátový zkrat (Pentósový cyklus)

V hexózo-monofosfátovém zkratu (HMP) podléhá G6P oxidaci, po které následuje řada reakcí, díky kterým vzniká fruktózo-6-fosfát a glyceraldehyd-3-fosfát, meziproducty v glykolytické dráze. HMP je primárním zdrojem erytrocytární NADPH, kdy 2 moly NADPH vzniknou při zmetabolizování 1 molu glukózy.

2 Diamondova-Blackfanova anémie

2.1 Definice

Diamondova-Blackfanova anémie (DBA) je vzácná vrozená porucha erythropoézy, která je řazena do skupiny syndromů selhání kostní dřeně. Incidence je udávána v rozmezí 5-7 na milion živě narozených dětí. Bývá obvykle diagnostikována již v raném kojeneckém věku, u 95 % pacientů je diagnóza stanovena mezi 3 měsíci až 2 roky věku [53-55]. DBA je charakterizována makrocytární anémií s nízkým počtem retikulocytů a erytoblastopenií v jinak normocelulární kostní dřeni. Počet trombocytů a leukocytů je obvykle normální, ale v době stanovování diagnózy se může objevit trombocytóza a/nebo neutropenie [55]. Zvýšené hladiny fetálního hemoglobinu a přítomnost *i* antigenu jsou známkami perzistující fetální erythropoézy. Asi u 90 % pacientů s DBA, kteří nejsou závislí na transfúzní terapii, je popsáno zvýšení erytrocytární adenosindeaminázy (eADA) [56,57].

2.2 Etiologie a dědičnost

I přes rozsáhlý výzkum v oblasti etiologie DBA se v průběhu dlouhých 60 let od prvního popisu onemocnění nepodařilo odhalit její etiologii. Byly vyloučeny mutace genů pro růstové faktory a jejich receptory i genů kódujících transkripční faktory. Teprve v roce 1999 byla u sedmileté švédské pacientky s DBA popsána reciproká translokace t (X;19) (p21;q13). Ve zlomovém místě byla nalezena mutace genu pro ribozomální protein (RP) S19 [58]. Později byly mutace genu pro RPS19 prokázány u 25 % nemocných s DBA [59-63]. U 30-60 % pacientů s DBA byly následně nalezeny heterozygotní mutace v dalších RP. Je velmi pravděpodobné, že homozygotní mutace nejsou slučitelné se životem [61,63].

V genu RPS19 byly pospány mutace ve všech jeho šesti exonech, a to prakticky všechny typy mutací (mutace měnící smysl, nesmyslené mutace, delece, inserce, sestříhové mutace). Udává se, že nejčastěji se mutace nacházejí mezi kodony 52 až 62 [83]. RPS19 je jedním z 80 ribozomálních proteinů a je součástí malé ribozomální podjednotky 40S. Gen RPS19 obsahuje 11 Kb a jedná se o vysoce konzervovaný gen. Má dva promotory, šest exonů, kóduje protein o 144 aminokyselinách.

Během posledních 10-ti let byly u pacientů s DBA popsány mutace genů pro další ribozomální proteiny: RPS7 (<1%), RPS10 (2,6%), RPS17 (<1%), RPS24 (2,4%), RPS26 (6,4

%), RPL5 (6,6 %), RPL11 (4,8 %), RPL15 (<1 %), RPL26 (1 %) a RPL35a (3%) [64-68]. Jednonukleotidové polymorfizmy (SNP) byly nalezeny v genu kódujícím protein RPL3 a RPL23a, jejich funkční význam však dosud nebyl prokázán.

Ribozomální proteiny, jejichž mutace byly popsány u DBA, jsou součástí jak malé, tak velké ribozomální podjednotky. Doposud nebyl popsán pacient, u kterého by byla prokázána mutace ve více než jednom genu ribozomálního proteinu [66]. Pouze v jednom případě byla u pacienta s mutací RPL5 genu nalezena další přidružená mutace genu RPS24 jejíž funkční význam zatím nebyl stanoven [69]. U pacientů s mutací genu pro RPS19 nebyly popsány žádné typické přídatné anomálie, pouze nespecifické kraniofaciální dysmorfie. Naopak je například známá souvislost mezi nálezem mutací genu pro RPL5 a rozštěpem patra. Bylo rovněž prokázáno, že žádný z pacientů s rozštěpem patra nemá mutaci genu pro RPS19 [65,69,70]. Byly publikovány práce o častějším průkazu anomálií palce ruky u pacientů s výskytem mutace genu pro RPL 5 a 11 [69].

U více než 30-40 % pacientů s DBA nebyla doposud prokázána kauzální mutace. Předpokládá se tedy, že roli v patogenezi onemocnění mohou hrát geny kódující jiné proteiny, které jsou zapojeny do biogeneze ribozomů. Velké diskuze vzbudila identifikace mutace genu kódujícího transkripční hematopoetický faktor GATA1 u dvou pacientů s DBA, u kterých nebyla prokázána žádná známá mutace genů pro ribozomální proteiny. Tento nález poukazuje na fakt, že porucha erythropoézy spojená s DBA může vzniknout i z jiných příčin [71].

DBA jako hereditární aplazie červené řady vykazuje v rodinách s familiárním výskytem onemocnění autozomálně dominantní typ dědičnosti (asi 45 % pacientů). V ostatních případech s výskytem jediného případu v rodině jde pravděpodobně o nově vzniklé mutace (55 % pacientů).

Nález mutací ribozomálních proteinů jako kauzální příčiny vzniku DBA byl jedním z nejprekvapivějších objevů v oblasti hematologie po roce 2000. DBA tak dala vznik nové skupině onemocnění dnes nazývaných ribozomopatie.

2.3 Ribozomopatie

V minulém desetiletí byly identifikovány genetické léze způsobující ribozomální dysfunkce u dalších vrozených i získaných onemocnění. Tyto objevy byly podkladem vzniku nové kategorie onemocnění nazvaných ribozomopatie, u které hlavní patofyziologie souvisí různým způsobem s poruchou funkce ribozomů.

U 40-60 % pacientů s DBA byla identifikována kauzální mutace genu kódujících RP [72]. Kromě ojedinělého nálezu mutací genu kódujícího GATA-1 protein nebyly zatím u pacientů s DBA dosud popsány další genové změny, které by mohly vysvětlit erytroidní fenotyp onemocnění. Detekce mutací genů pro RP proto svědčí pro příčinnou souvislost mezi defektem ribozomální biogeneze a poruchou erytropoézy a dokonce i vznikem přídatných anomálií. Spojení mezi ribozomální dysfunkcí a postižením erytropoézy bylo dále podpořeno identifikací genu pro RPS14 jako kandidátního genu způsobujícího makrocytární anémii u 5q-syndromu, podtypu myelodysplastického syndromu (MDS) [73]. Heterozygotní delece chromozomu 5q u MDS je rozsáhlá a zahrnuje celou řadu genů, jejichž haploinsuficience různým způsobem přispívá k patogenezi onemocnění [74]. *In vitro* a *in vivo* studie však podporují domněnku, že těžká makrocytární anémie, která je součástí fenotypu 5q-syndromu a která je velmi podobná Diamondově-Blackfanově anémii, je způsobena právě haploinsuficiencí genu RPS14 [73,75].

2.3.1 Modely ribozomální haploinsuficience

Pro studium DBA byly vyvinuty *in vitro* a *in vivo* modely ribozomálních haploinsuficiencí. V *in vitro* modelu bylo pomocí RNA interference provedeno umlčení genu RPS19, které v normální lidské hematopoetické progenitorové buňce vede k závažnému postižení proliferace a diferenciace erytroidních buněk [76,77]. Bylo prokázáno, že tento defekt v hematopoéze lze upravit zvýšením exprese RPS19. Podobně exprese cDNA genu RPS19 v buňkách kostní dřeně pacientů s DBA výrazně zlepšuje úpravu deficitní erytropoézy [78]. Stejným způsobem byly v pokusech k namodelování ribozomální dysfunkce využity zebřičky. Pomocí morfolin (syntetických molekul, které jsou produktem „redesignu“ přírodní nukleové kyseliny) bylo zjištěno, že u zebřiček s nedostatkem genu RPS19 se rozvíjí hematologické a vývojové abnormality, které se podobají DBA [79,80]. Je nutné si uvědomit, že je málo pravděpodobné, že geny kódující ribozomální proteiny jsou umlčeny přesně na 50 %. Není tedy známo, zda fenotyp DBA a del(5q) jsou ovlivněny přesně specifikovanou úrovní ribozomální aktivity. Myší modely jsou pro simulování ribozomální haploinsuficience výhodnější a v současné době bylo vyvinuto již několik modelů. Původní myší homozygotní RPS19 „knockout model“ nebyl slučitelný s životem a v heterozygotním stavu překvapivě neměl fenotyp DBA. U heterozygotních myší se dokonce časem normalizovala hladina RPS19 [81]. Myší s heterozygotní mutací měnící smysl v RPS19 a RPS20 mají jen mírnou makrocytární anémii.

Tyto mutace mohou spíše způsobit hypofunkční alely než kompletní ztrátu funkce alely [82]. Chronický nedostatek RPS19 způsobený interferencí RNA vede v myším modelu k vývoji anomálií skeletu. Potenciálně velmi užitečný model ribozomální haploinsuficience je myší model s podmíněnou delecí genu RPS6. Tyto myši mají významnou makrocytární anémii s retikulocytopenií i zvýšenou hladinu adenozyndeaminázy [83].

2.3.2 Ribozomální dysfunkce u DBA

Eukaryotický ribozom je složen z 40S a 60S podjednotky, které spojením vytvoří translačně aktivní 80S ribozom. Podjednotka 40S obsahuje 18S rRNA a 60S podjednotka obsahuje 28S, 5.8S a 5S rRNA. U eukaryont dochází k tvorbě ribozomální RNA a ribozomálních proteinů za spoluúčasti proteinů a nukleolární RNA v jadérku, kde vznikají pre-60S a pre-40S ribozomální částice. Tyto částice jsou exportovány do cytoplazmy, kde probíhá vyzrání a finalizace sestavování ribozomů. Ribozomální proteiny vznikající na podkladě transkripce prekurzorové rRNA usnadňují řadu endonukleolytických a exonukleolytických štěpení potřebných pro produkci vyzrálé rRNA.

Haploinsuficience jednotlivých ribozomálních proteinů byly spojeny s defekty v různých krocích zpracování pre-rRNA. Mutace v genech RPS19 a RPS24, prvních dvou mutacích zjištěných u DBA, narušují pre-rRNA zpracování 18S rRNA, což vede ke snížené produkci 40S ribozomální podjednotky [84,85]. Delece genu RPS14 blokuje zpracování 18S rRNA a blokuje produkci ribozomální podjednotky 40S [73]. Existují důkazy, že nedostatek jakýchkoli ribozomálních proteinů způsobuje redukci množství volných 40s podjednotek a významné snížení množství vyzrálých 80S ribozomů. Naopak, pokud jsou vyčerpány RPL proteiny včetně RPL35A, jehož mutace byly popsány u DBA, je snížené množství 60S podjednotek i množství 80S ribozomů [86].

Mutace genů kódujících různé ribozomální proteiny ve svém výsledku vedou k poklesu počtu vyzrálých ribozomů, což má četné následky pro buňku. Zahrnují i poruchy translace specifických proteinů, jejichž deficit by mohl logicky mít rozhodující roli v erythropoéze. Navíc několik ribozomálních proteinů má i extraribozomální funkce, k nimž patří replikace a opravy DNA. Mutace genů pro ribozomální proteiny se tedy mohou projevit i nezávisle na procesu translace proteinů [87,88].

2.3.3 Aktivace p53 při ribozomální dysfunkci

Mutace genů pro ribozomální proteiny by se měly projevit vlivem na celý organizmus. Poruchy ribozomální funkce však pravděpodobně způsobují u DBA jen určité tkáňově specifické změny se zvláště významným vlivem na erytroidní buňky. Základní otázkou je, proč jsou projevy fenotypu takto specifické. Bylo vyvinuto množství *in vitro* a *in vivo* modelů ribozomální haploinsuficience, které pomohly potvrdit její roli v poruchách erytropoézy. Stále je diskutována úloha p53 proteinu v tomto procesu. P53 protein označovaný často jako „strážce genomu“ má v organismu řadu velmi důležitých funkcí. Hraje významnou roli v karcinogenezi. Pokud p53 gen neplní svou funkci, snižuje se v organismu schopnost potlačení vzniku nádorů. Příkladem dysfunkce p53 proteinu je například Li-Fraumeniho syndrom. P53 také dohlíží na ribozomální funkci a je důležitý při translaci proteinů [89,90].

Myší „double minute 2 protein“ (MDM2, nebo HDM2 u lidí) je centrálním regulátorem p53 proteinu. Působí jako ubikvitin ligáza, která vede k degradaci p53 proteinu [91]. MDM2 také specificky váže některé volné ribozomální proteiny, jako jsou RPL5, RPL23, RPL11, RPS7 a RPL26 [92-98]. Nukleolární disrupce v erythrocytech vyvolávané působením actinomycinu vedou k uvolnění RPL11 a dalších ribozomálních proteinů do nukleoplazmy a vazbě RPL11 k MDM2. Činnost MDM2 je tímto inhibována, což vede k následné akumulaci p53 [95].

Bylo potvrzeno, že snížená exprese genů RPS14 nebo RPS19 způsobí selektivní aktivaci p53 dráhy u erytroidních progenitorových buněk ve srovnání s buňkami z jiných hematopoetických linií. Tato aktivace p53 dráhy způsobí zástavu buněčného cyklu a apoptózu erytroidních buněk. Snížení exprese RPS14 zvýšilo hladinu RPL11, která se váže k HDM2, což vede k aktivaci p53. Dále bylo prokázáno hromadění jaderného p53 v erytroidních progenitorových buňkách kostní dřeně pacientů s DBA a del (5q) MDS [99].

Při použití morfolinů zacílených na gen RPS19 u zebřiček dochází ke hromadění p53 proteinu a pozastavení erytropoézy [79]. V myším modelu s heterozygotní mutací měnící smysl v genu RPS19 byla identifikována indukce p53 a cílových genů p53 v hyperpigmentovaných polštářcích myších nohou [82]. Pokud myší mutant RPS19 měl jednu alelu p53 geneticky inaktivovanou, došlo k nárůstu počtu červených krvinek a snížení MCV. Homozygotní inaktivace p53 u RPS19 mutantních myší zcela upravila jejich hematologický fenotyp [82]. U myšího modelu s podmíněnou delecí skupiny genů v oblasti 5q, která zahrnuje i gen pro RPS14, se rozvíjí těžká makrocytární anémie [75]. Když byly tyto myši zkrížené s myší p53^{-/-}, erytroidní fenotyp byl plně upraven [75].

2.3.4 Další ribozomopatie

Poruchy ribozomální funkce byly postupně prokázány i u dalších onemocnění jako je syndrom Treacherův-Collinsův, Cartilage hair hypoplasia, Dyskeratosis congenita a Shwachmanův-Diamondův syndrom.

Myší model Treachera-Collinsova syndromu poskytl možnost ovlivnění některých rysů onemocnění prostřednictvím modulace dráhy p53 [100]. Treacherův-Collinsův syndrom je autozomálně dominantní onemocnění zahrnující charakteristické kraniofaciální deformity, které vznikají z oboustranně symetricky zpomaleného růstu struktur vycházejících z prvního a druhého faryngeálního oblouku, rýhy a váčku [101,102]. Gen TCOF1 identifikovaný jako gen odpovědný za Treacherův-Collinsův syndrom kóduje protein známý jako Treacle [103]. U myší doprovází haploinsuficienci genu TCOF1 snížená produkce ribozomů, přičemž tento deficit koreluje se sníženou proliferací jak neuroektodermu tak i buněk neurální lišty [104]. Bylo prokázáno, že chemická a genetická inhibice aktivity p53 u těchto myší může zabránit vzniku kraniofaciálních anomálií [100].

2.4 Klinické příznaky

Prvními klinickými příznaky DBA jsou bledost, dušnost, u kojenců je často popisováno neprospívání. U 30-50 % pacientů s DBA jsou přítomny vrozené anomálie [55,105,106]. Postihují převážně oblast lbi a obličeje (kraniofaciální dysmorfie, mikrocefalie, rozštěp patra, hypertelorismus a gotické patro). K dalším anomáliím patří vývojové vady palce, horní končetiny (tříčlankový palec, duplikace palce nebo hypoplazie palce či rádia), srdce, ledvin, urogenitálního traktu a kostí.

U 30-50 % pacientů může být pozorován malý vzrůst. Na růstové retardaci u starších pacientů se může podílet dlouhodobá léčba kortikosteroidy a přetížení organismu železem [107].

2.5 Diagnostika

Pro diagnózu DBA svědčí makrocytární anémie s retikulocytopenií při normálním počtu trombocytů a leukocytů. V době stanovování diagnózy se může objevit trombocytopenie a/nebo neutropenie, či trombocytóza. Pro diagnostiku je stěžejní vyšetření kostní dřeně, kde je klasickým nálezem nízký počet erytroidních prekurzorových buněk v jinak normocelulární kostní dřeni [55]. K dalším diagnostickým metodám patří vyšetření hladiny fetálního

hemoglobinu, který je zvýšený a také vyšetření přítomnosti *i* antigenu. U pacientů, kteří nejsou závislí na transfúzní terapii, je přínosné vyšetření erytrocytární adenosindeaminázy (eADA), jejíž hodnota je zvýšená, jde ale vždy o nespecifický nález [56,57]. Jedinou metodou, která jednoznačně potvrzuje diagnózu, je vyšetření mutací genů pro ribozomální proteiny. Dosud neexistuje žádný další specifický marker k průkazu DBA. Vzhledem k tomu byla stanovena diagnostická kritéria, která se dělí na hlavní a vedlejší a vedou ke stanovení diagnózy (tab. 1). Při diagnostice je vždy nutné vyloučit některá jiná onemocnění, o kterých lze diferenciálně diagnosticky uvažovat. Především, se jedná o: Fanconiho anémii, erytroblastopenii vzniklou po infekci Parvovirem B19, tranzitní erytroblastopenii malých dětí (TEC) a další získané erytroblastopenie [108].

Tabulka č. 1 Kritéria DBA

DIAGNOSTICKÁ KRITÉRIA
<ul style="list-style-type: none"> • Věk pod 1 rok • Makrocytární anémie bez dalších signifikantních cytopenií • Retikulocytopenie • Normální buněčnost kostní dřeně s malým počtem erytroidních prekurzorů
PODPŮRNÁ KRITÉRIA
<p>HLAVNÍ</p> <ul style="list-style-type: none"> • Genové mutace popsané u "klasické" DBA • Pozitivní rodinná anamnéza <p>VEDLEJŠÍ</p> <ul style="list-style-type: none"> • Zvýšená aktivita erytrocytární adenosindeaminázy • Vrození anomálie popsané u "klasické" DBA • Elevace HbF • Nepřítomnost jiného vrozeného syndromu selhání kostní dřeně

2.6 Léčba

U většiny pacientů s DBA je v novorozeneckém nebo kojeneckém věku nutné podání jedné nebo více transfúzí erytrocytů. 60-80 % pacientů s DBA iniciálně odpoví příznivě na terapii kortikoidy, kterou je vhodné zahájit kolem 1 roku. Doporučovaná dávka perorálně podávaných kortikosteroidů je 2 mg/kg/den prednisonu nebo jeho ekvivalentu po dobu 3 týdnů. Pokud nemocný na léčbu reaguje příznivě, je patrné zvýšení počtu retikulocytů

obvykle mezi 10. a 15. dnem podávání. Pokud tento nárůst retikulocytů nastane, měla by být denní dávka po 3. týdnu postupně snížena, a to až na hodnotu 0,5 mg/kg/ob den. Pacienti, kteří vyžadují vyšší dávky, by neměli být dlouhodobě léčeni kortikosteroidy vzhledem k riziku jejich četných nežádoucích účinků. Odpověď na kortikosteroidní terapii se u jednotlivých pacientů nedá předvídat. U části pacientů s počáteční dobrou odpovědí na steroidy se může časem vyvinout rezistence k léčbě [55]. U nemocných bez příznivé odezvy na terapii kortikoidy naopak většina hematologů doporučuje podání kortikosteroidů ještě jednou s odstupem času, zejména před zvažováním transplantace kmenových buněk. Pacienti, kteří nereagují na terapii, jsou dále dlouhodobě závislí na transfúzní léčbě. V těchto případech je nutné dbát na důslednou léčbu chelátory železa vzhledem k vysokému riziku rozvoje přetížení organismu železem, které může být příčinou mnoha orgánových komplikací a může ovlivnit přežívání pacientů. Mezi nejčastěji používané chelátory patří desferioxamin, deferiprone a deferasirox [109]. Chelatační léčba je obvykle zahajována při hladině feritinu v séru vyšší než 1000 ng/ml, a to po vyloučení zánětu. Někteří pacienti nevyžadují žádnou terapii, postačí pravidelné monitorování hodnot hemoglobinu. V těchto případech hovoříme o remisi onemocnění, která nastupuje v různém věku. Může být celoživotní, jsou však popisovány i relapsy, které vyžadují léčbu. Přejít do remise nemůže být v žádném případě považován za úplné vyléčení, u všech pacientů jsou nadále patrné poruchy erythropoézy, pro které svědčí přetrvávající mírná anémie, makrocytóza a vysoké hodnoty eADA. Jedinou kurativní léčbou je transplantace kmenových buněk (SCT).

Preferuje se SCT od shodného příbuzenského dárce nebo transplantace pupečnickové krve. U transplantací od nepříbuzenského dárce je zatím popisováno vyšší procento komplikací. V posledních letech se však vzhledem k pokrokům v myeloablativní léčbě provádí i více nepříbuzenských transplantací. SCT je jednoznačně indikovaná u pacientů s DBA, kteří mají závažné komplikace onemocnění jako je leukémie, myelodysplastický syndrom nebo rozvoj těžké pancytopenie.

V případě příbuzenských transplantací je vždy nutné důkladně vyšetřit dárce a vyloučit lehkou formu DBA, která se může projevovat pouze makrocytózou nebo zvýšením aktivity eADA i bez přítomnosti anémie. V rodinách pacientů se známým typem mutace je vždy nutné vyloučit tuto mutaci u potenciálního dárce kostní dřeně.

Velký přínos v léčbě DBA slibovala terapie metoklopramidem, induktorem prolaktinu, ale léčebné studie provedené v souboru pacientů závislých na transfúzní terapii nepřinesly uspokojivé výsledky: u méně než 10 % pacientů byla pozorována pouze dílčí odpověď na léčbu [110-112]. Vzhledem k tomu, že nežádoucí účinky tohoto léku jsou mírné nebo zcela

chybí, může být metoklopramid podáván pacientům závislým na transfúzích erytrocytů, a tím je možné se pokusit prodloužit časový interval mezi transfúzemi. U některých pacientů bylo popsáno výhodné využití nízkých dávek kortikosteroidů spolu s metoklopramidem [112].

Dalšími zkoumanými možnostmi léčby bylo podávání: IL-3, cyklosporinu, kyseliny valproové, rituximabu a v poslední době leucin [113-118]. Nadále se rovněž zkoumají možnosti genové terapie [119-121].

2.7 Vývoj onemocnění

Těžké komplikace onemocnění ve většině případů souvisí hlavně s léčbou, a to díky nežádoucím účinkům dlouhodobě užívaných kortikosteroidů nebo dlouhodobé transfúzní léčbě. Po podání 20 transfúzí je většinou nutné již zahájit chelatační léčbu. Ve výjimečných případech může dojít k přenosu infekcí dárcovskou krví (viru různých typů hepatitidy, viru HIV, prionů atd.). Během posledních dvou desetiletí je velká pozornost věnována právě nežádoucím účinkům chronické steroidní terapie a vývoji nových chelátorů pro léčbu přetížení železem u polytransfundovaných pacientů.

U pacientů s DBA je popisováno vyšší riziko rozvoje maligních onemocnění. Byl popsán výskyt solidních nádorů (osteosarkomy, tumory prsu nebo gastrointestinálního traktu), ale i hematologických maligních onemocnění (leukémie, lymfomů i myelodysplastického syndromu). Maligní onemocnění se vyskytují u 2-6 % pacientů [55,122,123].

Díky lepším terapeutickým možnostem a celkové péči o nemocné s DBA se stává aktuální otázka těhotenství pacientek s DBA, které představuje významné riziko a komplikace jak pro matku, tak i pro plod. Bylo popsáno vyšší riziko hydropsu plodu, intrauterinní růstové retardace, preeklampsie a předčasného porodu. Z výše uvedených skutečností vyplývá nutnost úzké mezioborové spolupráce při péči o těhotnou ženu s DBA a to mezi porodníky, hematology a neonatology.

3 Deficit pyruvátkinázy

3.1 Definice

Deficit pyruvátkinázy (PK) je nejčastěji se vyskytující enzymopatie systému glykolýzy, která je spojená s anémií. Uváděná incidence je 50 případů na milion u bílé rasy [124]. Dosud bylo popsáno přes 500 pacientů, z nichž většina pochází ze severní a střední Evropy. Charakteristickými rysy anémie doprovázející deficit PK je různě vyjádřený ikterus a splenomegalie. Typická je variabilita závažnosti anémie od těžké anémie manifestující se v intrauterinním období až po lehkou anémii, která může uniknout pozornosti.

3.2 Etiologie

Enzym pyruvátkináza (PK) katalyzuje přeměnu fosfoenolpyruvátu na pyruvát v Embdenově-Meyerhofově cyklu, při které vzniká jedna molekula adenosintrifosfátu (ATP). K udržení aktivity PK jsou nezbytné dva divalentní kationty, obvykle Mg^{2+} nebo Mn^{2+} , a jeden monovalentní aniont, obvykle K^+ [125].

Erytrocyty jako neplnohodnotné bezjaderné buňky neobsahující organely nejsou schopny syntetizovat bílkoviny a tuky a nemohou získávat energii oxidativní fosforylací. Jsou tedy zcela závislé na produkci energie katabolizmem glukózy - glykolýzou. Embdenův-Meyerhofův cyklus zužitkovává přibližně 90 % dostupné glukózy, z níž získává ATP jako energetický zdroj pro erytrocyty. Při metabolismu glukózy vznikají sloučeniny, které jsou schopné chránit buněčnou membránu a hemoglobin od oxidativního stresu. Během glykolýzy dále dochází ke vzniku redukované formy nikotinamidadeninukleotidu (NADH) potřebného pro přeměnu methemoglobinu na hemoglobin (Hb) a 2,3-DPG, který ovlivňuje afinitu hemoglobinu ke kyslíku. Dojde-li k poruše tvorby některého z enzymů v průběhu tohoto cyklu, obvykle se objeví chronická vrozená nebo získaná nesférocytární hemolytická anémie.

Deficit pyruvátkinázy je nejčastější enzymatickou abnormalitou Embdenova-Meyerhofova cyklu. Společně s deficitem glukózo-6-fosfátdehydrogenázy je také nejčastější příčinou vzniku nesférocytární hemolytické anémie. Projevuje se neefektivní glykolýzou, díky které je snížena životaschopnost červených krvinek. Okolnosti vedoucí k hemolýze nejsou doposud přesně známy. Předpokládá se, že nedostatek ATP ovlivní sodíko-draslíkovou adenosintrifosfatázu a

další na ATP závislé buněčné pochody, které vedou ke ztrátě draslíku a vody z buňky a zároveň ke kumulaci sodíku uvnitř buňky. Následkem je buněčný edém, podobný ischemickým změnám buňky, který způsobí rigiditu červených krvinek vedoucí k jejich hemolýze při průchodu slezinnými sinusoidami. Nahromadění mezičlánků glykolytické dráhy také může zvýšit hladinu již zmíněného 2,3-DPG. Důsledkem je pak pravostranný posun v oxidační křivce hemoglobinu, způsobující sníženou afinitu hemoglobinu ke kyslíku a jeho rychlejší vyvázání.

PK je téměř ve všech organizmech homotetramer o velikosti 200-240kDa [126], který může existovat i v jiných formách od monomeru přes dekamer [127]. Jeho struktura je u mnoha živočišných druhů obdobná. Všechny čtyři podjednotky jsou velmi podobné. Každá podjednotka je složena ze čtyř hlavních domén: A domény barelového (soudkového) typu, B domény ve formě beta skládaného listu, která je vložena mezi beta 3 vlákno a šroubovici alfa 3 A domény, a C domény charakteru alfa a beta a malé N-terminální šroubovicovité domény. Vícedoménové složení PK slouží k regulaci aktivity enzymu, jelikož může existovat v různých strukturálních stavech. U savců existují čtyři tkáňově specifické izoenzymy - M1, M2, L, R [128]. M1 PK se nachází převážně v kosterním svalstvu, mozku a srdci, M2 se tvoří hlavně ve fetálních tkáních a tkáních s vysokou proliferací buněk. Během vývoje je postupně nahrazován a zůstává jen v ledvinách, plicích, slezině, tukové tkáni, leukocytech a trombocytech [129]. PK M2 je obsažen také v mnoha tumorech, kde nahrazuje tkáňově specifický izoenzym, má tedy potenciál stát se dalším z tumor markerů [130], jeho možné využití je při detekci kolorektálních nádorů [131]. PK L je převážně produkován v játrech, ale také se nachází v kůře ledvin. R forma PK se vyskytuje výlučně jen v červených krvinkách. Izoenzymy PK-M1 a M2 jsou kódovány genem PKM ležícím na 15. chromozomu. PK-L a R produkuje PKLR gen na chromozomu 1 (1q21). Jeho kódující oblast je rozdělena na 12 exonů, kdy exon 1 je specifický pro transkripci erytrocytární formy, exon 2 jaterní formy a ostatních deset exonů je společných pro oba izoenzymy. cDNA kódující PK-R je 2060bp dlouhá a kóduje 574 aminokyselin [132]. V promotorové oblasti PK-R se nachází dvě CAC oblasti a GATA motivy 270bp od iniciačního translačního kodonu. Proximální oblast 120bp má aktivitu bazálního promotoru a zbylá část slouží jako zesilovač - enhancer v erytroidních buňkách [133].

3.3 Mutace genu pro pyruvátkinázu

Doposud bylo popsáno celkem 180 mutací souvisejících s nesférocytární hemolytickou anémií. Převážná část mutací (69 %) jsou mutace měnící smysl, sestřihové mutace a stop kodon (13 a 5 %), zatímco malé delece, inserce a frameshift mutace jsou vzácné. Pouze dvě varianty, -72G a -83G, byly identifikovány v promotorovém úseku a funkčně charakterizovány. V PK-LR genu bylo popsáno jen několik delecí: „Gypsy - rómská“ delece o 1149bp, která vede ke ztrátě exonu 11; „Viet- vietnamská“ (del 4-10) a delece o 5006bp, která končí na úrovni cDNA, kde způsobuje ztrátu exonů 4 až 11[125].

Mezi nejčastěji popsané mutace patří 1529A a 1456T. Jejich distribuce je výrazně ovlivněna etnickými a regionálními vlivy. Mutace 1529A je běžná v USA (42 %) a v severní a střední Evropě (41 %). Mutace 1456T se převážně nachází v jižní Evropě (32 % ve Španělsku, 35 % v Portugalsku a 29 % v Itálii). Další mutace, zejména 721T a 994A, jsou také přítomny s nižší frekvencí u bělochů. Nejčastější mutace nacházená v Asii je 1468T. Jen dvě mutace 1151T, 1436A jsou společné pro japonskou a bílou populaci. Ve slovanské populaci se hojně objevuje mutace 1594T a téměř se v ní nevyskytuje mutace typická pro střední a severní Evropu 1529A [125].

3.4 Klinické příznaky

Klinické projevy nemoci jsou variabilní. Abnormality v PK-LR genu by měly ovlivnit oba izoenzymy stejně, ale klinické nálezy nasvědčují tomu, že převaha symptomů je způsobena poruchou erytrocytů. Deficit pyruvátkinázy je charakterizován chronickou nesférocytární extrakorpuskulární hemolytickou anémií. Závažnost klinických projevů je rozdílná od mírné anémie, která je velmi dobře kompenzována, přes anémii objevující se při infekcích, vyčerpání či v těhotenství až k těžké život ohrožující anémii u novorozenců, vyžadující výměnnou transfúzi a opakované podávání erytrocytární masy. Pokud není žádná tvorba PK, může skončit těhotenství až hydropsem plodu. U dětí dochází většinou s přibývajícím věkem k úpravě závažnosti anémie. Zajímavé je, že vzhledem ke zvýšené 2,3-DPG je anémie obvykle velmi dobře tolerována. Deficit PK může vést k různým dalším symptomům. Obvyklý je novorozenecký ikterus, dále se u pacientů s deficitem PK může projevit i přetížení železem jako následek opakovaných transfúzí. V literatuře jsou popsány i případy přetížení železem bez podání erytrocytární masy. Spekuluje se o multifaktoriálních příčinách vzniku přetížení železem, a to především u chronické hemolýzy neefektivní erythropoézy. Další roli

může hrát i přidružená přítomnost mutací pro vrozenou hemochromatózu (např. C282Y a H63D) společně s dalšími genetickými faktory [124]. Literární zdroje popisují i případ dvou pacientů, kteří nikdy nedostali erytrocytární transfúzi, podstoupili splenektomii a nebyli nosiči mutací genu pro hemochromatózu a přesto se u nich projevilo přetížení železem, které vedlo k cirhóze jater a kardiomyopatii [134].

Mezi další komplikace patří žlučové kameny, které se objevují po první dekádě života až u poloviny pacientů s deficitem PK, a to i u splenektomovaných. K méně častým projevům patří aplastická krize vyvolaná Parvovirem B19, kernikterus, chronická pankreatitida vzniklá sekundárně díky postižení žlučových cest, slezinné abscesy, extramedulární hematopoéza, která způsobí útlak míchy, a tromboembolická nemoc [124]. U pacientů se závažnou anémií se může objevit i hypertrofie myokardu vzhledem ke zvýšenému srdečnímu výdeji při anémii. Dále je popsána i hypertriglyceridémie, jejíž vznik je dáván za vinu podávání erytrocytárních přípravků [135].

3.5 Diagnostika

Při vyšetření krevního obrazu dominuje mírně makrocytární anémie různé tíže s přítomností ovlaocytů, poikylocytů a eliptocytů doprovázená polychromázií a ojediněle se sféroechinocyty a normoblasty. Retikulocytóza je také variabilní, není závislá na tíži anémie a hemolýzy. Mladé PK deficitní erytrocyty jsou selektivně vychytávány ve slezině, k rozvoji výraznější retikulocytózy dochází obvykle až po podstoupení splenektomie. U pacientů s chronickou hemolýzou bývá zvýšená hladina laktátdehydrogenázy a hladina nekonjugovaného bilirubinu, obvykle je však nižší než 60 $\mu\text{mol/l}$. Vyšší hodnoty se objevují většinou až po splenektomii. Pokud jsou hodnoty bilirubinu výrazně vysoké, je nutné zvážit možnost současně se vyskytujícího Gilbertova syndromu.

Stanovení hladiny PK patří k běžným vyšetřovacím postupům, ovšem míra produkce PK ne vždy vypovídá o závažnosti onemocnění. U homozygotů je enzymová aktivita obvykle nižší než 25 % a u heterozygotů se nachází v rozmezí 40-60 %. Je známo, že někteří pacienti s klinicky těžkou formou deficitu PK mají laboratorně normální, někdy dokonce zvýšenou aktivitu PK. Výsledek může být ovlivněn předchozím podáním erytrocytární transfúze, nedostatečným odstraněním leukocytů při zpracování krevního vzorku, nebo kompenzačním mechanismem izoenzymu M2. Jsou popsáni nemocní s tak zvanou „null mutací“, tedy mutací kdy je tvorba PK-R nulová a je nahrazena izoenzymem M2 [124]. Je vhodné stanovit aktivitu

PK jak při nízké tak vysoké koncentraci fosfoenolpyruvátu vzhledem k falešně pozitivním výsledkům *in vitro* i přes omezenou tvorbu *in vivo* [136]. Za definitivní průkaz deficitu PK lze považovat pouze nález kauzální mutace.

Korelace mezi fenotypem a genotypem není jednoznačná. Pokusili se o ni italští autoři [124], kteří dělí deficit PK na těžký, střední a mírný, a to dle závažnosti anémie (méně než 80 g/l Hb – těžká forma, 80-100 g/l Hb – středně těžká forma a nad 100 g/l Hb – lehká forma). U těžké formy popisují časně stanovení diagnózy s mediánem 4 roky, těžké neonatální iktery, které mohou vést až k výměnným transfúzím. Tito pacienti bývají závislí na podávání transfúzí erytrocytů a může se u nich postupně rozvinout přetížení železem. Molekulární analýzy přiřazují k těžké formě disruptivní mutace typu stop kodonu, mutací měnicích čtecí rámec, sestřihových mutací, velkých delecí a mutací měnicích smysl, které ovlivňují aktivní místo nebo stabilitu proteinu. Příkladem je mutace 994A v homozygotní formě, která je spojena s velmi těžkou anémií, stejně jako „null mutace“, kdy je známa intrauterinní retardace, těžká anémie po porodu, většinou s nutností výměnné transfúze a se závislostí na transfúzích až do provedení splenektomie. V raritních případech byl popsán i hydrops fetalis. U středně těžké formy byla poměrně často zastoupena mutace 1529A, která je typická pro severní a střední Evropu a bílou populaci Američanů. U nemocných s homozygotní mutací i přes středně těžkou formu onemocnění bývá nízká hladina aktivity PK společně se sníženou stabilitou enzymu. Při mírné formě onemocnění jen několik nemocných vyžadovalo krevní transfúzi a jen polovina dětí měla neonatální uterus. Většina nemocných je velmi dobře kompenzována a onemocnění se klinicky projeví jen při těžších infekcích nebo během porodu. Do této kategorie lze zařadit mutaci typickou pro jih Evropy 1456T. Díky velmi ojedinělým projevům onemocnění je zvažováno možné nedostatečné rozpoznání tohoto onemocnění.

3.6 Léčba

Terapie onemocnění je symptomatická, kauzální léčba zatím neexistuje. Někteří nemocní jsou závislí na transfúzní léčbě. Splenektomie je vyhrazena pro nejtěžší případy onemocnění s těžkou anémií, u kterých může vést k omezení nutnosti transfúzní léčby a ke stabilizaci hodnot hemoglobinu. I přes redukci počtu transfúzí se u splenektomovaných nemocných mohou objevit nebo prohloubit známky přetížení organismu železem, u kterého je nevyhnutelná chelatační léčba.

4 Parvovirus B 19 a jeho vliv na erythropoézu

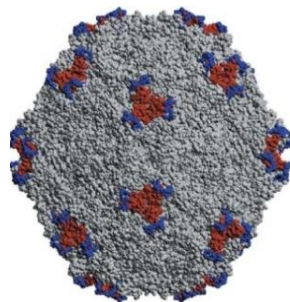
4.1 Definice

Parvovirus B 19 (B19V), dle novější terminologie Erythrovirus B 19, byl donedávna jen jediným z čeledi parvoviridae, který způsoboval infekce u člověka. Patří mezi nejmenší známé viry způsobující infekci lidských buněk. Poprvé byl popsán v roce 1974 a asociace s onemocněním u člověka je známa od roku 1981 [137]. V poslední době jsou publikovány informace i o infekcích lidským Parvovirem 4 (PARV4) a lidským Bocavirem [138,139]. Veškeré erytroidní viry, jak již název napovídá, se velmi dobře replikují v erytroidních progenitorových buňkách, které následně podléhají apoptóze. Infekce tímto virem vede tedy k rozvoji anémie.

4.2 Struktura viru, prostup viru do buněk

Stejně jako všechny viry z čeledi parvoviridae, B19V je malý neopouzdrěný virus, velikosti přibližně 20 nm v průměru (obr. 3). Jádro viru je složeno z 60 molekul kapsidových proteinů (vírový protein - VP). Hlavním proteinem je VP2, která má velikost 58 kDa a tvoří až 95 % kapsidy. VP2 obsahuje vazebné domény jak pro receptor tak pro koreceptor a také tzv. „self assembly“ domény vedoucí k tvorbě velmi stabilních částic. VP2 odpovídá C-terminální oblasti VP1, a prvních 227 aminokyselin VP1 charakterizuje VP1 unikátní oblast (VP1u). Právě VP1u obsahuje prvky, které jsou důležité pro vstup viru do buňky - zejména doménu fosfolipázy A2 (PLA2) [140].

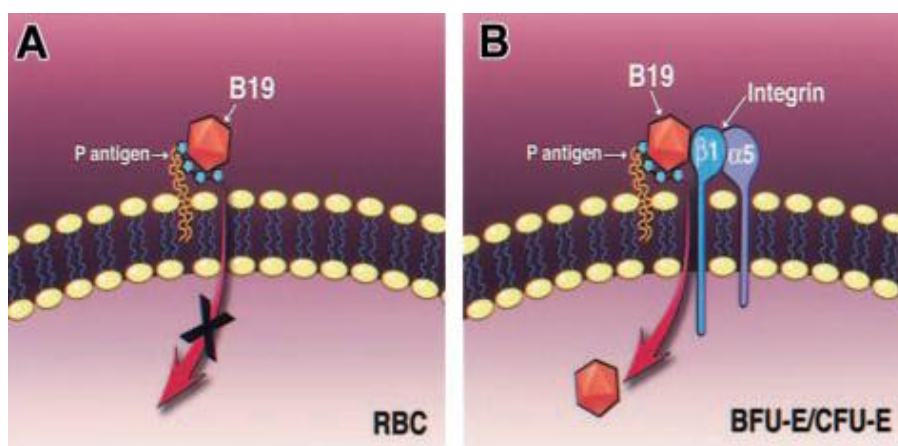
Obrázek č. 3 Parvovirus B19



Zdroj: internetový vyhledavač – www.google.com- images,
<http://www.stanford.edu/group/virus/parvo/2005/B19.jpg&imgrefurl> - staženo 25.2.2011

Hlavním receptorem B19V je neutrální glykosfingolipid nacházející se na povrchu erytroidních prekurozorových buněk - P antigen krevních skupin. Afinity B19V k tomuto proteinu je příčinou výrazného tropizmu k buňkám kostní dřeně (obr. 4). Replikuje se zejména v progenitorových buňkách (BFU-E, CFU-E), pronormoblastech a normoblastech, na které působí přímo cytotoxicky. P antigen se nachází rovněž na povrchu megakaryocytů, endoteliálních buněk, kardiomyocytů a buněk placentárního trofoblastu [141]. Žádná z těchto neerytroidních buněk však neumožňuje efektivní replikaci viru. A5 β 1 integrinový komplex je také zapojen jako koreceptor při vstupu B19V do vhodných buněk, stejně jako další vazebný protein ku80DNA [142,143].

Obrázek č. 4 Model vazby parvoviru B19 na P antigen a vstup do erytroidních prekurzorů.



Receptorem viru je P antigen přítomný na erythrocytech a erytroidních prekurzorových buňkách. Ke vstupu do buňky je však nutná přítomnost koreceptoru B1 integrinu exprimovaného pouze na prekurzorových buňkách. Převzato a upraveno: Weigel-Kelley KA et al., 2003.

Zkoumání mechanismu vstupu B19V do buňky je velmi obtížné díky silnému tropizmu k primárním progenitorovým buňkám *in vitro*. Jako model pro možný vstup B19V do buňky může sloužit již detailně popsaná cesta průniku zvířecích typů parvoviru, především psího parvoviru, do buněk.

Zvířecí parvovirus se po vazbě na receptor nebo koreceptor dostává endocytózou do cytoplazmy, a to za pomoci klatrinu, dynaminu a cytoskeletální sítě. Postupným vyžráváním endozomů obsahujících viriony dochází k transportu viru do blízkosti buněčného jádra. Nízké pH endocytárních váčků vede ke změnám konformace viru, při které se na povrchu kapsidy odhaluje VP1u oblast, konkrétně PLA2 doména a nukleární lokalizační signál (NLS).

Parvovirová PLA2 doména obsahuje katalytický konec a kalcium vážící doménu nezbytnou pro enzymatickou aktivitu. PLA2 doména štěpí membránu váčku, při čemž dojde k uvolnění částí viru v blízkosti jaderné membrány. NLS umožní navázání proteinové kapsidy na importin na jadrové membráně a poté translokaci virového genomu do jádra, pravděpodobně přes komplex pórů jaderné membrány [144]. Tento model buněčného vstupu může být také použit pro infekci B19V u člověka. Malá GTPáza ze skupiny Ras - Rap1, hraje roli v cytoplazmatickém přenosu B19V regulací $\beta 1$ integrinových koreceptorů a/nebo modulací mikrotubulární sítě během přenosu virových částic cytoplazmou. Částice B19V bylo možno vizualizovat elektronovým mikroskopem v endocytárních váčkách infikovaných erytroidních buněk, což podporuje teorii, že endocytóza je hlavním mechanismem průniku B19V do buňky. PLA2 doména je umístěna mezi aminokyselinami 130 - 195 v oblasti VP1u B19V [145] a je stejná u různých genotypů. Tato doména je stěžejní pro průnik B19V. Viriony s mutací v oblasti VP1u nejsou schopny proniknout do jádra infikovaných buněk [146].

4.2.1 Replikace viru a buněčná apoptóza

Genom B19V tvoří jednovláknová molekula DNA. Negativní nebo pozitivní vlákno je do virové kapsidy náhodně zavzato. Unikátní funkční promotor P6 řídí syntézu alespoň devíti transkriptů, které kódují jeden nestrukturální protein (NS1), dva strukturální proteiny kapsidy (VP1 a VP2) a dva malé proteiny o velikosti 7.5 a 11 kDa [147]. NS1 funguje jako silný transkripční aktivátor díky jeho schopnosti přijímat mnoho buněčných transkripčních faktorů a také se podílí na virové replikaci, kdy je využito jeho helicázy a endonukleázy. Zablokování tvorby celé délky transkriptů na vnitřním polyadenylačním místě je spojeno s omezenou permisivitou infekce B19V, jelikož je limitována exprese VP proteinů [148]. K této blokadě může dojít v průběhu translace a bylo prokázáno, že může být překonána replikací genomu viru, což vede k tvorbě všech virových proteinů v permisivních buňkách. Replikace viru je díky některým exogenním vlivům urychlena, například při snížené koncentraci kyslíku v buněčné kultuře, při expresi adenovirových transaktivátorů a také díky působení chloroquinu a jeho derivátů. *In vitro* produkce purifikovaných CD36+ primárních erytroidních progenitorů umožnila rutinně replikovat B19V v laboratorních podmínkách [149].

Již v roce 1983 Mortimer a jeho kolegové naznačovali možnou cytotoxicitu B19V pro erytroidní progenitory [150]. Teorie o možné souvislosti mezi toxicitou viru a apoptózou byla poprvé vyslovena během zkoumání fetálních erytroidních prekurzorů infikovaných B19V a

poté u linie erytroidních buněk, do kterých byl přenesen gen pro NS1 protein. V obou případech byla prokázána aktivace kaspázy 3 [151]. Předpokládá se, že nukleosidová trifosfát - vazebná doména NS1 proteinu hraje roli při apoptóze erytroidních, ale i neerytroidních buněk vyvolané B19V [151]. Apoptóza erytroidních buněk může být také spuštěna interakcí mezi NS1 proteinem a signální dráhou TNF receptoru, která vede k aktivaci kaspáz 3 a 6 [152].

Funkce dalších dvou malých virových proteinů o velikosti 7,5 a 11kDa zatím nebyla důkladně prozkoumána, pravděpodobně hrají velmi důležitou roli v buněčném cyklu B19V nebo v jeho patogenezi. Zablokování exprese 11kDa proteinů v rekombinantních virionech výrazně snižuje infekčnost viru. Exprese tohoto malého proteinu tedy může být důležitá pro expresi VP2 proteinu [153]. Chen a kolegové dokázali, že 11kDa protein se nachází ve velkém množství (minimálně 100 x více než NS1) v erytroidních prekurzorech, převážně v cytoplazmě, a byl hlavním vyvolavatelem apoptózy díky aktivaci kaspázy 10, která zahajuje kaspázovou signální kaskádu v tzv. „death receptor“ signální dráze.

Kromě toho DNA B19V může také aktivovat tzv. „Toll-like“ receptor 9 v erytroidních buňkách a způsobit tak inhibici buněčného růstu [154]. Zvažuje se, že toxický vliv na infikované buňky mohou mít i kapsidové proteiny viru. Erytroblastopenie způsobená B19V má tedy pravděpodobně multifaktoriální příčinu.

4.2.2 Vliv viru na imunitní systém

Jsou známy imunopatologické stavy projevující se během nebo po infekci B19V. Toto onemocnění také může vyvolat nebo zhoršit průběh autoimunitních chorob [155]. Během infekce B19V byla pozorována polyklonální stimulace imunitního systému s produkcí různých autoprotilátek zahrnujících i antinukleární protilátky [156]. Při autoimunitní reakci může hrát úlohu zkřížená protilátková reakce proti virovým epitopům a některým strukturám buněčných membrán (molekulární mimikry) společně s tvorbou antiidiotypových protilátek. Během onemocnění B19V byly pozorovány vysoké hladiny prozánětlivých cytokinů, zejména interleukinů-1 β (IL-1 β), interleukinů-6 (IL-6), interferonu gama a TNF alfa (TNF- α) [157]. Produkce IL-6 a TNF- α může být stimulována virovým transaktivátorem NS1. Genetická variabilita odpovědi cytokinů je spojována s pravděpodobností rozvoje symptomů při infekci B19V [158].

4.3 Průběh infekce

Na průběh akutní infekce Parvovirem B19 má vliv doba neutralizace protilátek u imunokompetentního jednovlivce. Tranzientní závažná virémie trvá obvykle méně než 7 dní. K jejímu ústupu dochází v době objevení se specifických IgM protilátek, které v organizmu přetrvávají 8 až 10 týdnů. Postupně také narůstá titr protilátek třídy IgG, které u imunokompetentních pacientů přetrvávají po celý život. Perzistující infekce mohou být pozorovány u imunokompromitovaných pacientů, kteří nejsou schopni vytvořit neutralizační protilátky a tím virus eliminovat. To může vést k jeho dlouhodobému přežívání v organizmu, které může být doprovázeno anémií [159-161]. Přestože prodělaná infekce zajišťuje celoživotní ochranu proti B19V, je vzácně popisována perzistence viru i u imunokompetentních jedinců jak v periferní krvi, tak v kostní dřeni, i několik let po primární infekci [162-166]. Mechanismus chronického přežívání B19V je doposud nejasný.

4.4 Klinické příznaky

Infekce B19V je poměrně běžnou virovou infekcí s celosvětovým výskytem. Většina osob prodělá infekci do 15 let věku. Největší promořenost je u předškolních a školních dětí, vzhledem k šíření v kolektivu. Nejčastěji se onemocnění objevuje v zimě a na počátku jara. Virus se přenáší kapénkovou infekcí, krví nebo vertikálním přenosem z matky na plod [167]. Jsou popsány případy přenosu při transplantaci kostní dřene a ledvin [168]. Uvádí se, že riziko přenosu infekce při výskytu v rodině je až 50 %. Nejzávažnější průběh může mít infekce u imunosuprimovaných osob nebo pacientů s hematologickými onemocněními. U většiny osob infikovaných B19V probíhá infekce asymptomaticky nebo pod obrazem běžné respirační infekce.

U části pacientů infekce probíhá pod obrazem klinicky dobře definovaných jednotek, ke kterým patří pátá nemoc (*erythema infectiosum*), arthropatie, tranzientní aplastická krize, chronická aplazie erytropoézy, syndrom rukavic a ponožek a fetální hydrops. Mezi další onemocnění uváděná v možné souvislosti s infekcí B19V patří encefalopatie, epilepsie, meningitida, myokarditida, dilatační kardiomyopatie a autoimunitní hepatitida [169]. U imunosuprimovaných pacientů se může vzhledem k nedostatečné produkci ochranných protilátek objevit chronická aplazie erytropoézy, pancytopenie až aplastická anémie, ojediněle byl popsán i fatální průběh infekce s multiorgánovým selháním po transplantaci kostní dřene [170]. Rozvoj molekulárně -genetických metod, především velmi citlivých technik

polymerázové řetězové reakce s možností přímého průkazu DNA viru, rozšiřuje znalosti o dalších pestrých klinických manifestacích parvovirové infekce u člověka, jejichž spektrum se stále rozšiřuje [170].

Erythema infectiosum, neboli pátá dětská nemoc je nejtypičtějším projevem infekce B19V. Obvykle postihuje děti ve věku od 4 do 10 let [171]. Prodromální symptomy jsou mírné, lze mezi ně zařadit horečku, bolest hlavy a nauzeu. V první fázi onemocnění se objeví vyrážka na tváři, popisovaná jako „zpolíčkováná tvář“, což je zarudnutí tváře s okolním vyblednutím (obr 5.) Během jednoho až čtyř dnů následuje rozvoj druhého stádia kožních projevů na končetinách a trupu. Kůže je zarudlá s makulopapulózní vyrážkou. Druhé stádium může trvat až 6 týdnů. Následuje třetí fáze, trvající jeden až tři týdny, kdy vyrážka postupně bledne a znovu se může objevit při působení tepla nebo slunečního záření na kůži. *Erythema infectiosum* může být u části pacientů provázena artopatií, která se však může vyskytovat i jako samostatný projev infekce. Udává se, že přibližně 8 % dětí infikovaných B19V má bolesti kloubů [172]. Artralgie je častým projevem infekce hlavně u adolescentů a u dospělých a postihuje až 60 % z nich. Více se vyskytuje u žen než u mužů. U dětí postihuje artopatie častěji klouby kolen, může být symetrická i asymetrická, zatímco u dospělých se obvykle jedná o symetrické postižení menších kloubů, jak interfalangeálních tak metakarpofalangeálních.

Obrázek č. 5 Exantém v obličeji – obraz zpolíčkováné tváře



Tranzientní aplastická krize je dalším projevem infekce B19V. Rozvíjí se u pacientů se zvýšenými nároky na obrat erythropoézy. Nejčastěji se v našich podmínkách jedná o hemolytické anémie, jako je sférocytóza, ale jsou popsány i případy rozvoje tranzientní aplastické krize u anémie z nedostatku železa [173]. Virus, který se dostane do erytroidních buněk díky vazbě na P antigen, způsobí jejich apoptózu, což vede k snížení produkce erytrocytů. Zvýšené nároky na produkci erytrocytů tak nejsou kompenzovány a vzniká těžká anémie, která může ohrožovat pacienta na životě a obvykle si vyžádá podání transfúze erytrocytů. Náhlý pokles hladiny hemoglobinu může vést až k srdečnímu selhání, mozkové příhodě [174]. Současně se může objevit leukopenie a/nebo trombocytopenie. Během tranzientní aplastické krize jsou pacienti velmi infekční a měli by být izolováni od jiných nemocných.

Jak již bylo zmíněno, B19V může perzistovat u imunokompromitovaných pacientů bez vytvoření protilátek. Vyrážka ani arthropatie se u těchto nemocných v souvislosti s B19V neobjevují, jelikož chybí imunitní reakce organismu na ukládání komplexů antigenu s protilátkou do kůže a kloubů [175]. Obvyklými symptomy jsou únava a bledost způsobené anémií, která může být velmi těžká a rekurentní. Při přetrvávání potíží bývá nutné podání imunoglobulinů, po kterých se následně mohou projevit typické projevy infekce B19V, tedy vyrážka s arthropatií.

Syndrom rukavic a ponožek byl spojován s infekcí B19V, ale bylo prokázáno, že se podobný klinický obraz může objevit i u jiných virových infekcí jako je EBV, CMV, Herpes virus 6 atd. [176]. Jedná se o onemocnění, kterým trpí převážně mladí dospělí. Na kůži rukou a nohou je bolestivé zarudnutí s otokem, které progreduje až do tvorby petéchií a purpury, někdy se na kůži mohou objevit i vezikuly a buly, které se olupují. Vyrážka je striktně ohraničená na kotnících a zápěstí, i když mohou být postiženy i jiné části těla. Potíže přetrvávají jeden až tři týdny a může se připojit i bolest kloubů a horečka. Kožní léze se hojí ad integrum bez zanechání jizev.

Infekce B19V v těhotenství obvykle neohrožuje matku, ale může mít závažné následky pro plod, u kterého může dojít k infekci myokardu, jater a ke vzniku těžké anémie. V důsledku toho hrozí srdeční selhání nebo vývoji fetálního hydropsu. Obecné odhadované riziko přenosu infekce z matky na plod je asi 30 % [177]. Nejvíce zranitelný je plod ve druhém trimestru těhotenství kvůli zvýšené hematopoéze v játrech. U těhotných žen, které jsou v kontaktu s B19V, by vždy mělo být provedeno sérologické vyšetření na přítomnost IgM protilátek viru, které by v případě positivity mělo být následováno pravidelnými ultrazvukovými kontrolami fetu po dalších 12 týdnech, kdy přetrvává riziko hydropsu [178].

4.5 Diagnostika

Diagnostika infekce B19V je založena na sérologických a molekulárně genetických metodách. V případě jasného klinického nálezu *erythema infectiosum* je možné diagnózu stanovit i bez nutnosti laboratorních odběru. U imunokompetentních pacientů se doporučuje stanovit přítomnost protilátek proti B19V, IgM protilátky je možno prokázat přibližně do tří týdnů po infekci. Přítomnost IgG protilátek svědčí pro prodělanou infekci. U pacientů s tranzientní aplastickou krizí a především u imunodeficitních pacientů s podezřením na chronickou infekci při nedostatečné produkci protilátek je vhodné vyšetřit přítomnost virové DNA PCR metodou [174].

4.6 Léčba

Léčba infekce B19V je odlišná u různých projevů nemoci. Pokud se jedná o *erythema infectiosum*, většinou není léčba nutná nebo je jen symptomatická. U artralgií bývá nutné podávání nesteroidních protizánětlivých preparátů [169]. Pacienti s tranzientní aplastickou krizí mohou vyžadovat podání transfúzí erytrocytů. U chronických infekcí, u pacientů immunosuprimovaných nebo u těžkého průběhu infekce je vhodné podání vysokých dávek imunoglobulinů (IVIG) k eradikaci viru [179]. Doporučeno je schéma pět dní 0,4g /kg IVIG.

B. PRAKTICKÁ ČÁST

5 Databáze pacientů s Diamondovou-Blackfanovou anémií

5.1 Klinický popis pacientů a epidemiologické výsledky

Česká národní databáze pacientů s DBA byla založena v roce 1991, a to díky spolupráci všech osmi dětských hemato-onkologických center v České republice. Pacienti jsou do něj kontinuálně zařazováni již od doby jeho vzniku až do současnosti. Všichni nemocní jsou seznámeni s využitím jejich dat pro tuto databázi a podepíší informovaný souhlas. Pokud se jedná o dětské pacienty, informovaný souhlas podepisuje jejich zákonný zástupce.

Každý pacient, který splnil diagnostická kritéria pro DBA, byl vyšetřen hematologem a byly od něj získány podrobné anamnestické údaje.

V současné době je v registru zahrnuto 42 pacientů (tab. 2). Jedná se o 16 mužů a 26 žen, kteří jsou z 36 rodin. Tři pacienti s klinicky i laboratorně jasně prokázanou DBA zemřeli v době vytváření databáze, a proto do něj nebyli zavzati. Jednalo se o pětiletého chlapce, u kterého se vyvinula akutní myeloidní leukemie, které podlehl. Druhou nemocnou byla osmiletá dívka, která zemřela díky rozvoji portální hypertenze (sestra pacienta CZUH04). Třetí pacient zemřel na následky přetížení železem při těžké anémii ve věku patnácti let. Tento chlapec měl kromě typického nálezu makrocytární anémie a těžké izolované hypoplazie erytropoézy i aplázii thenaru .

Tabulka č.2 Databáze pacientů s DBA

Číslo pacienta	Mutovaný RP	cDNA úroveň	Proteinová úroveň	Pohlaví	Narození	Věk v době diagnózy	SGA (BW (g))	Anomálie	Nízký vzrůst	Nynější léčba	Léčba leucinem	EPO (IU/L)	BM erytroidní buňky (%)	BFU-E in BM®
CZUH21	RPS17	c.2T>G	p.Methionin1 Arginin	M	1975	1 měsíc	Ne (2600)	hypoplazie thenaru	Ne	S	Ano	□866	18,6	17/179
CZUH02	RPS19	c.379_386dup	p.Leu131Lys fs	M	1989	3 týdny	Ne (2970)	Žádné	Ano	BMT	Ne	□3200	< 5	3/373
CZUH06	RPS19	c.185G>A	p.Arginin62 Glutamin	M	1992	2 měsíce	Ne (3100)	Kraniofaciální dysmorfismus	Ne	R	Ne	□527	18	184/258
CZUH10 sestra pac. CZUH11	RPS19	c.167G>A	p.Arginin56 Glutamin	Ž	1990	Nov.	Ano (2500)	Kraniofaciální dysmorfismus	Ne	T, DRX	Ano	□3200	< 5	5/117
CZUH11 sestra pac. CZUH10	RPS19	c.167G>A	p.Arginin56 Glutamin	Ž	1983	6 týdnů	Ne (2650)	Žádné	Ne	R	Ne	□35	25,2	17/248
CZUH14	RPS19	c.196_206del	p.Leu66Arg fsX84	Ž	1986	2 měsíce	Ano (2450)	Žádné	Ano	T, DRX	Ano	□1342	< 5	27/228
CZUH15	RPS19	c.356dupG	p.Gly120Arg fsX34	M	1992	Nov.	Ano (1650, 35 w)*	Kraniofaciální dysmorfismus, astenizmus	Ne	S-LD	Ne	□128	34	13/212
CZUH38	RPS19	c.233_250del	p.Ile78_Gln83del	Ž	2005	2 měsíce	Ne (3100)	Žádné	Ne	R	Ne	NA	2,4	NA
CZUH43 proband	RPS19	c.195C>G	p.Tyrosin65 Stop	Ž	2008	Nov.	Ne (3320)	ASD, kraniofaciální dysmorfismus	Ne	T	Ano	■3800	< 5	NA

CZUH43 otec	RPS19	c.195C>G	p.Tyrosin65 Stop	M	1974	6 měsíců	Ne (3200)	Kraniofaciální dysmorfismus, pterygia colli	Ano	S	Ano	□4000	17,6	NA
CZUH45	RPS19	c.58G>C	p.Alanin20 Prolin	M	2009	Nov.	Ne (3580)	Žádné	Ne	T	Ano	□725	<5	NA
CZUH49	RPS19	c.58G>C	p.Alanin20 Prolin	M	1980	6 týdnů	Ne (3300)	Atypické postavení palce	Ano	T	Ne	NA	1,5	Ne
CZUH50	RPS19	c.173C>T	p.Alanin58 Valin	M	2012	4 týdny	Ne (2820)	Žádné	Ne	R	Ne	NA	NA	Ne
CZUH01	RPS26	c.231T>G	p.Cystein77 Tryptophan	M	1993	2 měsíce	Ne (3010)	Žádné	Ano	T, DRX	Ano	□3008	14	14/54
CZUH03	RPS26	c.1A>C	p.Methionin1 Leucin	M	1998	Nov.	Ano (2300)	Vezikoureterální reflex	Ne	T, DRX	Ano	□2078	5	4/75
CZUH42	RPS26	c.3G>A	p.Methionin1 Isoleucin	Ž	2007	1 měsíc	Ne (3100)	Klippelův–Feilův syndrom, Sprengelova deformita	Ne	T	Ano	■566	<5	NA
CZUH44	RPS26	c.4-1G>A	Aberantní sestřih	Ž	2008	Nov.	Ne (2900)	ASD, deformity žeber	Ne	T	Ano	■2100	<5	NA
CZUH46	RPS26	c.6_9delAAAG	p.Lys4GluFs X40	Ž	2010	Nov.	Ne	Mikrocefalie	Ne	T	Ne	NA	10	NA
CZUH04 proband	RPL5	c.74-1G>A	p.Glu25Glyfs X2	M	1987	3 měsíce	Ano (2300)	Hypoplazie thenaru, kraniofaciální dysmorfismus, vysoko vyklenuté patro	Ano	R	Ne	□2448	29,6	13/76
CZUH04 matka	RPL5	c.74-1G>A	p.Glu25Glyfs X2	Ž	1959	1 rok	Ano (1100, 33 w)*	Hypoplazie thenaru, kraniofaciální dysmorfismus, vysoko vyklenuté patro, mikroftalmie	Ne	R	Ne	□208	20,6	NA
CZUH24 proband	RPL5	c.854C>T	p.Alanin285 Valin	M	1988	1 měsíc	Ano (2450)	Hypoplazie thenaru, kraniofaciální dysmorfismus, vysoko vyklenuté patro	Ne**	S	Ano	□2150	28,2	22/164
CZUH24 matka	RPL5	c.854C>T	p.Alanin285 Valin	Ž	1966	8 měsíců	Ano (2400)	Hypoplazie thenaru, kraniofaciální dysmorfismus, vysoko vyklenuté patro	Ano	R	Ne	□56	20,4	NA
CZUH26	RPL5	c.175_176delGA	p.Asp59Tyrfs X53	Ž	1980	1 měsíc	Ne (2600)	Hypoplazie thenaru, rozdvojený palec	Ne	BMT, GVHD-úmrť	Ne	□1060	8,8	47/49
CZUH32	RPL5	c.145dupT	p.Tyr49Leufs X64	Ž	1986	2 měsíce	Ano (2080)	Hypoplazie thenaru, tříčlankový palec, Fallotova tetralogie	Ano	R	Ne	NA	36	NA
CZUH40	RPL5	c.565delG	p.Glu189Asn fsX23	M	2007	6 měsíců	Ano (2100)*	Hypoplazie thenaru, kraniofaciální dysmorfismus, vysoko vyklenuté patro PDA, VSD	Ano	T	Ano	NA	<5	NA
CZUH41	RPL5	c.169_172delAA CA	p.Asn57Glu fsX12	M	2004	Nov..	Ano (1900)	Hypoplazie thenaru, kraniofaciální dysmorfismus, vysoko vyklenuté patro, PDA	Ne	T, DRX	Ano	□2300	<5	NA
CZUH09	RPL11	c.59T>A;	p.Leucin20 Histidin	Ž	1977	Nov.	Ano (2500)	Hypoplázie thenaru	Ano	S	Ne	□2300	5,2	1/95
CZUH37	RPL11	c.357T>G	p.Tyrosin119 Stop	Ž	1988	7 měsíců	Ano (2010)	Hypoplazie thenaru, tříčlankový palec, vysoko vyklenuté patro	Ne	T, DRX	NC	□611	14,4	NA
CZUH47 proband	RPL11	c.281T>G	p.Leucin94 Stop	Ž	1974	Nov.	Ano (2450)	Deformity palce, kraniofaciální dysmorfismus°	Ne	S	Ne	NA	NA	NA
CZUH47 matka	RPL11	c.281T>G	p.Leucin94 Stop	Ž	1959	1 rok	Ne (2600)	Deformity palce, kraniofaciální dysmorfismus, kratší horní končetiny	Ano	R	Ne	NA	NA	NA
CZUH51	RPL11	c.173C>T	p.Alanin58 Valin	Ž	2012	2m	Ne (3100)	Anomálie palce	Ne	T	Ne	NA	NA	NA
CZUH07	?	-	-	Ž	1993	5 měsíců	Ne (3080)	Žádné	Ne	S	Ne	□1743	32	9/157
CZUH12	?	-	-	M	1986	10měsíců	Ne (3400)	ASD	Ne	S-LD	Ne	□755	11,8	1/8
CZUH17	?	-	-	Ž	1986	1 měsíc	Ano (2150)	Žádné	Ano	BMT	Ne	□3210	9,6	242/265
CZUH18	?	-	-	Ž	1996	Nov.	Ne (2900)	Žádné	Ano	T, DRX	NC	□308	<5	90/373
CZUH19	?	-	-	Ž	1971	3 měsíce	Ne (3800)	Žádné	Ano	S-LD	Ne	□2914	11,2	18/186
CZUH20	?	-	-	Ž	1978	Nov.	Ne (2550)	Aplázie ledvin	Ano	R	Ne	□31	8,4	235/255
CZUH25	?	-	-	Ž	1987	6 měsíců	Ne (3150)	Kožní syndaktylie, nízká hranice vlasů, kraniofaciální dysmorfismus	Ano	S	Ne	□555	7,6	203/582
CZUH33	?	-	-	Ž	2000	Nov.	Ne (3150)	Kraniofaciální dysmorfismus, vezikoureterální reflex	Ne	R	Ne•	□328	16,8	NA
CZUH36	?	-	-	Ž	1977	4 měsíce	Ne (3150)	Deformity palce, VSD, kraniofaciální dysmorfismus	Ano	T,DRX	Ne	NA	18	NA
CZUH39	?	-	-	Ž	2007	1 měsíc	Ano (1560, 33 w)*	Tříčlankový palec, kraniofaciální dysmorfismus	Ne	R	Ne	■211	8,4	NA
CZUH48	?	-	-	M	2010	9 měsíců	Ne (3150)	Žádné	Ne	R	Ne	NA	12,4	NA

Vysvětlivky

SGA	malý pro gestační věk, jsou to děti narozené s váhou pod nebo rovné hodnotě -2SD vzhledem ke gestačnímu věku.
BW	porodní hmotnost
Short stature	nízký vzrůst, je definován jako výška menší nebo rovná hodnotě -2SD vzhledem k populaci stejného věku
BM erythroidní buňky	normální hodnoty: 15–25% ® progenitors/100,000 BM MNC: 5637CM + EPO medium/MethoCult™GF + medium; BFU-E medián pacientů: 17/172, BFU-E medián kontrol 191/333
M	muž
S	steroidy
□	měřeno RIA - normální hodnoty: muži: 9 - 26 IU/L; ženy: 11 - 30 IU/L
BMT	transplantace kostní dřeně
R	remise
F	žena
Nov.	novorozenecký věk
T	transfúze
DRX	deferasirox
*	narozen před 38. gestačním týdnem
S-LD	nízké dávky steroidů (tzn. méně než 0,2 mg obden)
NA	nevyšetřováno
ASD	defekt síňového septa
■	měřeno solid-phase chemiluminescentní immunochemickou reakcí - normální hodnoty: muži: 3.5 - 17.6 IU/L; ženy: 3.7 - 19.4 IU/L
**	po léčbě růstovým hormonem
GVHD	graft versus host disease
PDA	otevřený ductus arteriosus
VSD	defekt komorového septa
NC	non-compliance
○	DLBCL- difusní velkobuněčný lymfom z B buněk
?	mutace u analyzovaných RPSs a RPLs nenalezena
•	publikovaný pacient v remisi po podávání leucinu

Poměr mužů k ženám v registru je 1:1,625. Incidence DBA v České republice je 8,1 na milion narozených dětí.

U všech pacientů zahrnutých v registru se různě závažná anémie projevila již v prvním roce věku. Ve 4 případech byla však správná diagnóza DBA u rodičů stanovena až na podkladě diagnózy dítěte.

Z anamnestických údajů vyplývá, že čtyři děti byly narozeny nedonošené (9,52 %), tedy před 38. gestačním týdnem, a patnáct dětí (35,7 %) se narodilo s porodní hmotností nižší pro gestační věk (SGA). U 30 nemocných jsou přítomny některé z vrozených vývojových vad, v některých případech i více vad současně. Jedná se o anomálie palce, gotické patro, kraniofaciální dysmorfie, Klippelů-Feilův syndrom, Sprengelovu deformitu, pterygia coli, anomálie srdce a ledvin, mikrocefalii a mikroftalmii. Nejčastěji jsou zastoupeny kraniofaciální dysmorfie, a to u sedmnácti pacientů (40,48 %), a anomálie palce (zdvojení palce, tříčlankový palec a hypoplasie thenaru) u 16 pacientů (38,1 %) Gotické patro má sedm

nemocných (16,7 %), vrozenou vývojovou vadu srdce (Fallotovu tetralogii, nebo defekt síňového septa) trpí 7 pacientů (16,7 %). Sedmnáct pacientů je malého vzrůstu (40,4 %). Jeden chlapec s DBA byl indikován k léčbě růstovým hormonem a v současné době jeho výška odpovídá populačnímu průměru.

Z celého souboru pacientů s DBA pouze šest (14,2 %) nemá žádnou vývojovou anomálii nebo malý vzrůst.

Z dalších údajů je třeba zmínit, že jedna pacientka s prokázanou kauzální mutací RPL11 onemocněla ve věku třiceti šesti let difúzním velkobuněčným lymfomem z B buněk. Tento případ společně s rozvojem AML u pacienta, který zemřel před zařazením do registru, potvrzuje údaj o častějším výskytu maligních onemocnění u pacientů s DBA (4,8 %), a to převážně hematologického původu.

5.2 Odpověď na léčbu

Jedinou dosud uznávanou medikamentózní léčbou DBA, která sice není kauzální, ale může onemocnění dlouhodobě stabilizovat, je terapie kortikoidy. Na léčbu kortikosteroidy prvotně odpovědělo dvacet dva pacientů (52,38 %). K dnešnímu dni stále kortikoidy užívá deset nemocných (23,8 %). Pokud tato léčba nevede k zlepšení anémie, pacientům zbývá jediná vhodná léčba a to podávání transfúzí. V případě příbuzenského dárce je možno provést transplantaci kmenových buněk, která s sebou nese četná rizika a je určena jen pro vybrané pacienty. Nejedná se tedy o rutinní léčebný přístup. Šestnáct osob z registru je závislých na pravidelné transfuzní terapii (38,1 %). Tři nemocní podstoupili transplantaci kostní dřeně štěpem od HLA identického sourozence. Jeden z nich zemřel na multiorgánové selhání při generalizované infekci parvovirem B19 s těžkou akutní reakcí štěpu proti hostiteli (CZUH26), zbylí dva pacienti jsou dvanáct (CZUH02) a třináct let (CZUH17), po transplantaci a jejich stav je velmi dobrý. Třináct pacientů je v remisi onemocnění a nevyžaduje žádnou léčbu.

V minulosti jsme již prokázali pozitivní *in vitro* efekt L-leucinu na hladinu translace v buňkách pacientů s DBA. Bylo prokázáno, že právě tato aminokyselina aktivuje translaci mRNA aktivací mTOR dráhy, což bylo později potvrzeno u embryí zebřiček s deficitem Rps19 nebo Rps14 [180]. Efekt leucinu na erytropoezu byl popsán rovněž na myším modelu [181]. L-leucin byl podáván 11 pacientům s DBA závislým na transfúzích a 2 pacientům léčeným kortikoidy ve věku 2-28 let po dobu 1 roku. Byla použita dávka 2000 mg/m²/den rozdělená do tří denních dávek, ale u každého nemocného byla individuálně upravena dle

výsledků absorpce aminokyseliny do krevního oběhu. U pacientů byl každý měsíc hodnocen klinický nález, krevní obraz, jaterní funkce a hladina feritinu. U všech pacientů byla pozorována zvýšená chuť k jídlu a přírůstek hmotnosti. U 11/13 pacientů bylo po 9 měsících sledování prokázáno signifikantní snížení sérového feritinu. U 5/13 pacientů bylo pozorováno postupné zvýšení počtu retikulocytů a hemoglobinu následované prodloužením intervalu mezi transfúzemi. U jednoho pacienta bylo možno postupně potřebu transfúzí zcela eliminovat a navodit remisi onemocnění. U prvního z pacientů léčených steroidy bylo jejich dávkou možno redukovat o 30%, u druhého pacienta byly steroidy zcela vysazeny. Pět pacientů odpovědělo pouze zvýšením chuti k jídlu, zvýšením hmotnosti a snížením hladiny feritinu, což umožnilo snížení dávky chelátoru železa. K definitivnímu zhodnocení efektu jsou nezbytné mezinárodní studie na velkém počtu pacientů. O naše výsledky je veliký zájem jak ve Spojených státech amerických, tak v řadě zemí Evropy. V říjnu 2014 byl ve Spojených státech amerických zahájena studie efektu leucinu u pacientů s DBA: LECINE TRIAL podle našeho návrhu. Bude nás následovat studie připravovaná pro pacienty ve Spolkové republice Německo.

5.3 Metodiky vyšetření

5.3.1 Stanovení aktivity eADA

Venózní krev (3-5 ml) byla odebrána do EDTA, byly odstředěním odděleny červené krvinky a dvakrát promyty ve fyziologickém roztoku. Následně byla provedena enzymová assay ke stanovení eADA aktivity, dle popsaného postupu [182] s konečným zvýšením koncentrace adenosinu na 300 μM . Reakční produkty byly kvantifikovány pomocí HPLC (SpectraSeries System, Thermo Separation Products). Byla určena koncentrace hemoglobinu [183].

5.3.2 Stanovení hladiny erythropoetinu

U pacientů byly sérové EPO koncentrace měřeny pomocí radioimmunoassay (RIA) [184] a od roku 2007 chemoluminescentní imunochemickou reakcí pomocí IMMULITE 2000 EPO diagnostické soupravy a IMMULITE 2000 zařízení, podle pokynů výrobce (Siemens Healthcare Diagnostics).

5.3.3 Cytologické vyšetření nátěrů kostní dřeně

Nátěry kostní dřeně byly provedeny z čerstvých vzorků kostní dřeně získaných během její punkce v době diagnostiky pacienta. Byly barveny dle Maye-Grünwalda-Giemsho a vyhodnoceny za pomoci mikroskopu - Olympus BX51. Byla hodnocena buněčnost a u 200 buněk proveden diferenciální rozpočet (zvětšení 200x a 1000x). Fotografie z nátěrů kostní dřeně byly zpracovány digitálním fotoaparátem DP70, software používá: DP regulátor, DP správce.

5.3.4 Analýza erytroidních progenitorů kostní dřeně

Po podepsání informovaného souhlasu byly získány aspiráty kostní dřeně od 20 pacientů s DBA. Jako kontrolní vzorky byly použity buňky kostní dřeně od osmi dětí, srovnatelného věku, trpících akutní imunitní trombocytopenickou purpurou s normální erytropoézou a granulopoézou. Mononukleární buňky kostní dřeně byly odděleny odstředěním gradientem na Histopaque[®] -1077. Buňky s expresí CD34 byly vybrány pomocí MiniMACS - systému magnetické separace a CD34 isolačním kitem progenitorových buněk (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Německo). BFU-E a CFU-GM progenitorové eseje byly provedeny na methylcelulóзовých kulturách podle Iscove et al.[185]. Byly použity dva typy kultivačních médií: (1) MethoCult[™] GF + medium (StemCell Technologies, Vancouver, Kanada), které obsahují vysoké dávky rekombinantních lidských růstových faktorů (HDGF): (SCF 50 ng/ml, GM-CSF 20 ng/ml, IL-3 20 ng/ml, IL-6 20 ng/ml, G-CSF 20 ng/ml, EPO 3 U/ml) a (2) naše standardní kultivační médium (5637CM + EPO): Iscovovo modifikované Dulbelccovo Medium obsahující 30% fetální bovinní sérum, 0,1 mM 2-merkaptóethanolu, 0,1 mM heminu, 1 % detoxikovaný hovězí sérový albumin, 1,3 % methylcelulózu (Fluka, Buchs, Švýcarsko), rhEPO 4 U/ml (Cilag, Zug, Švýcarsko) a 10 % 5637 medium buněčné linie karcinomu močového měchýře (5637CM) [186]. Na základě zveřejněných dat [187], po přidání 5637 CM k jednomu mililitru kultury byly vytvořeny 0,01 ng SCF, 0,2 ng GM-CSF a 4 ng G-CSF. Kultury byly inkubovány ve zvlhčené atmosféře 5 % CO₂, 5 % O₂, a 90 % N₂. Kolonie byly hodnoceny po 14 dnech. U 14 pacientů s DBA byly progenitorové testy opakovány několikrát po dobu čtyř let, střední hodnoty opakovaných měření se použily pro statistické analýzy.

5.3.5 Statistika

Statistické analýzy porovnávací průměrné počty kolonií byly provedeny pomocí Mann-Whitneyho U nonparametrického testu pro nepárová pozorování. Test populačního podílu a test rovnocennosti dvou rozměrů byly použity pro porovnání poměrů počtu novorozenců s porodní hmotností neodpovídající gestačnímu věku (SGA) ve skupině DBA pacientů a populace zdravých novorozenců a dále ke stanovení korelace výskytu anomálií u různých typů mutací RP. Všechny statistické testy byly provedeny pomocí GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA), p-hodnoty nižší než 0,05 byly považovány za signifikantní.

5.3.6 Analýza mutací ribozomálních proteinů

Mononukleární buňky z periferní krve od pacientů s DBA a od zdravých kontrol byly izolovány gradientovou centrifugací přístrojem Histopaque 1077. Genomická DNA byla izolována pomocí Genomic DNA purification kit (Fermentas-Burlington, Ontario, Canada). Bylo analyzováno 22 genů kódujících následujících RP: RPS2, RPS3, RPS3a, RPS10, RPS12, RPS13, RPS14, RPS16, RPS17, RPS19, RPS24, RPS25, RPS26, RPS30, RPL5, RPL11, RPL13, RPL23, RPL26, RPL27, RPL35a a RPL 36. Jednotlivé exony s flanking oblastmi byly amplifikovány pomocí PCR a odpovídající PCR produkty byly izolovány z agarového gelu pomocí QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilde, Germany).

Izolovaná DNA byla použita pro přímé sekvenování přístrojem ABI3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

K potvrzení každé identifikované mutace, bylo sekvenování také provedeno na druhém nezávislém PCR produktu, a pokud byl k dispozici, použil se jako templát také jiný genomový DNA izolát PCR. V případě delecí a inzercí, byly klonovány příslušné PCR produkty k rozlišení mutované a wild type alely.

5.3.7 Zpracování a analýza vzorků kostní dřeni pacientů s DBA metodami průtokové cytometrie

5.3.7.1 Zpracování buněk kostní dřene ke stanovení odpovědi na leucin a lithium *in vitro*

Vzorek kostní dřene v transportním médiu byl rozdělen do zkumavek s obsahem 5 ml gradientu a centrifugován po dobu 30 minut při otáčkách 2200/min. Následně byly aspirovány leukocyty oddělené gradientovou metodou, promyty promývacím médiem a v případě znečištění vzorku erytrocyty byly tyto lyzovány za použití tkáňové vody. Po přidání ALL média byly buňky spočítány na Bürkerově komůrce a poté naředěny na požadovanou hustotu.

Buňky naředěné na 400 000 buněk/ml byly rozděleny do 4 jednotlivých zkumavek s kultivačním médiem o objemu 25 ml (výsledná koncentrace 10×10^6 buněk/25 ml). Do dvou byl přidán phytohemagglutinin (PHA) a do jedné ještě navíc N-Acetylcystein (N-ACC). Zbylé zkumavky sloužily jako kontrola.

- Pro potřeby experimentu bylo použito:
 - 1. zk – 25 ml ALL média + 10×10^6 b+ PHA
 - 2. zk - 25 ml ALL média + 10×10^6 b – PHA
 - 3. Zk - 25 ml ALL média + 10×10^6 b + PHA + N-ACC
 - 4. Zk - 25 ml ALL média + 10×10^6 b – PHA - N-ACC

Každá z těchto čtyř skupin byla nasazena do 6- ti jamkových panelů a ošetřena Lithiem (Li), Leucinem (Leu), nebo jejich kombimací o specifických koncentracích, a to: Li 2 mM, Li 10 mM, Leu 100 μ g/ml, Leu 500 μ g/ml, Li 2 mM+Leu 100 μ g/ml, Li 2 mM+Leu 500 μ g/ml, Li 10 mM+Leu 100 μ g/ml, Li 10 mM+Leu 500 μ g/ml.

5.3.7.2 Analýza proteosyntézy (Click It kit/Invitrogen)

Po třídní kultivaci v CO₂ inkubátoru při 37°C byla část buněk z jednotlivých jamek sklizena a promyta vytemperovaným 1x PBS. Ke každému vzorku byly přidány 2 ml média bez methioninu a buňky jednu hodinu opět inkubovány. Následně byl přidán Click-It AHA L-Azidohomoalanine (Invitrogen) a vše znovu hodinu inkubováno. Po promytí 1x PBS byl aspirován supernatant a zafixován ve 4 % paraformaldehydu po dobu 15 minut. Po stočení v centrifuze byl přidán 0,25 Triton X- 100 a vše inkubováno opět 15 minut. Poté znovu vše promyto v 3 % BSA v 1x PBS a byl přidán 0,5 ml koktejlu Click- It Cell reaction buffer kit (Invitrogen) a inkubováno po dobu 30 minut. Po dalším promytí 3 % BSA v 1x PBS bylo

přidáno 300 µl propidium jodidu a vzorky analyzovány na průtokovém cytometru (FACS Calibur).

5.3.7.3 Analýza progenitorových buněk

Po třídní kultivaci v CO₂ inkubátoru při 37°C byla část vzorků sklizena, promyta 1x PBS + 10% FCSI. Do aspirovaného supernatantu byl přidán 100 µl Binding pufru a protilátky: 5 µl APC Annexin V a 10 µl Monoclonal Mouse CD 235a, Glycophorin FITC. Vše bylo inkubováno 30 minut a následně promyto 1x PBS. Aspirovaný supernatant byl doplněn do 1 ml 1x PBS a vzorky měřeny na průtokovém cytometru (BD FACS Aria II).

5.4 Výsledky provedených laboratorních vyšetření

V době nezávislosti na transfuzích byla hladina erytrocytární adenosindeaminázy zvýšena u 19 z 22 pacientů (86.4 %). Jeden pacient a jeho matka s mutací v RPL5 (CZUH24) a jeden nemocný bez identifikované RP mutace (CZUH33) však opakovaně měli normální hladiny eADA. Zvýšená hodnota eADA byla zjištěna u 4 osob ve 3 rodinách pacientů s DBA, které nemají žádné klinické známky onemocnění DBA: u otce pacienta CZUH06, u matky a sestry pacienta CZUH07 (u obou byla zjištěna lehká makrocytóza erytrocytů při vyšetření KO) a u matky pacienta CZUH01.

Tabulka č.3 hodnoty eADA u 22 pacientů v době nezávislosti na podávání transfúzních přípravků (normální hodnoty: 24–95 nmol hod⁻¹ mg Hb⁻¹)

Číslo pacienta	Mutovaný RP	Pohlaví	eADA (nmol hod ⁻¹ mg Hb ⁻¹)
CZUH21	RPS17	M	212
CZUH06	RPS19	M	136
CZUH11 sestra pac. CZUH10	RPS19	Ž	204
CZUH14	RPS19	Ž	254
CZUH15	RPS19	M	145
CZUH01	RPS26	M	96
CZUH04 proband	RPL5	M	487
CZUH04 matka	RPL5	Ž	330
CZUH24 proband	RPL5	M	78
CZUH24 matka	RPL5	Ž	86
CZUH26	RPL5	Ž	210

CZUH09	RPL11	Ž	142
CZUH37	RPL11	Ž	303
CZUH07	Ne	Ž	429
CZUH12	Ne	M	745
CZUH17	Ne	Ž	135
CZUH19	Ne	Ž	387
CZUH20	Ne	Ž	191
CZUH25	Ne	Ž	183
CZUH33	Ne	Ž	78
CZUH36	Ne	Ž	183
CZUH48	Ne	M	138

Sérová hladina erythropoetinu byla zvýšená u všech pacientů, u některých více než stonásobně. Jenom tři pacienti vykazovali hladinu EPO v koncentraci pod 100 IU/L, všichni tři jsou nyní v remisi onemocnění (CZUH11, CZUH20, matka CZUH24).

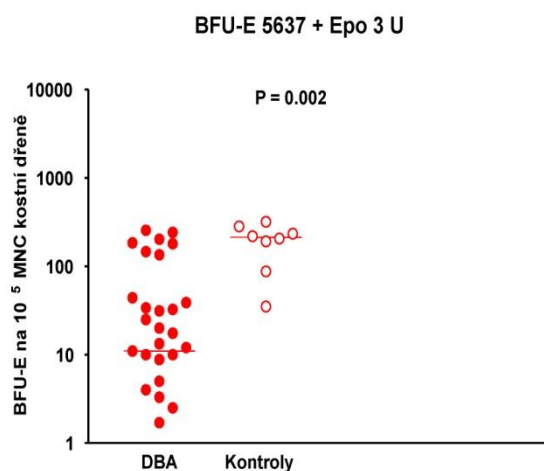
Podíl jednotlivých erytroidních prekurzorových buněk kostní dřeně se u pacientů s DBA pohybuje od méně než 1 % přes normální počet až po zvýšené hodnoty u některých nemocných. U 13 pacientů (35.1 %), přičemž z nich 7 má remisi onemocnění, 5 je léčeno steroidy, 1 je závislý na transfuzní terapii, v době jejich zařazení do registru, byla nalezena normální nebo zvýšená hladina erytroidních prekurzorů v kostní dřeni. U těchto nemocných byly popsány mírné dysplastické rysy erytroidních prekurzorů: megaloblastické změny, bi – nebo vícejaderné mezijaderné můstky, a/nebo chudá hemoglobinizace. Překvapivě byly u 5 pacientů nalezeny dysplastické rysy megakaryocytů. U jednoho pacienta s mutací RPL5 (CZUH04) a u pacienta s mutací RPS19 (CZUH15) byly pozorovány hypolobulární megakaryocyty, podobné těm u pacientů s myelodysplastickým syndromem typu MDS 5q- .

V celé skupině pacientů výsledky vyšetření erytroidních progenitorových buněk potvrdily jednoznačný pokles počtu BFU-E (u mononukleárních ($p=0.001$) a CD34+ buněk ($p<0.007$)) v porovnání s kontrolní skupinou (5637 CM+EPO medium). Kolonie BFU-E u většiny pacientů byly menší a méně hemoglobinizované. Počet CFU-GM progenitorů u pacientů s DBA byl téměř stejný jako u kontrolní skupiny pacientů.

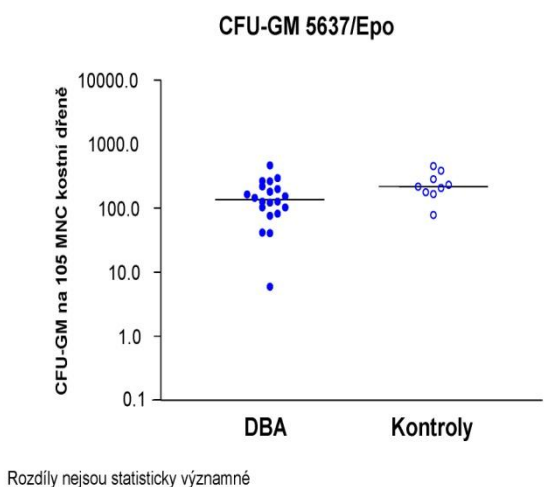
Významný rozdíl byl pozorován mezi 5637+EPO-stimulovanou kulturou a kulturou stimulovanou vysokodávkovaným růstovým faktorem pro kmenové buňky (SCF). Medián počtu BFU-E byl desetinásobný u kultur s SCF (172 kolonií na 100tis buněk) proti 17 koloniím na 100tis buněk u kultur s 5637CM+EPO. V kontrolní skupině byl medián BFU-E u HDGF kultur (333 kolonií na 100tisíc buněk) pouze 1,7násobkem v komparaci s 5637CM+EPO kulturou (191 kolonií na 100tis buněk, hodnota p nevalidní) (obr. 6,7). Vyšší

nároky BFU-E na SCF růstové faktor u DBA pacientů pozorované u progenitorových kultur mononukleárních buněk kostní dřeně byly podobné jako u kultur CD34+ buněk. Výsledky *in vitro* testování progenitorů neměly signifikantní vztah k výskytu fyzických anomálií nebo odpovědi na terapii. Navíc nebyla nalezena ani korelace počtu progenitorů BFU-E a CFU-GM s věkem pacienta a nedošlo ke snížení počtu BFU-E u pacientů s DBA kontrolovaných po dobu čtyř let, což není v souladu se závěry jiných prací popisujících pokles počtu progenitorových buněk u pacientů sledovaných více než 3 roky.

Obrázek č. 6 BFU-E kultura stimulovaná 5637+EPO



Obrázek č. 7 CFU-GM kultura stimulovaná 5637+EPO



U tří pacientů byla provedena cytometrická analýza buněk kostní dřeně. Cílem bylo prokázat vliv leucinu, lithia a N-acetylcysteinu na erytroidní buňky. K rozlišení mononukleárů (buněk lymfoidních erytroidních) bylo použito glycophorinu, k detekci buněk vstupujících do apoptózy, respektive apoptotických buněk ve všech fázích buněčné smrti, vyvolané ať už apoptózou nebo nekrózou byl použit annexin, k detekci proteosyntetických buněk bylo využito Click-It Kitu. Výsledky odpovědi u jednotlivých pacientů nejsou jasně průkazné, t.č. nelze stanovit jasný hodnotící trend. Nepodařilo se nám jednoznačně prokázat vliv N-acetylcysteinu, prekursoru glutathionu, na prodloužení přežívání erytrocytárních buněk, které literatura popisuje při oxidativním stresu, ani již opakovaně popsany příznivý vliv leucinu na růst erytroidních buněk či zvýšení počtu erytroidních prekurzorů při kultivaci s lithiem. Tato analýza bude nadále probíhat a při větším vzorku pacientů očekáváme průkaznější výsledky.

5.5 Mutace ribozomálních proteinů

Do dnešního dne je identifikováno 23 různých heterozygotních mutací v pěti ribozomálních proteinech. Mutace RPS17, RPS19, RPS26, RPL5, a RPL11, byly identifikované u 31/42 pacientů (73,8 %) ve 25/36 rodinách (69,4 %). Ve výše zmíněných 25 rodinách s mutací RP byla mutace u více členů nalezena u 6 rodin (28%). Největší počet pacientů má mutaci RPS19 genu – 12 pacientů (28,6 %) z 9 rodin, následují mutace genu pro RPL5 – 8 pacientů (19,1 %) z 6 rodin, mutace genu RPS26 byla pozorována u 5 pacientů (11,9 %) z 5 rodin, mutace RPL11 genu u 5 pacientů (11,9 %) ve 4 rodinách a mutace v genu RPS17 byla nalezena u 1 pacienta (2,3 %)(viz.tab. 1). Celkově mutace genu pro ribozomální protein malé podjednotky byla nalezena u 15 rodin (60 %) a mutace genů pro RP velké podjednotky u zbylých 10 rodin (40 %)

Během sekvenace genů pro dalších 17 ribozomálních proteinů (RPS2, RPS3, RPS3a, RPS10, RPS12, RPS13, RPS14, RPS16, RPS24, RPS25, RPS30, RPL13, RPL23, RPL26, RPL27, RPL35a, a RPL36) nebyly nalezeny nové mutace. Nově probíhá detekce mutací pomocí vysokokapacitního sekvenování

5.5.1 Mutace RPS19

Mezi pacienty v České republice jsme identifikovali 9 různých mutací v genu RPS19 - tři bodové mutace, jednu nesmyslnou mutaci, dvě delece a dvě duplikace. Dvě bodové mutace

byly nalezeny v „hot-spot“ místě: c.167G>A (p.Arg56Gln) u dvou sester s DBA (CZUH10 a CZUH11); a c.185G>A (p.Arg62Gln) u pacienta CZUH06. Třetí bodová mutace byla lokalizovaná na místě c.58G>C u pacienta CZUH45 a vedla k substituci p.Ala20Pro a nebyla doposud popsána. Nesmyslná mutace c.195C>G (p.Tyr65X) byla identifikována u pacientky CZUH43 a u jejího otce. Jde o nově popsanou mutaci. Ze čtyř zjištěných delecí/inzercí, pouze jedna změna nezpůsobovala frameshift - delece 18 nukleotidů, vedoucí k eliminaci šesti aminokyselin ve velmi konzervované doméně (pacient CZUH38; c.233_250del; p.Ile78_Gln83del). Druhá delece 11 nukleotidů (c.196_206del) u pacienta CZUH14 vede k frameshiftu a vzniku předčasného stopkodónu (p.Leu66ArgfsX84). Inzerce/duplikace 8 nukleotidů v exonu 5 (c.379_386dup) byla nalezena u jednoho pacienta (CZUH02). Stojí za zmínku, že tato mutace eliminuje stopkodón při transkripci genu RPS19, což pravděpodobně vede ke snížení stability mRNA a následné haploinsuficienci (p.Leu131Lysfs). Další mutace byla nalezena u pacienta CZUH15, a to inzerce jednoho nukleotidu na konci exonu 4 (c.356dupG), která vede k frameshiftu a eliminaci posledních 26 aminokyselin (p.Gly120ArgfsX34). Poslední zjištěná mutace byla prokázána u 2- měsíčního kojence a poté u otce dítěte, který byl do 6 let věku závislý na transfúzní terapii a diagnóza za DBA u něj v minulosti nebyla stanovena. Jedná se o opět o novou dosud nepopsanou mutaci. Souhrnem v genu RPS19 jsme u 12 pacientů (7mužů, 5 žen) identifikovali 9 různých mutací, z nichž 5 (55.5%) bylo lokalizováno na exonu 4 a popsali jsme čtyři nové mutace.

5.5.2 Mutace RPS17

V našem registru byla mutace RPS17 zaznamenána pouze u jednoho pacienta (pacient CZUH21), její popis v české databázi je prioritní. Postihuje iniciační kodon c.2T>G, čímž znemožňuje zahájení biosyntézy proteinu kódovaného genem RPS17 (p.Met1Arg). Expres RPS17 na této mutované alele proto může být kompletně ztracena a pacient je haploinsuficientní v produkci RPS17 proteinu.

5.5.3 Mutace RPS26

Doposud je popsáno 12 odlišných mutací tohoto genu, čtyři z nich byly identifikované u pacientů v naší databázi. Dvě různé mutace postihují iniciační kodon v exonu 1 (pacient CZUH03: c.1A>C, p.Met1Leu; pacient CZUH42: c.3G>A, p.Met1Ile), což se velmi pravděpodobně projevuje přerušáním zahájení translace. Jedna z mutací byla nalezena na

akceptorovém spojovacím místě intronu 1 (pacient CZUH44: c.4-1G>A) a předpokládá se, že blokuje správné napojování nukleotidů a tím následně způsobí rozpad tvořící se mRNA. U pacienta CZUH46 byla identifikovaná zatím neznámá mutace, delece 4 nukleotidů (c.6_9AAAG) v exonu 2, vedoucí k posunu čtecího rámce na čtvrtém kodonu (p.Lys4GlufsX40), takže jsou zachovány pouze první tři aminokyseliny kódované genem RPS26.

Poslední mutace byla identifikovaná v exonu 3, zaměňuje Cys 77 za Trp (pacient CZUH01; c.231T>G, p.Cys77Trp). Tato mutace byla taktéž zachycena na úrovni mRNA. Je zajímavé, že nativní RPS26 nezahrnuje tryptofan, takže vložení tryptofanu může negativně ovlivnit vlastnosti mutovaného genu RPS26. Cystein na poloze 77 je identifikovatelný jak u kvasinek, rostlin a samozřejmě u lidí, tímto je určena jeho důležitost pro správnou funkci RPS26. Všechny mutace jsou sporadické a svým charakterem vedou k haploinsuficienci RPS26 proteinu.

Je důležité zmínit, že kromě záměny p.Cys77Trp, všechny čtyři zbylé mutace odstraňují celé nebo téměř celé kódující sekvence RPS26, což má za následek úplnou ztrátu funkce mutované alely.

5.5.4 Mutace RPL5

V českém registru je zatím pacientů s DBA pospáno celkem 6 různých mutací tohoto genu, dvě byly identifikovány v rodinách s více postiženými pacienty s DBA (CZUH04, CZUH24). Čtyři mutace (66,7%) jsou lokalizované na exonu 3 nebo v jeho těsné blízkosti, jedna mutace je na exonu 6 a jedna na exonu 8. Charakter mutací je následovný: jedna mutace je bodová – postihuje spojovací akceptorové místo (rodina pacienta CZUH04), další mutace je duplikace jednoho nukleotidu (pacient CZUH32), u pacientů CZUH41, CZUH26 a CZUH40 jsou popsány tři malé delece, poslední mutací je další bodová mutace (rodina pacienta CZUH24).

U pacienta CZUH04 a u jeho matky byla detekována bodová mutace měnící AG ve spojovacím akceptorovém místě intronu 2 na AA (c.74-1G>A), což pravděpodobně vede k aberantnímu napojování. Další tři mutace jsou lokalizované v exonu 3 a způsobují posun čtecího rámce s předčasným ukončením syntézy řetězce - duplikace c.145dupT u pacienta CZUH32 (p.Tyr49LeufsX64), delece 4 nukleotidů (c.169-172delAACA) u pacienta CZUH41 (p.Asn57GlufsX12) a delece 2 nukleotidů (c.175-176delGA) u pacienta CZUH26 (p.Asp59TyrfsX53). Další delece c.565delG byla identifikována u pacienta CZUH40 na exonu 6 (p.Glu189AsnfsX23). Bodová mutace c.854C>T na exonu 8 se našla u rodinného

příslušníka pacienta CZUH24 a je zodpovědná za záměnu alaninu 285 za valin (p.Ala285Val).

Žádná z výše popsaných mutací RPL5 nebyla identifikovaná na úrovni cDNA, což znamená, že pacienti s DBA jsou haploinsuficientní v RPL5 produkci.

5.5.5 Mutace RPL11

U pacientů v České republice byly zatím identifikovány 4 mutace, jedna z nich dosud nepopsaná (rodina pacienta CZUH47). Tato nová nesmyslná mutace c.281T>G je v exonu 4, její podstatou je změna leucinu na pozici 94 vedoucí ke stop kodónu (p.Leu94X), pacientka ji dědí po matce. Další nesmyslná mutace c.357T>G u pacienta CZUH37 byla lokalizovaná také na exonu 4 a vede ke stop kodónu na pozici 119 (p.Tyr119X).

U pacienta CZUH09 byla nalezena bodová mutace c.59T>A na exonu 2, vedoucí k p.Leu20His. Tato mutace je detekovatelná i na úrovni cDNA, a proto by se měla přenést i do proteinu. Při porovnání sekvenací lidského RPL11 genu s dalšími 79 organizmy přes houby, bezobratlé živočichy a obratlovce, se u všech z nich prokázal leucin na pozici 20 a lysin na pozici 19 (číslované podle pořadí aminokyselin lidského proteinu RPL11), z čehož vyplývá, že tyto dvě aminokyseliny mohou být mimořádně důležité pro funkci RPL11 a proto evolučně konzervované. Tato mutace tedy působí dominantně negativním způsobem.

5.6 Rodiny

V registru je 6 rodin s více než jedním případem DBA a u všech se nám podařilo identifikovat kaizální mutaci genu pro ribozomální protein. Tři rodiny mají mutaci RPS19, dvě rodiny mají mutaci RPL5 a jedna RPL11.

U první rodiny s mutací RPS19 jsou anémií postiženy dvě sestry (CZUH10, CZUH11), které mají kompletně rozdílný fenotyp onemocnění. Starší sestra (CZUH11) je posledních 15let v remisi onemocnění, má hraniční výšku, je bez tělesných anomálií a má zvýšený MCV a vysokou hladinu eADA. Mladší ze sester (CZUH10) má těžkou formu nemoci, je závislá na pravidelné transfuzní terapii, má mírnou obličejovou dysmorfii bez dalších přidružených anomálií. Obě sestry mají stejnou heterozygotní mutaci měnící smysl c.167G->A (p.Arg56Gln) genu RPS19. Je zajímavé, že u rodičů sester nebyla nalezena žádná mutace

genu RPS19, z čeho vyplývá, že mutace velmi pravděpodobně vychází z gonadálních buněk jednoho z rodičů. Oba rodiče mají normální hodnoty MCV, HbF a eADA.

U druhé rodiny s identifikovanou mutací RPS19 genu je postižen otec a dcera (CZUH43), oba mají diskrétní obličejový dysmorfismus, otec má pterygia colli, dcera má defekt septa síní. Otec je závislý na steroidech a má malý vzrůst. Dcera je závislá na transfúzích, ani jeden z nich se nenarodil s nižší porodní hmotností. V poslední rodině s novou dosud nepopsanou mutací RPS19 je postižen otec a syn. Otec je nyní v plné remisi onemocnění, jeho diagnóza byla zjištěna až po stanovení diagnózy DBA u syna. Syn (5 měsíců věku) je nyní zatím stále závislý na transfúzích.

V další rodině s prokázanou mutací RPL5 genu (CZUH04) jsou postiženi matka a syn. U obou jsou vyjádřeny anomálie charakteru obličejových dysmorfíí a hypoplazie tenaru, oba mají gotické patro. Syn je sledován pro malý vzrůst a matka má mikroftalmii. Oba se narodili s nízkou hmotností vzhledem ke gestačnímu věku, matka se narodila předčasně ve 33. gestačním týdnu s porodní hmotností 1100 gramů. U obou je nyní onemocnění v remisi. Starší sestra pacienta zemřela 5 let před zahájením zařazování pacientů do databáze ve věku 8let na komplikace portální hypertenze, trpěla chronickou erytroblastopenií a měla stejné anomálie jak její bratr.

Ve druhé rodině s identifikovanou mutací genu RPL5 jsou postiženi rovněž matka a syn (pacient CZUH24), u obou jsou přítomné faciální dysmorfie, vysoké patro, anomálie palce ruky a oba byli rovněž narozeni s nižší porodní hmotností vzhledem ke gestačnímu věku. Zatímco syn byl pro nízký vzrůst léčen růstovým hormonem a dosáhl průměrné normální výšky pro mužskou populaci, jeho matka nepodstoupila léčbu růstovým hormonem a její výška je pod 3. percentilem pro dospělou ženskou populaci. Matka je v remisi, syn je závislý na kortikoidech, nepravidelně dostává transfúze.

V rodině s mutací genu RPL11 jsou postiženy dcera (pacient CZUH47) a matka, obě mají faciální dysmorfie, anomálie palce a mírnou anémií. Matka má kratší horní končetiny. Dcera byla narozena s nízkou porodní hmotností ke gestačnímu věku, dosáhla ale průměrné výšky. Matka je nyní v remisi onemocnění, dcera je dlouhodobě léčena kortikoidy. Ve věku 36 let podstoupila léčbu pro difuzní velkobuněčný lymfom (DLBCL), nyní je v remisi onemocnění.

5.7 Korelace genotyp – fenotyp

Pacienti s identifikovanou mutací ribozomálního proteinu byli rozděleni do skupin podle typu mutace RP za účelem zjištění korelace mezi typem mutace RP, klinickým projevem nemoci a odpovědí na léčbu. Nejzajímavější vztah mezi genotypem a fenotypem je mezi anomáliemi doprovázejícími DBA a vztahem porodní hmotnosti ke gestačnímu věku.

Všichni pacienti českého registru DBA s mutací genu RPL5 anebo RPL11 mají defekt tvaru palce obvykle s další minimálně jednou tělesnou anomálií (ve většině případů se jedná o obličejový dysmorfismus a vysoké patro). Na druhou stranu, defekt tvaru palce nikdy nebyly pozorovány u mutace genu RPS19 ($p < 10^{-5}$), jen jeden pacient má atypické postavení palce. Velice zajímavý je rovněž fakt, že většina pacientů s identifikovanou mutací ribozomálního proteinu bez přídatné anomálie s výjimkou malého vzrůstu patří do skupiny mutací genu RPS19. Podobně jako u vrozených anomálií byly pozorovány výrazné rozdíly i mezi porodní hmotností pacientů s DBA. Nemocní s mutací genů RPL5 nebo RPL11 se obvykle rodí s nízkou hmotností vzhledem k jejich gestačnímu věku (87,5 % respektive 60 %), kdežto u pacientů s mutací genu RPS19 se malý vzrůst vzhledem ke gestačnímu věku vyskytuje pouze ve 25 %. U pacientů s mutací RPL5 (jeden pacient po léčbě růstovým hormonem) nebo RPL11 je rovněž častější malý vzrůst než u pacientů s mutací RPS19 (50 %, 40 % a 33 %).

Pokud se týká pacientů s mutací genu RPS26, zdá se, že tvoří odlišnou klinickou jednotku. Nemají deformity tvaru palce a ani faciální dysmorfie, jsou u nich však přítomny různé formy postižení skeletu: mikrocefalie, Sprengelova deformita, Klippelův-Feilův syndrom nebo deformity žeber. Pouze jeden pacient se narodil s hraniční hmotností vzhledem ke gestačnímu věku a všichni nemocní dosáhli průměrné výšky. Zdá se, že jen u této skupiny pacientů lze prokázat vztah mezi genotypem a průběhem nemoci, jelikož všichni pacienti s mutací genu RPS26 jsou dependentní na transfuzích. Naopak, skupina pacientů s mutacemi RPS19, RPL5 a RPL11 zahrnuje jak pacienty v remisi, pacienty kortikodependentní tak i pacienty závislé na transfuzní terapii.

Analýza laboratorních nálezů (eADA, sérový EPO, procento zastoupení erytroidních buněk v kostní dřeni a BFU-E v kostní dřeni) různých skupin pacientů neprokázala žádný vztah mezi výslednými hodnotami a specifickou mutací ribozomálního proteinu a ani mezi laboratorními výsledky a závažností klinického průběhu nemoci nebo odpovědi nemoci na léčbu.

5.8 Diskuze

Incidence DBA v České republice je podobná jako v ostatních registrech (4-10:1 milion živě narozených), i když poměr ženy:muži je v České republice 1:1,625 i přesto že obě pohlaví obvykle bývají postižena stejnou mírou. Věk v době diagnózy a počet předčasných porodů taktéž koresponduje s publikovanými pracemi. Rodinný výskyt onemocnění byl identifikován jen u 6/36 rodin (16,6 %), což je lehce nižší počet ve srovnání se zahraničními registry, kde se popisuje výskyt v rodinách mezi 17,5 – 40 % [55,122,189,190]. V našem registru je popsán vyšší výskyt přidatných vrozených anomálií (31 pacientů – 73,8 %), to je 1,5 - 2,5krát více než v ostatních dosud publikovaných souborech pacientů (30-50 %) [55,189]. 17 pacientů má nízký vzrůst (40 %) a jenom u 6 pacientů (14,3 %) nebyla pozorována žádná tělesná anomálie a ani nízký vzrůst. Všichni čeští pacienti s mutací RPL5 nebo RPL11 mají vadu palce ruky obvykle s ještě jednou nebo více přidruženými anomáliemi (obličejový dysmorfismus, vysoké patro, srdeční anomálie), ve srovnání jen s 50 % výskytu vrozených vad u pacientů s mutací RPS19. Rozdíl ve výskytu anomálie palce spojených s mutací genu RPL5 nebo RPL11 oproti mutaci RPS19 je statisticky vysoce významný. Podobné výsledky byly zjištěny ve velké mezinárodní databázi zahrnující 50 pacientů s mutací RPL5 36 pacientů s mutací RPL11 a 166 pacientů s mutací RPS19, u nichž byly některé malformace pozorovány u 84 %, 72,2 %, a 33,1 % pacientů. Opět platí, že anomálie palce, kraniofaciální dysmorfismus a rozštěpu rtu a/nebo patra vysoce převažovaly u pacientů s mutací RPL5 nebo RPL11 ve srovnání se skupinou s mutací RPS19 [191].

Četnost dětí s DBA, které mají malý vzrůst při narození vzhledem ke gestačnímu věku (35,7 %), je signifikantně vyšší než u zdravé populace novorozenců v ČR ($p < 0.001$). Tato hodnota je výrazně vyšší v porovnání s publikovanými výsledky. Boria et. Al. [191] popisuje incidenci pouze 3,2 % (9/285) a Chen et. al. [107] ve Francouzském DBA registru udává 20 % incidenci intrauterinní růstové retardace. Většina dětí malých pro svůj gestační věk ($n=10/15$) má mutaci genu RPL5 nebo RPL11.

Při porovnání fenotypu pacientů s mutací RPS26 s nemocnými s jinými mutacemi RP je patrné, že pacienti s mutací RPS26 se spíše projevovali kosterními abnormalitami než defektem palce a kraniofaciálním postižením, mají normální postavu a všichni jsou závislí na transfuzích. Počet nemocných s touto mutací v jiných registrech je však příliš nízký a je popsáno pouze několik anomálií, aby bylo možno naše pozorování potvrdit.

Bylo zjištěno vyšší riziko možnosti vzniku asociovaných maligních onemocnění u pacientů s DBA. Popsali jsme 2 případy – první pacient zemřel na AML ještě před jeho zařazením do

našeho registru, druhá pacientka byla léčena pro DLBCL a je druhým reportovaným pacientem v celosvětovém písemnictví [192] s tímto typem maligního onemocnění u DBA a současně prvním pacientem s DLBCL s mutací genu pro RPL11.

Šestnáct pacientů z české národní databáze DBA je závislých na transfuzích, 13 nemocných je v remisi a nepotřebuje žádnou terapii a 10 pacientů je léčeno kortikosteroidy. Tři pacienti podstoupili transplantaci kostní dřeně od svého HLA identického sourozence. 13 nemocných jsme zařadili do studie s leucinem. Jak již bylo uvedeno u všech pacientů byla pozorována zvýšená chuť k jídlu a přírůstek hmotnosti. U 11/13 pacientů bylo po 9 měsících sledování prokázáno signifikantní snížení sérového feritinu. U 5/13 pacientů bylo pozorováno postupné zvýšení počtu retikulocytů a hemoglobinu následované prodloužením intervalu mezi transfúzemi. U dvou pacientů bylo podávání leucinu ukončeno pro nespokojenost. Došli jsme k závěru, že i když není leucin léčebným prostředkem pro většinu pacientů, jeho podávání se zdá být pro pacienty s DBA prospěšné. Ke zlepšení diferenciální diagnostiky pacientů s DBA, zejména v případech bez popsané mutace RP genů, byla vyvinuta řada laboratorních metod, jako je vyšetření aktivity eADA, hladiny sérového EPO, případně stanovení BFU-E v materiálu kostní dřeně a klonogení testy. Aktivita eADA je u většiny pacientů s DBA zvýšená. Výsledky vyšetření jsou však validní pouze u pacientů, kteří nejsou závislí na podávání transfúzí. U pacientů z českého registru byla aktivita eADA zvýšená u 19/22 (86,4 %) netransfundovaných pacientů, ale u tří pacientů (CZUH 33, CZUH 24 a jeho matka) dosahovala opakovaně normálních hodnot. Stanovení hladiny eADA u netransfundovaných pacientů může urychlit určení správné diagnózy, zejména u pacientů bez prokázané mutace RP genu a taktéž může být nápomocné při vyhledávání potenciálních dárců kostní dřeně mezi rodinnými příslušníky pacienta. Na druhé straně normální aktivita eADA nevylučuje diagnózu DBA. Navíc je zvýšená aktivita eADA nejpravděpodobněji nespecifický fenomén spojený s defektní erythropoézou, protože byl pozorován i u myeloproliferativních onemocnění, akutní lymfoblastické leukemii a akutní myeloidní leukemii [56,193]. Aktivita eADA u transfundovaných pacientů je zřetelně ovlivněna dárcovskými erytrocyty a proto většina z těchto pacientů má falešně normální aktivitu eADA.

Naše zjištění normálního nebo dokonce zvýšeného počtu erytroidních prekurzorových buněk v kostní dřeni u 13 pacientů poukazuje na potenciální problémy v diagnostice DBA, zejména u „neklasických“ případů. U některých pacientů může být přítomen normální nebo dokonce zvýšený počet erytroidních prekurzorových buněk spolu s retikulocytopenií a přesto tito pacienti s DBA již dále nesplňují diagnostická kritéria. Pokud je takový pacient vyšetřen hematologem až v pozdějším věku, nemusí být u lehčích forem anémie stanovena správná

diagnóza DBA, zejména u jedinců bez známé mutace RP genu a/nebo normální aktivitou eADA. Tato situace nastala u všech tří matek pacientů s mutacemi genu RPL5 nebo RPL11 a u otce pacienta s mutací genu RPS19. Správná diagnóza byla u těchto pacientů stanovena až poté, co bylo onemocnění DBA diagnostikováno jejich dětem. Navíc pro přítomnost dysplastických rysů erytroidních prekurzorů a megakaryocytů byla matka pacienta CZUH04 původně sledována s diagnózou myelodysplastického syndromu. Její syn měl taktéž poměrně výrazné dysplastické změny megakaryocytů. Podobnost některých morfologických vlastností kostní dřeně u těchto DBA pacientů s mutací RPL5 s MDS 5q-syndromem je velmi zajímavá a je pravděpodobně důsledkem haploinsuficience RP. Podobné dysplastické změny megakaryocytů dosud u pacientů s DBA nebyly popsány.

Výsledky *in vitro* kultivací progenitorových buněk potvrdily výsledky jiných výzkumných týmů, tedy rozličný stupeň erytroidní odpovědi na podání SCF *in vitro*, a to i za nepřítomnosti erytroidního vyžrávání *in vivo*. Počet kolonií BFU-E u většiny pacientů s DBA byl i přes limitované možnosti růstových faktorů (5637 CM+EPO) jednoznačně nižší než u kontrolní skupiny pacientů. Avšak u čtyř nemocných jsme zaznamenali téměř normální hodnoty hladin BFU-E (u dvou pacientů v remisi a u dvou kortikodependentních pacientů). Také jsme prokázali, že kombinace supranormálních koncentrací rekombinantních růstových faktorů - EPO, GM-CSF, IL-3, SCF a IL-6 nebo jen samotného SCF, mohou v kostní dřeni u pacientů trpících DBA významně zvýšit růst BFU-E, a to až na téměř normální nebo normální hodnoty. Tento růst není závislý na klinické aktivitě nemoci, nebo na přítomnosti mutace genu RP. Dle našich zkušeností je zřejmé, že nelze jednoznačně využít stanovení růstu erytroidních kolonií pro určení diagnózy DBA, může být pouze částečně přínosné u pacientů bez průkazu mutace v genu RP. Klinické použití SCF ke zlepšení růstu kolonií není možné pro jeho potenciální závažné vedlejší účinky.

6 Deficit pyruvátkinázy

Deficit pyruvátkinázy (PK) byl prokázán sekvenováním genomické DNA u čtyř dětí ve věku 10 měsíců až 7 let. Všichni pacienti byli primárně vyšetřováni v hematologické ambulanci pro hemolytickou anémii nejasného původu. Jedná se o první dětské pacienty s deficitem PK v diagnostikované v České republice

6.1 Soubor pacientů

První dva nemocní jsou sourozenci, dívka a chlapec ve věku jeden a čtvrt roku a sedm let. Obě děti se narodily v termínu. Chlapec byl eutrofický s porodní hmotností 3130 g a délkou 51 cm, dívka hypotrofická s hmotností 2100 g a délkou 44 cm. Po porodu byly obě děti výrazně ikterické. Hyperbilirubinémie byla protrahovaná s nutností fototerapie. U chlapce byla dokonce indikována i výměnná transfúze. V kojeneckém věku byly obě děti sledovány pro hemolytickou makrocytární anémii, která si vyžádala opakované podání transfuzí. V klinickém nálezů dominovala nápadná bledost a mírná hepatosplenomegalie..

Dívka po uplynutí prvního roku života postupně přestala být závislá na substituci transfúzemi, jejich podání bylo obvykle potřeba po prodělaných infekcích. Chlapec nadále vyžaduje opakované podání erytrocytární masy. Rodiče sourozenců jsou zdraví.

Třetím pacientem je osmiletý chlapec, který byl odeslán k dovyšetření pro chronickou makrocytární anémii. Stejně jako u předchozích dětí se u něj anémie objevila již v novorozeneckém věku. Po porodu měl protrahovaný neonatální ikterus, pro který měl osm dní fototerapii. Hemolytická nemoc novorozence byla vyloučena. Pro anémii bylo opakovaně třeba podávat transfúze. Zvažoval se defekt membrány erytrocytu, proto byl proveden test kryohemolýzy, který vyloučil sférocytózu. Vzhledem k přetrvávajícím diagnostickým rozpakům byla provedena v jednom roce věku i punkce kostní dřeně, ve které byla zjištěna akcentovaná erytropoeza bez průkazu jiné patologie. Dále byl proveden test stability hemoglobinu, vyšetřena hladina fetálního hemoglobinu alkalickou denaturací a autohemolýza, vše s fyziologickým nálezem. Chlapec byl nadále sledován hematologem pro středně těžkou makrocytární anémii spojenou s retikulocytózou a mírnou elevací nekonjugovaného bilirubinu. Terapii nevyžadoval. Při klinickém vyšetření byla na chlapci nápadná jen bledost, organomegalie přítomná nebyla. Matka chlapce je sledována pro sideropenickou anémii, jiné onemocněné krve se v rodině nevyskytuje.

Čtvrtý pacient je 18 měsíční chlapec, který byl poprvé vyšetřen v hemato-onkologické ambulanci 38. den svého života pro hemolytickou anémii nejasného původu. Na naše pracoviště byl odeslán přímo z novorozenecké kliniky, kde byl hospitalizován až do 30. dne života. Jedná se o první dítě nezletilé matky, která měla v době porodu pouze 16 let. Těhotenství bylo sledováno až od 20. týdne gravidity. Porod proběhl ve spádové nemocnici akutně císařským řezem ve 40+2 gestačním týdnu. Plodová voda byla zkalená. Dítě bylo donošené, porodní hmotnost 3020 g a délka 49 cm. Po vybavení byla nutná krátká insuflace kyslíku pro bezdeší a bradykardii. Ve 3. minutě se objevilo lapavé dýchání a později poklesy saturace, (SIO₂ 40-70 %) které si vyžádaly intubaci a transport do neonatologického centra. Opakovaně odešla smolka s příměsí krve. V klinickém nálezů dominovala apatie, hypotonie s miotickými zornicemi a výrazně ikterická barva kůže i sklér. Již při prvním biochemickém vyšetření krve se objevila vysoká hladina bilirubinu (228 μmol/l) společně se zvýšenými hodnotami jaterních testů (ALT 4,01 ukat/l). Byla zahájena intenzivní fototerapie. Hemolytická nemoc novorozence byla vyloučena, matka má krevní skupinu O+ a v těhotenství byly 2x vyšetřovány protilátky, vždy s negativním nálezem. Nebyly přítomny známky zánětu. V krevním obraze dominovala těžká anémie s hemoglobinem 75 g/l, proto byla podána erytrocytární transfúze. V následujících šesti hodinách došlo opět k významnému nárůstu hodnoty bilirubinu na 246 μmol/l, byla indikována výměnná transfúze. Druhý den života se objevila i těžká trombocytopenie (14×10^{12}) a byla aplikována transfúze trombocytů. Vzhledem k velmi intenzivnímu ventilačnímu režimu a vysokým nárokům na kyslík bylo provedeno echokardiografické vyšetření, při kterém byly zjištěny známky plicní hypertenze. Během druhého dne života se objevily křeče končetin, ale na EEG bez průkazu křečové aktivity. Hodnoty bilirubiny se pohybovaly ve III. pásmu dle Hodra, proto bylo pokračováno ve fototerapii. Třetí den života se přidala další komplikace ve formě plášťového pneumotoraxu, který byl řešen konzervativně. Opět se objevila trombocytopenie s nutností substituce trombocytů. Hladina bilirubinu kulminovala 5. den na hodnotě 351 μmol/l s vyšším podílem konjugovaného bilirubinu (197 μmol/l) a to i přes kontinuální fototerapii dvěma světly. Celková doba fototerapie byla 6 dní. 6. den byl hoch extubován a ještě do 13. den vyžadoval oxygenoterapii. Poté byl již stav stabilizován, v dalším průběhu hospitalizace došlo opakovaně k anemizaci, ale bez potřeby podání transfúzí.

U dítěte byla patrná mikrognacie, polydaktylie horních i dolních končetin se syndaktylií na levé noze, výrazná hepatosplenomegalie a levostranný kryptorchismus. Polydaktylie pravé ruky byla řešena již v novorozeneckém věku, kdy byl nadbytečný prst plastickým chirurgem odstraněn

6.2 Metody

U všech dětí bylo provedeno základní vyšetření krevního obrazu a to včetně nátěru periferní krve k morfologickému zhodnocení erytrocytů. Biochemické vyšetření zahrnovalo vyšetření laktátdehydrogenázy, volného hemoglobinu, haptoglobinu a bilirubinu (konjugovaného i nekonjugovaného) a markerů metabolismu železa. Ze specializovaných vyšetření se jednalo o test kryohemolýzy, průkaz Heinzových tělísek, elektroforézu hemoglobinu a test tepelné stability.

6.2.1 Stanovení aktivity pyruvátkinázy a G6PD

Z periferní krve odebrané do heparinu byly odstraněny leukocyty a trombocyty filtrací přes směs mikrokrytalické celulózy s α -celulózou a poté byl připraven enzymový lyzát. Po odstranění plazmy centrifugací byla vytvořena buněčná suspenze ve fyziologickém roztoku (1:1). Konečný enzymový lyzát byl zhotoven po přidání buněčné suspenze do stabilizačního roztoku obsahujícího EDTA a merkaptoethanol (1:9). Aktivita PK (E.C.2.7.1.40) byla stanovena spektrofotometricky v temperované směsi (37 °C) obsahující laktátdehydrogenázu, ADP, fosfoenolpyruvát a NADH sledováním poklesu absorbance při 340 nm (Infinite 200 NanoQuant, Tecan, Švýcarsko). Specifická aktivita (U/g) byla vztažena k množství hemoglobinu v lyzátu stanoveném také spektrofotometricky při 414 nm [136].

Aktivita G6PD byla určena rovněž spektrofotometricky pomocí komerčního kitu (The microplate neonatal G6PD screening assay, Bio-Rad Laboratories, Anglie).

6.2.2 Sekvence genu PKLR a HFE1

Genomická DNA byla izolována z periferní krve pomocí QIAamp DNA kitu (Qiagen, USA). Všechny exony byly amplifikovány pomocí PCR. Pro sekvenační reakci odpovídajících PCR fragmentů byl použit BigDye terminator kit v1.1 (Applied Biosystem, USA) a sekvenační analýzy byly provedeny na sekvenátoru ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, USA).

6.2.3 Stanovení hladiny hepcidinu

Hladiny hepcidinu byly stanoveny v plazmě (bioaktivní forma hepcidinu-25). Plazma byla zamražena při -80°C. K měření hladin hepcidinu bylo použito komerčního ELISA-kitu (DRG

Instruments, Německo). Parametry metody dle výrobce byly následující: dynamický rozsah 0,9-140 ng/ml, senzitivita této metody byla stanovena na 0,9 ng/ml, reprodukovatelnost – intra assay CV 4,86 %, inter assay test CV 11,42 %.

6.3 Výsledky

U všech dětí byla potvrzena makrocytární anémie provázená retikulocytózou s hladinou hemoglobinu v rozmezí 64-97 g/l a počtem retikulocytů od 8 do 19 % (tab. 4). Hodnoty LDH a bilirubinu byly také u všech nemocných mírně zvýšené, bilirubin se pohyboval v rozmezí od 38 po 89 $\mu\text{mol/l}$. U druhého pacienta (chlapec ze sourozeneckého páru) byla nalezena zvýšená hodnota feritinu 716 $\mu\text{mol/l}$ a v nátěru jeho periferní krve byly prokázány nespecifické morfologické změny erytrocytů: polychromazie spolu s anizocytózou (tab. 4).

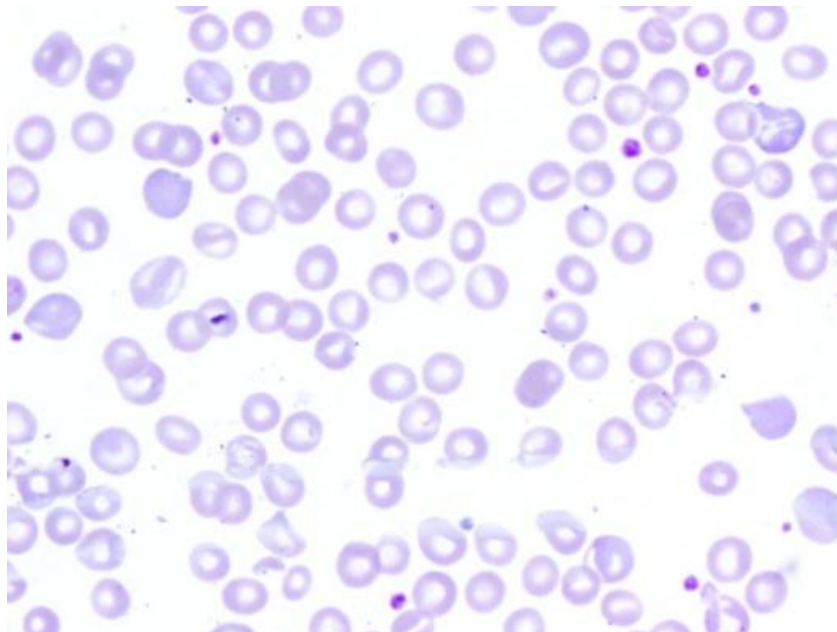
Výše zmíněná speciální vyšetření vyloučila poruchu membrány erytrocytů i nestabilní hemoglobinopatie.

U čtvrtého chlapce byla v nátěru periferní krve rovněž přítomna polychromazie, anizocytóza, ale i terčovité erytrocyty, stomatocyty a echinocyty (obr. 8). Měl i vysoký počet normoblastů - 38 %. Biochemické vyšetření navíc na rozdíl od ostatních dětí potvrdilo velmi vysoké hodnoty feritinu (3798 $\mu\text{mol/l}$) a elevované jaterní enzymy. Hodnota erytropoetinu byla v mezích širší normy. Ultrazvukové vyšetření prokázalo hepatomegalii i mírnou splenomegalii., Pro opakovanou anemizaci bylo nutno opakovaně podávat transfúze a pro nárůst hladiny feritinu až na 4853 $\mu\text{mol/l}$ bylo indikováno i zahájení chelatační léčby intravenózně podávaným desferioxaminem, V odstupu 3 měsíců postupně došlo k pozvolnému poklesu feritinu (1539 $\mu\text{mol/l}$).

Tabulka č. 4 Vyšetření krevního obrazu a biochemických nálezů u pacientů s deficitem PK

	Hemoglobin g/l	Erytrocyty x 10 ⁹ /l	MCV fl	MCH p/g	Retikulocyty %	Bilirubin $\mu\text{mol/l}$	LDH ukat/l	Feritin ug/l
Pacient č.1	71	2,2	102,3	32,3	0,124	54	15,4	19
Pacient č.2	64	2,46	92,6	31,5	0,190	81	13,16	716
Pacient č.3	97	3,12	88,8	31,1	0,081	38	5,58	205
Pacient č.4	77	2,76	84,4	27,9	0,024	89	3,75	4853

Obrázek č. 8 Nátěr periferní krve pacienta č. 4 s deficitem PK



U tří pacientů byla provedena i punkce kostní dřeně, která vyloučila sideroblastickou anémii. U dívky a třetího pacienta bylo zjištěno výrazné zmnožení buněk erytroidní řady, a to především mladých forem se známkami mírné dysplazie.

U čtvrtého chlapce byla také vyšetřena kostní dřeň s nálezem početně přiměřené erythropoezy, která měla rovněž dyserytropaetické rysy. Hoch podstoupil punkci kostní dřeně opakovaně, během 6 měsíců došlo k výraznému zvýšení počtu prekurzorových buněk až na 73,2 % a ke zvýraznění dyserytropaetických rysů.

U všech dětí byla hodnocena aktivita enzymu pyruvátkinázy, která byla ve všech případech snižena. Její hodnoty odpovídaly přibližně třetinové hladině v porovnání se zdravými jedinci. Je zajímavé, že při stanovení hladin aktivity G6PD a PK na jiném pracovišti nebyl deficit enzymů u dětí ani u rodičů prokázán.

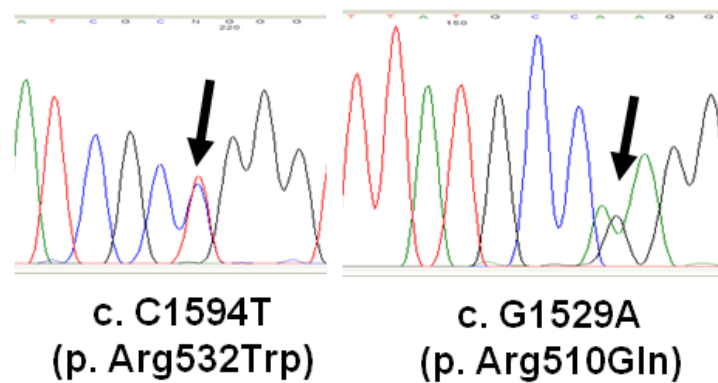
K potvrzení diagnózy byl u dětí sekvenován gen pro PK, u všech byla nalezena kauzální mutace (tab. 5). Oba sourozenci jsou smíšené heterozygoti pro v literatuře již popisované mutace c.1529C>A(p.Arg510Gln) a c.1594C>T(p.Arg.532Trp) (obr. 9), které jsou lokalizované na 11. exonu. Třetí pacient má také smíšenou heterozygotní mutaci c.1493G>A(p.Arg498His) a c.1529C>A(p.Arg510Gln) (obr. 10). U čtvrtého dítěte byla nalezena delece v 11 exonu, jedná se o homozygotní mutaci, která vede k posunutí čtecího

rámce přepisu mRNA do kratšího proteinového řetězce, kde pravděpodobně chybí část nebo celá aktivační doména.

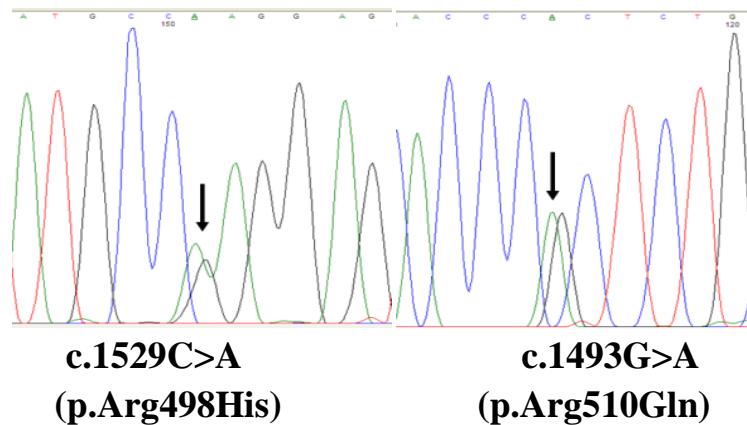
Tabulka č. 4 Výsledky molekulárně genetických analýz pacientů s deficitem PK

	Mutace	Aktivita enzymu pyruvátkináza	Aktivita G6PD	Zastoupení červené řady v kostní dřeni %
Pacient č.1	c.1529C>A (p.Arg510Gln) a c. 1594C>T (p.Arg532Trp)	25%	8,48	74,1
Pacient č.2	c.1529C>A (p.Arg510Gln) a c. 1594C>T (p.Arg532Trp)	56%	8,13	-
Pacient č.3	c.1493G>A (p.Arg498His) a c.1529C>A (p.Arg510Gln)	32%	5,77	40
Pacient č.4	homozygotní delece v exonu 11, která vede k posunu čtecího rámce a přepisu mRNA do kratšího proteinového řetězce, kterému chybí část nebo celá aktivační doména	30%	5,83	73,2

Obrázek č. 9 Mutace genu pro PK u pacienta č.1 a 2



Obrázek č. 10 Mutace genu pro PK u pacienta č. 3



U nemocných bylo doplněno i vyšetření hladiny hepcidinu, která byla u prvního chlapce na dolní hranici normy, což nekorelovalo se zvýšenou hladinou feritinu. U dalších dvou dětí byly hladiny hepcidinu fyziologické.

Protože u čtvrtého pacienta i nadále přetrvával obraz těžkého přetížení železem a vyšetřovaná hladina hepcidinu byla paradoxně výrazně snížena (11,3 ng/ml), bylo u něj provedeno vyšetření k vyloučení vrozené hematochromatózy. Molekulárně-genetické vyšetření mutací c.845C>A (p.Cys 282Tyr), c.187C>G (p.His63Asp), c.193A>T (p.Ser65Cys) a mutací pro hemojuvelin, hepcidin a transferinový receptor 2 žádnou z nich neprokázalo. Další výsledky DNA analýzy vyloučily Praderův-Willyho syndrom i přítomnost častějších mikrodelečních syndromů. Dle klinického nálezu byla zvažována i diagnóza Bardetova-Biedlova syndromu, případně i mutace genu pro karnitin-palmitoyl-transferátu 1A (CPT1A). Tuto koincidenci by mohla vysvětlit velmi suspektní kosanguinita, ale ani jedna z možností zatím nebyla genetickým vyšetřením potvrzena. Dítě je také v péči hepatologa pro hemosiderózu IV. stupně, neurologa pro opožděný psychomotorický vývoj a alergologa pro asthma bronchiale. Nadále je závislý na transfúzní a chelatační terapii.

6.4 Diskuze

Výše popsaný soubor pacientů poukazuje na různorodost klinických projevů při deficitu PK. Dle již v teoretické části zmíněných italských autorů by mutace 1529A měla vést ke středně těžké (Hb 80-100 g/l, podání 10 a méně transfúzí) a mutace 1594T mírné (více než 100 g/l Hb) anémii [125]. Přesto u obou sourozenců s potvrzenou smíšenou mutací c.1529C>A (p.Arg510Gln) a c.1594C>T (p.Arg532Trp), byla nutná transfúzní terapie. Stejně tak hodnoty Hb v rozmezí 64-73 g/l také spíše svědčí o těžké formě anémie. Zajímavý je i fakt, že mutace c.1529C>A (p.Arg510Gln), která byla prokázána u tří dětí, je typická pro střední Evropu, nepodařilo se ovšem u žádného pacienta prokázat mutaci c.1594C>T, která má být charakteristická pro slovanskou populaci. Korelace mezi genotypem a fenotypem není tedy přesně známá, ale předpokládá se, že velké delece a mutace, které mění čtecí rámec, patří mezi klinicky nejzávažnější. To potvrzuje i náš čtvrtý pacient, který má ze všech dětí nejtěžší formu nemoci.

Na přetížení organismu železem u nemocných s deficitem PK může mít podíl mnoho faktorů, a to jak opakované podávání transfúzních přípravků, tak probíhající hemolýza, ale i neefektivní erythropoeza. Vždy je vhodné vyloučit mutace genů pro hemochromatózu

p.C282Y, p.H63D a p.S65C. Možná koincidence obou nemocí není neobvyklá. Literární zdroje udávají, že až u 20 % Evropanů lze nalézt mírnou změnu v metabolismu železa spojovanou s heterozygotním nosičstvím pro hlavní mutaci hemochromatózy p.C282Y, zatímco ještě více je v populaci zastoupena heterozygotní mutace p.H63D. Recentní studie objevily abnormality v HFE-genu u 35 % pacientů s PK deficitem nezávislých na podávání transfúzních přípravků. Tyto abnormality jsou spojeny se zvýšením hladiny feritinu a Fe v séru [134]. U posledního chlapce se nepodařilo prokázat žádnou z těchto mutací, můžeme se domnívat, že za extrémně vysokou hodnotou feritinu stojí tedy časté podávání erytrocytárních transfúzí spolu s výraznou hemolýzou, hypofunkční erytropoézou a paradoxně nižší hladina hepcidinu. Přetížení organismu železem bylo popsáno i polytransfundovaných pacientů s deficitem PK, kteří podstoupili splenektomii.

Hepcidin je klíčovou molekulou, regulující přísun železa do lidského organismu a jeho rovnováhu jak na úrovni buněk, tak celého organismu. Erytropoetická aktivita pravděpodobně kontroluje hladinu hepcidinu signálními molekulami GDF15 a TWSG1. Tyto molekuly reagují na anémii. Zdá se, že stav erytropoezy je nadřazen všem mechanismům regulujícím hladinu hepcidinu a tím i metabolismus železa v organismu. Při anémii klesá hladina hepcidinu, zejména u stavů spojených se zvýšenou potřebou železa. Příkladem je sideropenická anemie, kdy se organismus snaží kompenzovat zvýšeným vstřebáváním železa střevem. To je umožněno poklesem hladiny hepcidinu. Jeho hladina naopak stoupá u vrozených hemochromatóz, u chorob sekundárně zvyšujících hladinu železa a u akutního zánětu. U pacientů s prokázaným deficitem pyruvátkinázy se prokázala kombinace obou faktorů ovlivňujících hladinu hepcidinu. Jedním faktorem je anemie se zvýšenými nároky na přísun železa při zvýšené erytropoeze, druhým faktorem je zvýšená nabídka železa s vysokou hladinou feritinu. V tomto případě, jak již bylo dříve uvedeno, je těžká anemie nadřazena signálům z přetížení železem. Produkce hepcidinu je negativně regulována GDF15, čímž je snížena hladina hepcidinu. To vede ke zvýšené rezorpci železa ze střeva, a to zhoršuje míru přetížení železem. U posledního dítěte byla prokázána snížená hladina hepcidinu, která mohla participovat na velmi vysoké hladině feritinu. K vyloučení koincidence s ostatními typy vrozené hemochromatózy bylo pro úplnost provedeno sekvenování HFE2A genu pro hemojuvelin a HFE3 genu pro transferinový receptor 2 s negativním nálezem.

Je třeba upozornit na nutnost opatrné interpretace výsledků stanovení hladiny PK, jelikož u pacientů po transfúzi může dojít k hodnocení aktivity enzymu dárcovských erytrocytů. Pokud nejsou odstraněny kompletně leukocyty, jsou hodnoty také zkreslené. Aktivita PK enzymu je až 300x vyšší v leukocyty než v erytrocytu [125].

Tímto je teoreticky možné vysvětlit falešně negativní výsledek při stanovení aktivity PK na předchozích pracovištích.

Přesto, že deficit pyruvátkinázy je nejčastější enzymatickou abnormalitou glykolytické dráhy, která způsobuje dědičnou hemolytickou nesférocytární anémii, v České republice bylo u dětí zatím popsáno pouze několik případů. Je tedy zřejmé, že mnoho onemocnění deficitem PK je v naší zemi poddiagnostikováno, nebo jsou pacienti vedeni pod špatnými diagnózami. Dle celosvětové prevalence 1:20.000 [125] by v České republice mělo být přibližně 500 osob trpící touto nemocí. U našich pacientů jde o první dětské pacienty s průkazem kauzální mutace genu PK-LR. Soubor pacientů poukazuje na variabilitu klinických příznaků u pacientů s deficitem PK, která může být vzácně provázena závažným přetížením železem. U pacientů nestačí ke stanovení diagnózy pouze určení aktivity enzymu, která může být falešně negativní. Sekvenace genu pro PK je nezbytná.

7 Parvovirus B19

7.1 Pacienti

Infekce parvovirem B19 byla prokázána u osmi dětských pacientů ve věku 3 až 14 let, u sedmi z těchto pacientů byla přítomna anémie. Jednalo se o šest chlapců a dvě dívky.

Prvních pět pacientů bylo vyšetřováno v hematologické ambulanci nebo na hematologickém oddělení Dětské kliniky pro těžkou anémii nejasné příčiny. Jednalo se o dvě dívky a tři chlapce ve věkovém rozmezí 7 až 11 let. Podle anamnestických údajů proběhla u všech pacientů v předchorobí infekce s teplotou. U dvou dětí se jednalo o gastroenteritidu, u jednoho o tracheobronchitidu a u posledních dvou o celkovou slabost doprovázenou teplotou. Kromě jedné dívky, která byla sledována s podezřením na morbus Gilbert vzhledem k nápadnému ikteru sklér, nebyly ostatní děti nikde dispenzarizovány a s žádným onemocněním se neléčily. Při následném vyšetření krevního obrazu byla u všech dětí zjištěna závažná anémie, a to v rozmezí 44-79 g/l hemoglobinu. Při detailnějším fyzikálním vyšetření u pacientů dominovala bledost, subikterus sklér a zvětšená slezina, která byla i sonograficky potvrzena.

Dalším pacientem byl 14ti-letý chlapec, který byl přijat na jednotku intenzivní péče Dětské kliniky pro febrilie s kašlem a dyspnoí. Tento hoch byl od tří let věku sledován pro recidivující infekce dýchacích cest. Po přijetí bylo provedeno rentgenové zobrazení srdce a plic a doplněno i echokardiografické vyšetření srdce, kde byl prokázán výpotek v obou pleurálních dutinách a také v perikardu s počínajícími známkami srdeční tamponády. U dítěte byla ihned zahájena třídenní léčba vysokodávkovanými kortikoidy. Při sledování laboratorních odběrů se postupně u chlapce rozvíjela trombocytopenie, počet trombocytů klesl k $10 \times 10^9/l$, a objevila se i mírná neutropenie a anémie s hodnotami hemoglobinu kolem 115 g/l.

Dalším nemocným byl 3,5letý chlapec, který byl ošetřen na pohotovostní ambulanci Dětské kliniky pro čtyři dny trvající febrilie spojené se zvracením, nechutenstvím a bolestí břicha. Při fyzikálním vyšetření byla u chlapce prokázána počínající dehydratace a byl přijat na standardní oddělení k parenterální rehydrataci s diferenciatně diagnostickou diagnózou gastroenteritidy. Klinicky byl hoch bledý, měl chladnější periferii, byl zpocený, kožní turgor byl snížený a palpačně byla hmatná mírná hepatomegalie. Byly provedeny základní laboratorní odběry a zahájila se rehydratační terapie. Po dvou hodinách došlo k progresi

hepatomegalie a rozvoji tachykardie (170 pulsů za minutu). Pacient byl přeložen na jednotku intenzivní péče, kde bylo provedeno rentgenové vyšetření srdce a plic s nálezem rozšíření srdečního stínu (obr. 11). Bylo doplněno echokardiografické vyšetření, které odhalilo závažnou dilataci levé komory a systolické selháním myokardu, trikuspidální insuficienci 2. stupně a mitrální insuficienci 3. stupně. Ejekční frakce byla jen 12 %. V laboratorních výsledcích byla nalezena zvýšená hodnota troponinu T. Ihned byla zahájena léčba kardiálního selhávání podáním dobutaminu, milrinonu a levosimendanu. I přes tuto léčbu za 3 hodiny došlo k asystolii, pacient byl ihned kardiopulmonálně resuscitován a napojen na umělou plicní ventilaci. I přes protražovanou kardiopulmonální resuscitaci se u něj nepodařilo obnovit sinusový srdeční rytmus a osm hodin od přijetí chlapec zemřel.

Obrázek č.11 RTG snímek hrudníku u pacienta s parvovirovou infekcí a Myokarditidou



Poslední pacient je nyní dvanáctiletý chlapec, který byl od narození sledován pro rozsáhlý hemangiom v malé pánvi. V roce věku podstoupil exstirpaci hemangiomu zasahujícího do sacrococcygeální a preacoccygeální oblasti včetně odstranění kostrční kosti. Od šesti let věku užívá preparáty železa pro sideropenickou anémii. V deseti letech byl přijat na hematologické oddělení k došetření pro těžkou anémii a leukopenii. Primárně byl hospitalizován ve spádové

nemocnici, kde pro hladinu hemoglobinu 49 g/l byla podána transfúze erytrocytární masy a vzhledem k úvodním febriliím až 40,3 °C a přetrvávajícími subfebriliemi byl přeložen na klinické pracoviště.

7.2 Metody a vyšetření

U všech nemocných byly provedeny základní laboratorní vyšetření: krevní obraz a biochemické vyšetření krve k vyloučení hemolýzy a zhodnocení funkce jater. U konkrétních pacientů byly sledovány markery srdečních funkcí či doplněno specializované imunologické vyšetření. U posledního pacienta se pravidelně sleduje metabolismus železa, proto byly odběry doplněny o markery metabolismu železa, resorpční test železa a test kryohemolýzy, který byl proveden také u souboru dětí sledovaných pro nejasnou anémii. U dvou pacientů byla vyšetřena kostní dřeň.

7.2.1 Sérologické vyšetření

Titration protilátek IgG a IgM byl u všech pacientů stanoven metodou ELISA za použití komerčního kitu (Genzyme Virotech GmbH).

7.2.2 Izolace DNA ze vzorků kostní dřeně

K izolaci DNA byla použita separace na mikrokolonkách NucleoSpin Blood Kit (Macherey-Nagel, Düren, Německo). Izolovaná DNA byla uchovávána při teplotě -20 °C. Postup izolace byl dle návodu výrobce.

7.2.3 Kvantifikace DNA Parvoviru B19 metodou qPCR

Pro stanovení množství Parvoviru B19 z materiálu byla použita kvantitativní real-time PCR (qPCR) (dle Gruber F,2001). Amplifikační reakce probíhala v 20ul purifikované DNA z klinických vzorků a 30ug PCR amplifikační směsi (50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH 8,3, 5mM MgCl₂, 200mM každého deoxynukleosidtrifosfátu, 2,5U Hot Start Taq Polymerase (Sigma Aldrich) a 200nM každého primeru s 100nM TaqMan hydrolyzační sondy značené FAM (Generi Biotech,s.r.o, Hradec Králové). Amplifikační reakce proběhla

v mikrozkmavkách v přístroji RitirGene 6000 (Corbett). S následujícím teplotním profilem: počáteční denaturace 10 minut při 95 °C a následně amplifikační 40 cyklů (95° C 15 s, 60 °C 60 s). Validace metody byla provedena externí kontrolou kvality v mezinárodním systému Quality Control for Molecular Diagnostics, Glasgow, UK. Pozitivní vzorky byly použity jako kalibrátory.

7.3 Výsledky

U všech dětí z prvního souboru byla prokázána anémie s útlumem erythropoézy s následnou retikulocytózou s hladinou hemoglobinu v rozmezí 44-79 g/l (tab. 6). Z biochemických parametrů byly hodnoty LDH a bilirubinu zvýšené, haptoglobin byl spotřebován (tab. 7). Při zjišťování typu anémie u všech dětí ze souboru potvrdil test kryohemolýzy sferocytózu, která byla zřejmá i z nátěru periferní krve. Metodou PCR se podařilo prokázat DNA Parvovira B19 v krevních vzorcích od všech dětí. Byla stanovena diagnóza aplastické krize při infekci Parvovirem B19 jako první manifestace hereditární sférocytární anémie. U dvou pacientů se do čtrnácti dnů vyvinul typický exantém potvrzující správnost naší diagnózy. Pozitivní rodinná anamnéza byla jen u jednoho dítěte, které nikdy nebylo pro toto onemocnění vyšetřováno.

Tabulka č. 6 Hodnoty krevního obraz u souboru pacientů s hereditární sférocytozou a aplastickou krizí při parvovirové infekci

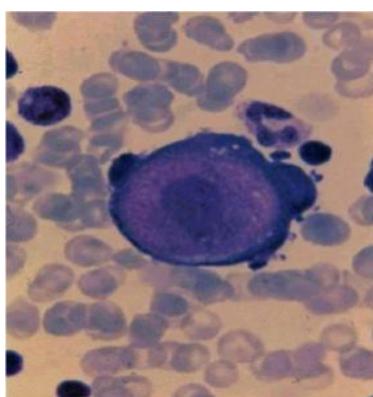
Ery x 10 ¹² /l	MCV fl	HB g/l	Ret%	Hb ery (pg)	Le x 10 ⁹ /l	Tr x 10 ⁹ /l	Hkt
1,65	83,6	55	1,9	39,9	7,7	143	0,13
1,9	80	54	1,1	28,4	34,4	531	0,154
2,64	80,2	77	5,2	32,5	15,99	196	0,27
1,68	-	44	0,6	-	4,6	157	0,11
2,78	78,4	79	6	36,2	8,21	335	0,26

Tabulka č. 7 Hodnoty biochemických vyšetření u souboru pacientů s hereditární sférocytózou a aplastickou krizí při parvovirové infekci

LDH uka/l	Bilirubin umol/l	Haptoglobin g/l	Test kryohemolýzy
5,79	79	0,39	17,7%
5,61	32	0,04	39%
10,71	36	0,06	41%
8,42	19	0,04	23,7%
8,94	39	0,04	62,5%

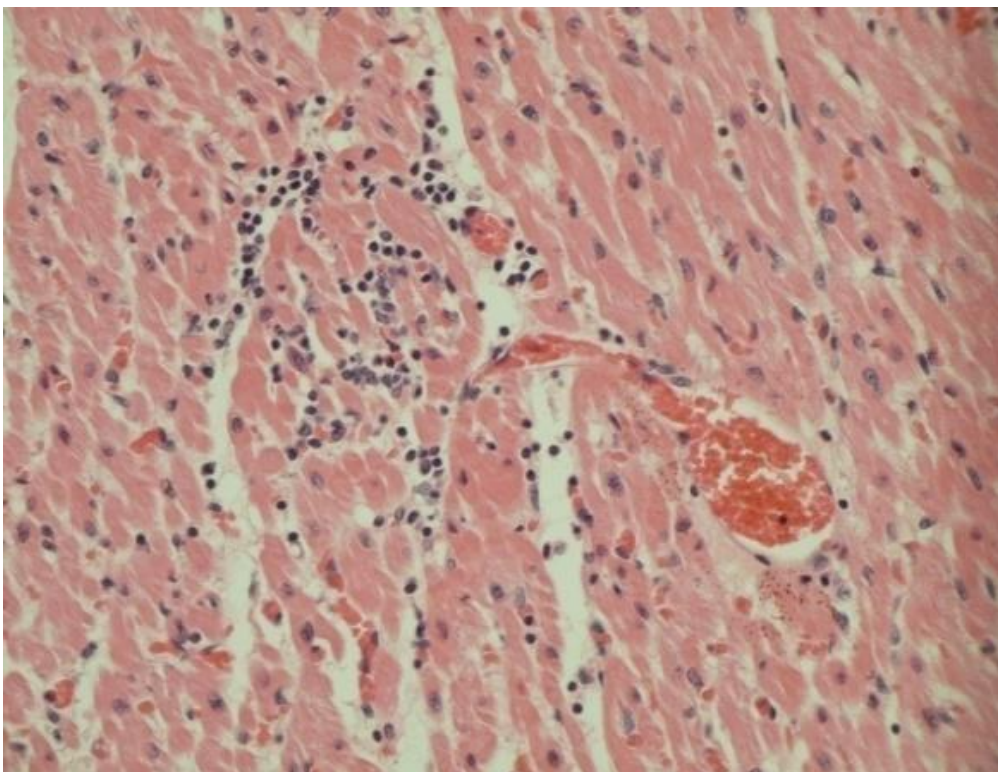
U 14 ti-letého chlapce byla provedena punkce kostní dřeně, která vyloučila hemoblastózu a cytologickým hodnocením byla stanovena normální buněčnost kostní dřeně s lehce nižším zastoupením prekurzorových buněk erytropoézy. Byl nalezen větší počet aktivovaných makrofágů s hemofagocytózou. Diagnostická kritéria pro hemofagocytující lymfohistiocytózu kromě pancytopenie a vyšší hladiny feritinu však nebyla splněna. Současně byl vzorek kostní dřeně odeslán k detekci Parvoviru B19 pomocí PCR, díky které byla přítomnost viru prokázána (obr. 12). V periferní krvi byly nalezeny protilátky třídy IgG i IgM jako potvrzení proběhlé infekce Parvovirem B19. Vzhledem k závažnému celkovému zdravotnímu stavu nemocného byla zahájena eradikační léčba parvoviru B 19 imunoglobuliny (IVIG) ve vysokých dávkách – 0,4 g/kg po dobu pěti dní. Léčbu bylo po šesti týdnech nutné zopakovat a to ve formě dvou dávek IVIG 0,8 g/kg v odstupu 72 hodin. V návaznosti na tuto terapii postupně došlo k ústupu výpotků a téměř k normalizaci krevního obrazu s přetrváváním lehké normocytární anémie. Chlapec byl následně kompletně imunologicky vyšetřen, byla u něj prokázána vrozená porucha imunity - běžná variabilní imunodeficeience (CVID), která si vyžaduje pravidelné podávání imunoglobulinů a je v trvalé péči imunologů.

Obrázek č. 12 Patologický obrovský proerytroblast v kostní dřeni
nález typický pro infekci parvovirem B19



U 3,5 letého definitivní diagnózu stanovila až pitva, byla prokázána akutní lymfocytární myokarditida a gastroenteritida. Bioptické vyšetření myokardu prokázalo výraznou lymfocytární infiltraci v intersticiu a nekrózu myocytů (obr. 13). U dítěte se bohužel infekce parvovirem B19 potvrdila také až ze sekčního materiálu, čímž byla zpětně prokázána etiologie myokarditidy. Laboratorní výsledky neprokázaly postižení erytropoézy, ale potvrzují literární informace o možnost postižení nezralých buněk myokardu Parvovirem B19, který může způsobit fulminantně probíhající myokarditidu.

Obrázek č. 13 Lymfocytární infiltrace v intersticiu myokardu



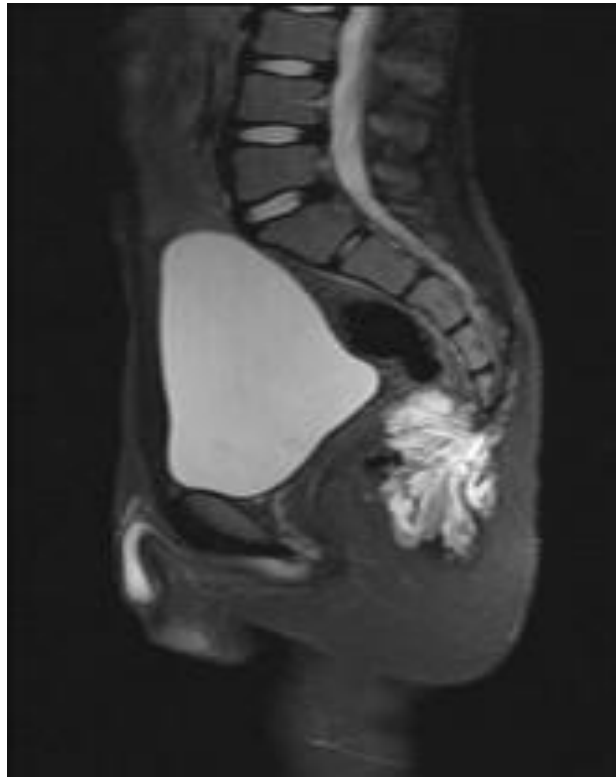
U posledního pacienta byla provedena punkce kostní dřeně s vyloučením hemoblastózy a s nálezem těžké hypoplazie erytropoézy (5,2 %). PCR metodou byl prokázán masivní nález DNA Parvoviru B19 jak v kostní dřeni, tak v periferní krvi. U chlapce byla diagnostikována tranzitní aplastická krize při parvovirové infekci. Pacient byl léčen vysokodávkovanými imunoglobuliny, po kterých se jeho stav výrazně zlepšil. Až 14 dní po propuštění se objevil celotělový enantém (obr. 14), typický pro pátou dětskou nemoc, v tu dobu byly hodnoty Hb a leukocytů již normalizovány.

Obrázek č. 14 Parvovirový exantém na horní končetině



V jedenácti letech se opět objevila sideropenická anémie. Vyšetření stolice prokázalo infekci *Helicobacterem pylori*, která byla potvrzena i endoskopicky a následně byla zahájena eradikační léčba. Za šest měsíců došlo k dalšímu poklesu hemoglobinu, opakovaně byla prokázána krev ve stolici testem na okultní krvácení, proto gastroenterolog indikoval provedení MR enterografie. V oblasti colon descendens a orální části colon sigmoideum byla nepravidelně rozšířená stěna střevní s výraznějším sycením kontrastní látkou (obr. 15). Endoskopicky byla potvrzena progresse hemangiomu sigmoidea (obr. 16). Vzhledem k proliferační aktivitě byla zahájena léčba propranololem, po které následovaly opakované transrektální sklerotizace hemangiomu etanolem. Postupně došlo k zmenšení hemangiomu, ale léčba nadále trvá.

Obrázek č.15 Magnetická rezonance - vyšetření malé pánve
Rozsáhlý hemangiom



Obrázek č.18 Hemangiom v sigmoideu při kolonoskopii



7.4 Diskuze

V případě, kdy jsou vyjádřeny klasické klinické projevy nemoci, nečiní diagnóza infekce parvovirem B19 u pacienta obvykle potíže. Rozpaky při diagnostice však mohou nastat u vzácných manifestací choroby, především u imunosuprimovaných jedinců. 14letý chlapec měl prvotní klinické příznaky nespecifické, hematologické příznaky však vzbudily podezření na parvovirovou infekci. Všechny projevy onemocnění u pacienta odpovídají popsaným příznakům parvovirové infekce. Pleurální a perikardiální výpotky jsou popsány vzácně [194,195], a to právě u imunosuprimovaných pacientů. Poměrně často jsou u parvovirové infekce zaznamenány anemie a trombocytopenie. U našeho pacienta se na jejich vzniku, kromě cytopatického působení viru a protilátek proti trombocytům, mohla podílet i hemofagocytóza, námi prokázaná v kostní dřeni. Obzvláště těžký a protražovaný průběh infekce vedl k pátrání po diagnóze vrozeného deficitu imunity s následným odhalením CVID. Právě u pacientů s primárním a sekundárním imunodeficitem je popisován velmi závažný průběh infekce parvovirem, která se může manifestovat hepatitidou [196], pancytopenií [197], hemofagocytující lymfohistiocytózou, vzácně generalizovanou infekcí s multiorgánovým selháním, se kterým jsme se setkali u pacientky po transplantaci kostní dřeně [198]. Protilátková odpověď bývá insuficientní a infekce může přejít do chronického stadia.

Enteroviry, Coxackie B a adenoviry jsou považovány za nejčastější původce myokarditidy [199]. Vzhledem k rychlému rozvoji molekulární diagnostiky je v posledním desetiletí často diskutována otázka vlivu parvovirové infekce na vznik myokarditidy, dilatační kardiomyopatie s izolovanou dysfunkcí levé komory u dospělých i dětských pacientů. Přítomnost DNA viru se prokazuje metodou PCR z materiálu získaného při biopsii myokardu nebo z autoptického materiálu pacientů s fulminantní formou myokarditidy. Jsou publikovány kazuistiky o smrtelném průběhu parvovirové myokarditidy u 8 a 5 letého chlapce [200,201] a závažném průběhu parvovirové myokarditidy u další 3 dětí [202]. V souboru 11 dětí s těžkou akutní myokarditidou byl parvovirus nalezen u 2 z 5 dětí s virovou etiologií myokarditidy. Ve studii 172 dospělých pacientů s myokarditidou byla po endomyokardiální biopsii pomocí PCR metody prokázána DNA parvoviru B19 u 37 % případů [203]. V souboru 38 dospělých pacientů s izolovanou dysfunkcí levé komory byla přítomnost DNA viru potvrzena metodou PCR u 84 % pacientů [204]. Parvovirová myokarditida (Parvovirus B19) byla důvodem úmrtí u 9 % [205] a 11 % [206] kojenců se syndromem náhlého úmrtí. U parvovirem indukované kardiomyopatie bývá postižení intrakardiálních endoteliálních buněk malých arteriol a vén, které se může projevit dysfunkcí endotelu, porušením myokardiální mikrocirkulace, penetrací

buněk zánětu a sekundární nekrózou myocytů [207]. Fulminantní průběh parvovirové myokarditidy je naštěstí vzácný, myokarditida ale může proběhnout subklinicky a nenávratně poškodit srdeční sval, poškození vede k nezvratnému srdečnímu selhání, smrti pacienta nebo do obrazu dilatační kardiomyopatie. Vzhledem k nízké séroprevalenci ve věkové skupině dětí do 5let (2 %) a 5-9 let (21 %) jsou tyto děti nejvíce ohroženou skupinou při parvovirové infekci.

U všech stavů se zvýšenými nároky na erytropoézu může infekce Parvovirem B19 vést ke vzniku těžké anémie (pacienti s hemolytickou anémií, anémií z nedostatku železa) [208,209]. U uvedených nemocí je pro úpravu anémie nutná zvýšená tvorba erytrocytů. Při parvovirové infekci vždy dochází ke zpomalení až zastavení tvorby erytrocytů, u zdravého jedince se však tento útlum většinou nijak neprojeví. Naopak, u stavů se zvýšeným nárokem na obrát erytropoezy, tento útlum vede k rychlému rozvoji těžké anémie, mluvíme o tzv. tranzitní aplastické krizi (TAC), která ojediněle může skončit smrtí jedince. Jak ukazujeme na souboru pacientů s doposud nediagnostikovanou sférocytární anémií, TAC může být u mírnějších forem hemolytické anémie její první manifestací. U pacientů s TAC je proto vždy nutné pečlivé hematologické vyšetření.

Za zmínku stojí fakt, že v akutní fázi aplastické krize u hemolytických anémií nemusí být přítomen ikterus a počet retikulocytů je relativně snížen, což ji diferencuje od hemolytické krize, při které je hemolýza doprovázena žloutenkou a retikulocytózou. Dva naši pacienti ze souboru měli podle anamnézy před vypuknutím parvovirové infekce kolísavý ikterus, v jednom případě na podkladě morbus Gilbert. U dítěte s intermitentní žloutenkou by mělo být nutné vyšetření krevního obrazu s retikulocyty, které může i v případě s lehce nižší nebo vzácně i normální hladinou hemoglobinu demaskovat dobře kompenzovanou hemolýzu u vrozené hemolytické anémie.

Kožní exantém páté dětské nemoci je považován za následek ukládání imunokomplexů do kůže, objevuje se s nástupem protilátkové odpovědi (většinou 2-3 týdny od vypuknutí nemoci). U dvou pacientů se sférocytární anémií se exantém objevil až za 10-12 dní od začátku febrilií, byl však hodnocen nesprávně jako kožní alergická reakce, nikoliv jako pátá nemoc.

Souhrn

Cílem práce je poukázat na vzácné specifické vrozené a získané poruchy erytropoézy a poruchy energetického metabolismu erytrocytů v dětském věku. Práce je zaměřena na onemocnění Diamondovou-Blackfanovou anémií, deficitem pyruvátkinázy a anemií při infekci Parvovirem B19.

Diamondova-Blackfanova anémie je vzácná vrozená aplazie erytropoézy, která je definovaná normochromní makrocytární anémií, retikulocytopenií a normocelulární kostní dřeni se selektivním nedostatkem erytroidních prekurzorových buněk. Patří mezi syndromy selhání kostní dřene. Téměř u poloviny pacientů s DBA jsou přítomny další vrozené vývojové anomálie (vrozené vady ledvin, srdce, kostní změny aj.) a nejčastějším patologickým nálezem je malý vzrůst. Anémie je různé závažnosti. Práce popisuje Českou národní databázi pacientů s DBA a její výsledky. K dnešnímu dni proběhla analýza u 22 genů ribozomálních proteinů, včetně RPS14, ale mutace byly zjištěny jen u pěti z nich: RPS19 (28,6 % pacientů), RLP5 (19,1 % pacientů), RPS26 (11,9 % pacientů), RPL11 (11,9 % pacientů) a RPS17 (2,3 % pacientů). 73,8 % pacientů z našeho registru má tedy určenou mutaci RP. Mezi nejzajímavější údaje patří ty, které se týkají korelace genotypu-fenotypu. Všichni čeští pacienti s mutací RPL5 nebo RPL11 mají vadu palce ruky obvykle s ještě jednou nebo více přidruženými anomáliemi (obličejový dysmorfismus, vysoké patro, srdeční anomálie), ve srovnání jen s 50 % výskytu vrozených vad u pacientů s mutací RPS19. Rozdíl ve výskytu anomálie palce spojených s mutací genu RPL5 nebo RPL11 oproti mutaci RPS19 je statisticky vysoce významný.

Ve srovnání s jinými národními registry, je Český národní DBA registr poměrně malý, ale stále poskytuje nepřeborné množství nových zajímavých údajů. Práce uvádí integrovaný popis 42 DBA pacientů včetně jejich genotypu (73,8 % pacientů s identifikovanou mutací RP), fenotypu (71,4 % pacientů s alespoň jednou související anomálií), laboratorními nálezy (eADA, sérový EPO, analýzou dřene a klonogenními testy) a léčby.

Deficit pyruvátkinázy je druhý nejčastější enzymatický defekt vedoucí k hemolytické anémii. Cílem této části práce je demonstrovat klinické a laboratorní nálezy u deficitu PK u prvních dětských pacientů v České republice definovaných na molekulární úrovni. Jsou zde popsáni čtyři dětské pacienti se závažnou nesférocytární makrocytární hemolytickou anémií, u kterých se prokázala diagnóza deficitu pyruvátkinázy. Byla u nich stanovena aktivita PK a provedena sekvenace genu kódujícího PK. Pro zvýšení hladin feritinu byla vyšetřena hladina hepcidinu. Aktivita PK je u všech dětí snížena (23–32 %). Dva pacienti jsou smíšené heterozygoti pro

mutace c.1529C>A (p.Arg510Gln) a c.1594C>T (p.Arg532Trp) a jeden pro mutace c.1493G>A (p.Arg498His) a c.1529C>A (p.Arg510Gln). V jednom případě se jedná o homozygotní delecii v exonu 11, která nebyla dosud popsána. Tento pacient s nejtěžším průběhem nemoci má vysokou hladinu feritinu, avšak sníženou hladinu hepcidinu, což se může podílet na přetížení železem.

Poslední část dizertační práce se zabývá onemocněním parvovirem B19, virem, který je původcem několika klinicky definovaných jednotek: páté nemoci u dětí předškolního věku, horečnaté infekce s artralgiemi, tranzitní aplastické krize u pacientů s hemolytickou anemií a neimunitního hydropsu plodu. Cílem práce je zhodnotit průběh infekce parvovirem B19 u dětí s méně obvyklými klinickými projevy, které nejsou u parvovirové infekce běžně popisovány. Infekce parvovirem B19 byla prokázána u 8 pacientů s následujícími diagnózami: perikarditidou s pleurálními výpotky a trombocytopenií, těžkou anemií s neutropenií, myokarditidou s fulminantním průběhem a náhle vzniklou těžkou anemií vyžadující transfuzi. K průkazu infekce bylo použito vyšetření protilátek třídy IgG a IgM (ELISA) a/nebo detekce DNA viru metodou polymerázové řetězové reakce. Parvovirová infekce byla sérologicky a/nebo průkazem DNA viru prokázána u 5 pacientů s akutně vzniklou těžkou anemií, u kterých byla poté prokázána dosud nerozpoznaná hereditární sférocytóza. U pacienta s perikarditidou, pleurálními výpotky a trombocytopenií byla DNA parvoviru prokázána v kostní dřeni i periferní krvi. Závažný a protražovaný průběh infekce vedl k odhalení vrozeného imunodeficitu: běžné variabilní imunodeficiencie. U dalšího pacienta se na vzniku těžké anemie doprovázené neutropenií se podílela chronická sideropenická anemie se zvýšenými nároky na obrat erythropoezy. U pacienta s těžce probíhající myokarditidou byla parvovirová infekce prokázána až v autoptickém materiálu. Průběh parvovirové myokarditidy může být u dětí vzácně velmi těžký a skončit fatálně. Uvedené případy demonstrují variabilitu klinických příznaků infekce parvovirem B19, které závisí do značné míry na imunologickém profilu hostitele a aktuálních nárocích na obrat erythropoezy.

Z práce je zřejmé, že problematika vrozených a získaných poruch erythropoezy a poruch energetického metabolismu u dětí je velmi rozsáhlá a poměrně složitá. Naše dílčí výsledky ukazují na další možnosti výzkumu v této oblasti.

Summary

The aim of the paper is to highlight specific rare congenital and acquired disorders of erythropoiesis and disorders of energy metabolism of erythrocytes in children. The paper focuses on the following diseases: Diamond-Blackfan anemia, pyruvate kinase deficiency and anemia in Parvovirus B19.

Diamond-Blackfan anemia is a rare congenital aplasia of erythropoiesis, which is defined as a macrocytic normochromic anemia, reticulocytopenia and normocellular bone marrow with selective deficiency of erythroid precursor cells. It is included in a group of bone marrow failure syndromes. Almost a half of patients with DBA have additional congenital anomalies (defects of the kidney, heart, bone changes, etc.) and the most common pathology is small stature. The anemia is of varying severity. The paper describes the Czech national database of patients with DBA and its results. To date, we have analyzed 22 RP genes, including RPS14, but mutations have been identified in only five of them – RPS19 (28.6% of patients), RPL5 (19.1% of patients), RPS26 (11.9% of patients), RPL11 (11.9% of patients), and RPS17 (2.3% of patients), together amounting to 73.8% of resolved cases. Most interesting data relate to genotype–phenotype correlations. All Czech patients with RPL5 or RPL11 mutations have a thumb defect usually with one or more other anomalies (facial dysmorphism, high-arched palate, heart anomalies), compared with 50% of patients with RPS19 mutations. The difference in the incidence of thumb anomalies associated with RPL5 or RPL11 mutations versus RPS19 mutations is statistically highly significant. Though the Czech National DBA Registry is relatively small in comparison with other National Registries, it still provides a wealth of new interesting data. The paper presents 42 DBA patients including genotype (73.8% patients with an identified RP mutation), phenotype (71.4% patients with at least one associated anomaly), laboratory findings (eADA, serum EPO, bone marrow analysis and clonogenic assays) and treatment.

Pyruvatekinase deficiency is the second most common enzymatic defect leading to a hemolytic anemia. The aim of this paper is to demonstrate the clinical and laboratory findings in the first paediatric patients with PK deficiency defined at a molecular level in the Czech Republic. It identifies four paediatric patients with a severe nonspherocytic macrocytic hemolytic anemia with a proven diagnosis of a pyruvate kinase deficiency. PK activity was measured and sequencing of the PK encoding gene performed. Because of the increased serum ferritin level, the hepcidin level was examined too. PK activity is reduced in all children (23-32%). Two patients are mixed heterozygous for mutations c.1529C > A

(p.Arg510Gln) and c.1594C > T (p.Arg532Trp) and one for the mutation c.1493G > A (p.Arg498His) and c.1529C > A (p.Arg510Gln). In one case, there is a homozygous deletion in exon 11, which has not yet been described. The patients with the most severe course of the disease have a high level of ferritin but reduced levels of hepcidin, which may contribute to iron overload.

The last part of the paper deals with the Parvovirus B19 infection. It is a virus that has caused several clinically defined units: fifth disease in children of preschool age, febrile infection with arthralgias, transient aplastic crisis in patients with a hemolytic anemia and non-immune fetal hydrops. The aim is to evaluate the course of parvovirus B19 infection with less common clinical manifestations in children that are not commonly described in parvovirus infections. Parvovirus B19 was found in 8 patients with the following diagnoses: pericarditis with pleural effusion and thrombocytopenia, severe anemia with neutropenia, myocarditis with fulminant course and suddenly developed severe anemia requiring transfusion. For the purposes of infection confirmation, a test for IgG and IgM (ELISA) antibodies and/or the detection of viral DNA by the polymerase chain reaction were used. The parvovirus infection was detected serologically and/or by evidence of viral DNA in 5 patients with an acute onset of a severe anemia. They were later diagnosed with a previously unrecognized hereditary spherocytosis. In a patient with pericarditis, pleural effusions and thrombocytopenia, parvovirus DNA was detected in bone marrow and peripheral blood. A severe and prolonged course of infection has led to the detection of congenital immunodeficiency: common variable immunodeficiency. In another patient the emergence of a severe anemia accompanied by neutropenia was involved in a chronic iron deficiency anemia with increased demands on the turnover of erythropoiesis. In patients with severely ongoing myocarditis, parvovirus infection was proven only in the autopsy material. The course of parvovirus myocarditis in children can be very severe and rarely fatal. These cases demonstrate the variability of clinical signs of Parvovirus B19 infection, which largely depends on the host immunological profile and the current demands on turnover of erythropoiesis.

The results of the paper indicate that the issue of congenital and acquired disorders of erythropoiesis and metabolism disorders in children is very large and quite complex. Our partial results point to a possibility of further research in this area.

Literatura

1. Sieff C.A. Overview of hematopoiesis and stem cell function, Up to date.com, [online] May21,2013,[vid.2012-08-31]Dostupné z: <http://www.uptodate.com/contents/overview-of-hematopoiesis-and-stem-cell-function/>.
2. Suda T, Suda J, Ogawa M. Disparate differentiation in mouse hemopoietic colonies derived from paired progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81:2520.
3. Emerson S.G, Sieff C.A, Wang E.A, et al. Purification of fetal hematopoietic progenitors and demonstration of recombinant multipotential colony-stimulating activity. *J Clin Invest* 1985; 76:1286.
4. Dicke K.A, van Noord M.J, Maat B, et al. Identification of cells in primate bone marrow resembling the hemopoietic stem cell in the mouse. *Blood* 1973; 42:195.
5. Lazrak M, Deleuze V, Noel D, Haouzi D, Chalhoub E, Dohet C, Robbins I, Mathieu D. The bHLH TAL-1/SCL regulates endothelial cell migration and morphogenesis. *J Cell Sci.* 2004 Mar 1;117(Pt 7):1161-71.
6. Rosse C. Small lymphocyte and transitional cell populations of the bone marrow; their role in the mediation of immune and hemopoietic progenitor cell functions. *Int Rev Cytol* 1976; 45:155.
7. Begley C.G, Aplan P.D, Denning S.M, et al. The gene SCL is expressed during early hematopoiesis and encodes a differentiation-related DNA-binding motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86:10128.
8. Mouthon M.A, Bernard O, Mitjavila M.T, et al. Expression of tal-1 and GATA-binding proteins during human hematopoiesis. *Blood* 1993; 81:647.
9. Shivdasani R.A, Mayer E.L, Orkin S.H. Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature* 1995; 373:432.
10. Robb L, Lyons I, Li R, et al. Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the scl gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:7075.
11. Aplan P.D, Nakahara K, Orkin S.H, Kirsch I.R. The SCL gene product: a positive regulator of erythroid differentiation. *EMBO J* 1992; 11:4073.
12. Wadman I, Li J, Bash R.O, et al. Specific in vivo association between the bHLH and LIM proteins implicated in human T cell leukemia. *EMBO J* 1994; 13:4831.
13. Dorfman D.M, Wilson D.B, Bruns G.A, Orkin S.H. Human transcription factor GATA-2. Evidence for regulation of preproendothelin-1 gene expression in endothelial cells. *J Biol Chem* 1992; 267:1279.
14. Leonard M, Brice M, Engel J.D, Papayannopoulou T. Dynamics of GATA transcription factor expression during erythroid differentiation. *Blood* 1993; 82:1071.
15. Visvader J, Adams J.M. Megakaryocytic differentiation induced in 416B myeloid cells by GATA-2 and GATA-3 transgenes or 5-azacytidine is tightly coupled to GATA-1 expression. *Blood* 1993; 82:1493.
16. Tsai F.Y, Keller G, Kuo F.C, et al. An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* 1994; 371:221.
17. Fujimaki S, Harigae H, Sugawara T, et al. Decreased expression of transcription factor GATA-2 in haematopoietic stem cells in patients with aplastic anaemia. *Br J Haematol* 2001; 113:52.
18. Martin D.I, Zon L.I, Mutter G, Orkin S.H. Expression of an erythroid transcription factor in megakaryocytic and mast cell lineages. *Nature* 1990; 344:444.
19. Romeo P.H, Prandini M.H, Joulin V, et al. Megakaryocytic and erythrocytic lineages share specific transcription factors. *Nature* 1990; 344:447.

20. Zon L.I, Yamaguchi Y, Yee K, et al. Expression of mRNA for the GATA-binding proteins in human eosinophils and basophils: potential role in gene transcription. *Blood* 1993; 81:3234.
21. Zheng J, Kitajima K, Sakai E, et al. Differential effects of GATA-1 on proliferation and differentiation of erythroid lineage cells. *Blood* 2006; 107:520.
22. Pevny L, Simon M.C, Robertson E, et al. Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* 1991; 349:257
23. Weiss M.J, Keller G, Orkin S.H. Novel insights into erythroid development revealed through in vitro differentiation of GATA-1 embryonic stem cells. *Genes Dev* 1994; 8:1184.
24. Pevny L, Lin C.S, D'Agati V, et al. Development of hematopoietic cells lacking transcription factor GATA-1. *Development* 1995; 121:163.
25. Weiss M.J, Orkin S.H. Transcription factor GATA-1 permits survival and maturation of erythroid precursors by preventing apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:9623.
26. Gutiérrez L, Tsukamoto S, Suzuki M, et al. Ablation of Gata1 in adult mice results in aplastic crisis, revealing its essential role in steady-state and stress erythropoiesis. *Blood* 2008; 111:4375.
27. Nichols K.E, Crispino J.D, Poncz M, et al. Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA1. *Nat Genet* 2000; 24:266.
28. Wechsler J, Greene M, McDevitt M.A, et al. Acquired mutations in GATA1 in the megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Nat Genet* 2002; 32:148.
29. Hitzler J.K, Cheung J, Li Y, et al. GATA1 mutations in transient leukemia and acute megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Blood* 2003; 101:4301.
30. Ahmed M, Sternberg A, Hall G, et al. Natural history of GATA1 mutations in Down syndrome. *Blood* 2004; 103:2480.
31. Sieff C.A, Ekern S.C, Nathan DG, Anderson J.W. Combinations of recombinant colony-stimulating factors are required for optimal hematopoietic differentiation in serum-deprived culture. *Blood* 1989; 73:688.
32. Wu H, Liu X, Jaenisch R, Lodish H.F. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* 1995; 83:59.
33. Galli S.J, Zsebo K.M, Geissler E.N. The kit ligand, stem cell factor. *Adv Immunol* 1994; 55:1.
34. Abkowitz J.L, Sabo K.M, Nakamoto B, et al. Diamond-blackfan anemia: in vitro response of erythroid progenitors to the ligand for c-kit. *Blood* 1991; 78:2198.
35. Bagnara G.P, Zauli G, Vitale L, et al. In vitro growth and regulation of bone marrow enriched CD34+ hematopoietic progenitors in Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 1991; 78:2203.
36. Olivieri N.F, Grunberger T, Ben-David Y, et al. Diamond-Blackfan anemia: heterogenous response of hematopoietic progenitor cells in vitro to the protein product of the steel locus. *Blood* 1991; 78:2211.
37. Nocka K, Majumder S, Chabot B, et al. Expression of c-kit gene products in known cellular targets of W mutations in normal and W mutant mice-evidence for an impaired c-kit kinase in mutant mice. *Genes Dev* 1989; 3:816.
38. Wu H, Klingmüller U, Besmer P, Lodish H.F. Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors. *Nature* 1995; 377:242.
39. Jubinsky P.T, Krijanovski O.I, Nathan D.G, et al. The beta chain of the interleukin-3 receptor functionally associates with the erythropoietin receptor. *Blood* 1997; 90:1867.

40. Kurtz A, Jelkmann W, Bauer C. Insulin stimulates erythroid colony formation independently of erythropoietin. *Br J Haematol* 1983; 53:311.
41. Smith J.C, Price B.M, Van Nimmen K, Huylebroeck D. Identification of a potent *Xenopus* mesoderm-inducing factor as a homologue of activin A. *Nature* 1990; 345:729.
42. Galimi F, Bagnara G.P, Bonsi L, et al. Hepatocyte growth factor induces proliferation and differentiation of multipotent and erythroid hemopoietic progenitors. *J Cell Biol* 1994; 127:1743.
43. Arany Z, Huang L.E, Eckner R, et al. An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:12969.
44. Frede S, Freitag P, Geuting L, et al. Oxygen-regulated expression of the erythropoietin gene in the human renal cell line REPC. *Blood* 2011; 117:4905.
45. Grant W.C, Root W.S. Fundamental stimulus for erythropoiesis. *Physiol Rev* 1952; 32:449.
46. D'Andrea A.D, Lodish H.F, Wong G.G. Expression cloning of the murine erythropoietin receptor. *Cell* 1989; 57:277.
47. Krantz S.B, Goldwasser E. Specific binding of erythropoietin to spleen cells infected with the anemia strain of Friend virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81:7574.
48. Sawyer S.T, Krantz S.B, Sawada K. Receptors for erythropoietin in mouse and human erythroid cells and placenta. *Blood* 1989; 74:103.
49. Wang G.L, Jiang B.H, Rue E.A, Semenza G.L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:5510.
50. Wang G.L, Semenza G.L. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1995; 270:1230.
51. Alpen E.L, Cranmore D. Cellular kinetics and iron utilization in bone marrow as observed by Fe⁵⁹ radioautography. *Ann N Y Acad Sci* 1959; 77:753.
52. Friedman A.D, Linch D.C, Miller B, et al. Determination of the hemoglobin F program in human progenitor-derived erythroid cells. *J Clin Invest* 1985; 75:1359.
53. Josephs H.W. Anaemia of infancy and early childhood. *Medicine* 1936; 15: 307–451.
54. Diamond L.K, Blackfan K.D. Hypoplastic anemia. *Am J Dis Child* 1938; 56: 464–467.
55. Willig T.N, Niemeyer C, Leblanc T, Tiemann C, Robert A, Budde J. et al. Diamond-Blackfan anemia: clinical and epidemiological studies with identification of new long-term prognosis factors from the analysis of a registry of 234 patients. *Pediatr Res* 1999; 46: 553–561.
56. Glader B.E, Backer K. Elevated red cell adenosine deaminase activity: a marker of disordered erythropoiesis in Diamond-Blackfan anaemia and other haematologic diseases. *Br J Haematol* 1988; 68: 165–168.
57. Willig T.N, Pérignon J.L, Gustavsson P, Gane P, Draptchinskaya N, Testard H, et al. High adenosine deaminase level among healthy probands of Diamond-Blackfan Anemia (DBA) cosegregates with the DBA gene region on chromosome 19q13. *Blood* 1998; 92: 4422–4427.
58. Gustavsson P, Skeppner G, Johansson B, Berg T, Gordon L, Kreuger A, et al. Diamond-Blackfan anaemia in a girl with a de novo balanced reciprocal X;19 translocation. *J Med Genet* 1997; 34: 779–782.
59. Ball S, Orfali K. Molecular diagnosis of Diamond-Blackfan anemia. *Methods Mol Med* 2004; 91:19–30.
60. Campagnoli M.F, Ramenghi U, Armiraglio M, Quarello P, Garelli E, Carando A, et al. RPS19 mutations in patients with Diamond-Blackfan anemia. *Hum Mutat* 2008; 7: 911–920.

61. Cmejla R, Blafkova J, Stopka T, Zavadil J, Pospisilova D, Mihal V, et al. Ribosomal protein S19 gene mutations in patients with Diamond-Blackfan anemia and identification of ribosomal protein S19 pseudogenes. *Blood Cells Mol Dis* 2000; 26: 124–132.
62. Ramenghi U, Campagnoli M.F, Garelli E, Carando A, Brusco A, Bagnara G.P, et al. Diamond-Blackfan anemia: report of seven further mutations in the RPS19 gene and evidence of mutation heterogeneity in the Italian population. *Blood Cells Mol Dis* 2000; 5: 417–422.
63. Willig T.N, Draptchinskaia N, Dianzani I, Ball S, Niemeyer C, Ramenghi U, et al. Mutations in Ribosomal protein S19 gene and Diamond-Blackfan anemia: wide variations in phenotypic expression. *Blood* 1999; 94: 4294–4306 .
64. Gazda H.T, Grabowska A, Merida-Long L.B, Latawiec E, Schneider H.E, Lipton J.M, et al. Ribosomal protein S24 gene is mutated in Diamond-Blackfan anemia. *Am J Hum Genet* 2006; 79: 1110–1118.
65. Gazda H.T, Sheen M.R, Vlachos A, Choessel V, O'Donohue M.F, Schneider H, et al. Ribosomal protein L5 and L11 mutations are associated with cleft palate and abnormal thumbs in Diamond-Blackfan anemia patients. *Am J Hum Genet* 2008; 83(6): 769–780.
66. Doherty L, Sheen M.R, Vlachos A, Choessel V, O'Donohue M.F, Clinton C, et al. Ribosomal protein genes RPS10 and RPS26 are commonly mutated in Diamond-Blackfan anemia. *Am J Hum Genet* 2010; 86 (2): 222–228.
67. Cmejla R, Cmejlova J, Handrkova H, Petrak J, Pospisilova D. Ribosomal protein S17 gene (RPS17) is mutated in Diamond-Blackfan anemia. *Hum Mutat* 2007; 28 (12): 1178–1182.
68. Farrar J.E, Nater M, Caywood E, McDevitt M.A, Kowalski J, Takemoto C.M, et al. Abnormalities of the large ribosomal subunit protein, Rpl35a, in Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 2008; 112 (5): 1582–1592.
69. Quarello P, Garelli E, Carando A, Brusco A, Calabrese R, Dufour C, et al. Diamond-Blackfan anemia: genotype-phenotype correlation in Italian patients with RPL5 and RPL11 mutations. *Haematologica* 2010; 95 (2): 206–213.
70. Cmejla R, Cmejlova J, Handrkova H, Petrak J, Petrylova K, Mihal V, et al. Identification of mutations in the ribosomal protein L5 (RPL5) and ribosomal protein L11 (RPL11) genes in Czech patients with Diamond-Blackfan anemia. *Hum Mutat* 2009; 30 (3): 321–327.
71. Sankaran V.G, Ghazvinian R, Do R, Thiru P, Vergilio J.A, Beggs A.H, Sieff C.A, Orkin S.H, Nathan D.G, Lander E.S, Gazda H.T. Exome sequencing identifies GATA1 mutations resulting in Diamond-Blackfan anemia. *J Clin Invest* 2012 Jul 2; 122(7): 2439–43.
72. Narla A, Ebert B.L. Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. *Blood* 2010; 115(16): 3196–205
73. Ebert B.L, Pretz J, Bosco J, et al. Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature* 2008; 451(7176): 335–9.
74. Ebert B.L. Deletion 5q in myelodysplastic syndrome: a paradigm for the study of hemizygous deletions in cancer. *Leukemia* 2009; 23(7): 1252–6.
75. Barlow J.L, Drynan L.F, Hewett D.R, et al. A p53-dependent mechanism underlies macrocytic anemia in a mouse model of human 5q- syndrome. *Nat Med* 2010; 16(1): 59–66
76. Flygare J, Kiefer T, Miyake K, et al. Deficiency of ribosomal protein S19 in CD34+ cells generated by siRNA blocks erythroid development and mimics defects seen in Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 2005; 105(12): 4627–34.

77. Ebert B.L, Lee M.M, Pretz J.L, et al. An RNA interference model of RPS19 deficiency in Diamond–Blackfan anemia recapitulates defective hematopoiesis and rescue by dexamethasone: identification of dexamethasone-responsive genes by microarray. *Blood* 2005;105(12):4620–6.
78. Hamaguchi I, Ooka A, Brun A, Richter J, Dahl N, Karlsson S. Gene transfer improves erythroid development in ribosomal protein S19-deficient Diamond–Blackfan anemia. *Blood* 2002;100(8):2724–31.
79. Danilova N, Sakamoto K.M, Lin S. Ribosomal protein S19 deficiency in zebrafish leads to developmental abnormalities and defective erythropoiesis through activation of p53 protein family. *Blood* 2008;112(13):5228–37.
80. Uechi T, Nakajima Y, Chakraborty A, Torihara H, Higa S, Kenmochi N. Deficiency of ribosomal protein S19 during early embryogenesis leads to reduction of erythrocytes in a zebrafish model of Diamond–Blackfan anemia. *Hum Mol Genet* 2008;17(20):3204–11.
81. Matsson H, Davey E.J, Frojmark A.S, et al. Erythropoiesis in the Rps19 disrupted mouse: analysis of erythropoietin response and biochemical markers for Diamond–Blackfan anemia. *Blood Cells Mol Dis* 2006;36(2):259–64.
82. McGowan K.A, Li J.Z, Park C.Y, et al. Ribosomal mutations cause p53-mediated dark skin and pleiotropic effects. *Nat Genet* 2008;40(8):963–70.
83. Park C.M.K, Glader B, Barsh G, Weissman I. Haploinsufficiency of ribosomal protein S6 in mice mimics bone marrow failure syndromes in humans. Abstract #194. 52nd ASH Annual Meeting and Exposition, Orlando, FL, 4–7 December, 2010.
84. Choemmel V, Bacqueville D, Rouquette J, et al. Impaired ribosome biogenesis in Diamond–Blackfan anemia. *Blood* 2007;109(3):1275–83.
85. Flygare J, Aspesi A, Bailey J.C, et al. Human RPS19, the gene mutated in Diamond–Blackfan anemia, encodes a ribosomal protein required for the maturation of 40S ribosomal subunits. *Blood* 2007;109(3):980–6.
86. Robledo S, Idol R.A, Crimmins D.L, Ladenson J.H, Mason P.J, Bessler M. The role of human ribosomal proteins in the maturation of rRNA and ribosome production. *RNA* 2008;14(9):1918–29.
87. Wool I.G. Extraribosomal functions of ribosomal proteins. *Trends Biochem Sci* 1996;21(5):164–5.
88. Warner J.R, McIntosh K.B. How common are extraribosomal functions of ribosomal proteins? *Mol Cell* 2009;34(1):3–11.
89. Zhang Y, Lu H. Signaling to p53: ribosomal proteins find their way. *Cancer Cell* 2009;16(5):369–77.
90. Constantinou C, Elia A, Clemens M.J. Activation of p53 stimulates proteasome-dependent truncation of eIF4E-binding protein 1(4E-BP1). *Biol Cell* 2008;100(5):279–89.
91. Fang S, Jensen J.P, Ludwig R.L, Vousden K.H, Weissman A.M. Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J Biol Chem* 2000;275(12):8945–51.
92. Dai M.S, Lu H. Inhibition of MDM2-mediated p53 ubiquitination and degradation by ribosomal protein L5. *J Biol Chem* 2004;279(43):44475–82.
93. Dai M.S, Zeng S.X, Jin Y, Sun X.X, David L, Lu H. Ribosomal protein L23 activates p53 by inhibiting MDM2 function in response to ribosomal perturbation but not to translation inhibition. *Mol Cell Biol* 2004;24(17):7654–68.
94. Jin A, Itahana K, O’Keefe K, Zhang Y. Inhibition of HDM2 and activation of p53 by ribosomal protein L23. *Mol Cell Biol* 2004;24(17):7669–80.
95. Lohrum M.A, Ludwig R.L, Kubbutat M.H, Hanlon M, Vousden K.H. Regulation of HDM2 activity by the ribosomal protein L11. *Cancer Cell* 2003;3(6):577–87.

96. Zhang Y, Wolf G.W, Bhat K, et al. Ribosomal protein L11 negatively regulates oncoprotein MDM2 and mediates a p53-dependent ribosomal-stress checkpoint pathway. *Mol Cell Biol* 2003;23(23):8902–12.
97. Chen D, Zhang Z, Li M, et al. Ribosomal protein S7 as a novel modulator of p53–MDM2 interaction: binding to MDM2, stabilization of p53 protein, and activation of p53 function. *Oncogene* 2007;26(35):5029–37.
98. Ofir-Rosenfeld Y, Boggs K, Michael D, Kastan M.B, Oren M. Mdm2 regulates p53 mRNA translation through inhibitory interactions with ribosomal protein L26. *Mol Cell* 2008;32(2):180–9.
99. Dutt S, Narla A, Lin K, et al. Haploinsufficiency for ribosomal protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells. *Blood* 2011; 117(9):2567-76.
100. Jones N.C, Lynn M.L, Gaudenz K, et al. Prevention of the neurocristopathy Treacher Collins syndrome through inhibition of p53 function. *Nat Med* 2008;14(2):125–33.
101. Treacher-Collins E. Case with symmetrical congenital notches in the outer part of each lower lid and defective development of the malar bones. *Trans Ophthalmol Soc UK* 1900;20:90.
102. Sakai D, Trainor P.A. Treacher Collins syndrome: unmasking the role of Tcof1/treacle. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41(6):1229–32.
103. The Treacher Collins Syndrome Collaborative Group. Positional cloning of a gene involved in the pathogenesis of Treacher Collins syndrome. *Nat Genet* 1996;12(2):130–6.
104. Dixon J, Jones N.C, Sandell L.L, et al. Tcof1/Treacle is required for neural crest cell formation and proliferation deficiencies that cause craniofacial abnormalities. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(36):13403–8.
105. Lipton J.M, Atsidaftos E, Zyskind I, Vlachos A. Improving clinical care and elucidating the pathophysiology of Diamond-Blackfan anemia: an update from the Diamond-Blackfan anemia registry. *Pediatr Blood Cancer* 2005; 46:558–564.
106. Lipton J.M, Ellis SR. Diamond-Blackfan anemia: diagnosis, treatment, and molecular pathogenesis. *Hematol Oncol Clin North Am* 2009; 23 (2):261–282.
107. Chen S, Warszawski J, Bader-Meunier B, Tchernia G, Da Costa L, Marie I, et al. Diamond-Blackfan anemia and growth status: the French registry. *J Pediatr* 2005;147: 669–673.
108. Vlachos A, Ball S, Dahl N, Alter B.P, Sheth S, Ramenghi U, et al. Diagnosing and treating Diamond-Blackfan anaemia: results of an international clinical consensus conference. *Br J Haematol* 2008; 142 (6):859–876.
109. Porter J, Galanello R, Saglio G, Neufeld E.J, Vichinsky E, Cappellini M.D, et al. Relative response of patients with myelodysplastic syndromes and other transfusion-dependent anaemias to deferasirox (ICL670): a 1-year prospective study. *Eur J Haematol* 2008; 80 (2):168–176.
110. Abkowitz J.L, Schaison G, Boulad F, Brown D.L, Buchanan G.R, Johnson C, et al. Response of Diamond-Blackfan anemia to metoclopramide: evidence for a role for prolactin in erythropoiesis. *Blood* 2002; 100:2687–2691.
111. Akiyama M, Yanagisawa T, Yuza Y, Yokoi K, Ariga M, Fujisawa K, et al. Successful treatment of Diamond-Blackfan anemia with metoclopramide. *Am J Hematol* 2005;78:295–298.
112. Leblanc T.M, Da Costa L, Marie I, Demolis P, Tchernia G. Metoclopramide treatment in DBA patients: no complete response in a French prospective study. *Blood* 2007; 109 (5):2266–2267.

113. Ball S, Tchernia G, Wranne L, Bastion Y, Bekassy N.A, Bordigoni P, et al. Is there a role for interleukine-3 in Diamond-Blackfan anaemia? Results of a european multicentre study. *Br J Haematol* 1995; 91.: 313–318.
114. El-Beshlawy A, Ibrahim I.Y, Rizk S, Eid K. Study of 22 egyptian patients with Diamond-Blackfan anemia, corticosteroids, and cyclosporin therapy results. *Pediatrics* 2002; 110:1–5.
115. Jabr F.L, Aoun E, Azar C, Taher A. Diamond-Blackfan anemia responding to valproic acid. *Blood* 2004; 104: 3415.
116. Morimoto A, Kuriyama K, Tsuji K, Isoda S, Hibi S, Todo S, et al. Use of rituximab to treat refractory Diamond-Blackfan anemia. *Eur J Haematol* 2005;74:442–444.
117. Pospisilova D, Cmejlova J, Hak J, Adam T, Cmejla R. Successful treatment of a Diamond-Blackfan anemia patient with amino acid leucine. *Haematologica* 2007;92 (5):66–67.
118. Cmejlova J, Dolezalova L, Pospisilova D, Petrtylova K, Petrak J, Cmejla R. Translational efficiency in patients with Diamond-Blackfan anemia. *Haematologica* 2006; 91(11):1456–1464.
119. Flygare J, Olsson K, Richter J, Karlsson S. Gene therapy of Diamond-Blackfan anemia CD34(+) cells leads to improved erythroid development and engraftment following transplantation. *Exp Hematol* 2008;36 (11):1428–1435.
120. Hamaguchi I, Flygare J, Nishiura H, Bun A.C.M, Ooka A, Kiefer T, et al. Proliferation deficiency of multipotent hematopoietic progenitors in Ribosomal Protein S19 (RPS19)-deficient Diamond-Blackfan anemia improves following RPS19 gene transfer. *Mol Ther* 2003; 7:613–622.
121. Hamaguchi I, Ooka A, Brun A, Richter J, Dahl N, Karlsson S. Gene transfer improves erythroid development in ribosomal protein S19-deficient Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 2002; 100: 2724–2731.
122. Vlachos A, Klein G.W, Lipton J.M. The Diamond-Blackfan anemia registry: tool for investigating the epidemiology and biology of Diamond-Blackfan anemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2001; 23:377–382.
123. Lipton J.M, Federman N, Khabbaze Y. Osteogenic sarcoma associated with Diamond-Blackfan anemia: a report from the Diamond-Blackfan anemia registry. *J Pediatr Hematol Oncol* 2001;23:39–44.
124. Zanella A, Bianchi P, Iurlo A, et. al. Iron status and HFE genotype in erythrocyte pyruvate kinase deficiency : Study of Italian cases. *BMC Blood Disord* 2001; 27: 653-661.
125. Zanella A, Fermo E, Bianchi P, et al. Pyruvate kinase deficiency: The genotype-phenotype association. *Blood Reviews* 2007; 21: 217-231.
126. Fothergill-Gilmore L.A, Michels P.A. Evolution in glycolysis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 1993; 59:105–227.
127. Munoz M.E, Ponce E. Pyruvate kinase: current status of regulatory and functional properties. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology* 2003;135: 197–218.
128. Satoh H, Tani K, Yoshida M.C, et.al. The human liver-type pyruvate kinase (PKL) gene is on chromosome 1 at band q21. *Cytogenetic and Cellular Genetics* 1988; 47:132-133.
129. Takegawa S, Fuji H, Miwa S. Change of pyruvate kinase isozymes from M2- to L-type during development of the red cell. *Br. J. Haematol* 1983; 54:467-474.
130. Mazurek S, Boschek C.B, Hugo F, Eigenbrodt E. Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. *Semin Cancer Biol* 2005;15(4):300-8.

131. Fatela-Cantillo D, Fernandez-Suarez A, Moreno M.A, Gutierrez J.J, Iglesias J.M. Prognostic value of plasmatic tumor M2 pyruvate kinase and carcinoembryonic antigen in the survival of colorectal cancer patients. *Tumour Biol* 2012; 33(3):825-32.
132. Kanno H, Fujii H, Hirono A, Miwa S. cDNA cloning of human R-type pyruvate kinase and identification of a single amino acid substitution (Thr384→Met) affecting enzymatic stability in a pyruvate kinase variant (PK Tokyo) associated with hereditary hemolytic anemia. *Proc Nat Acad Sci USA* 1991; 88: 8218–8221.
133. Kanno H, Fujii H, Miwa S. Structural analysis of human pyruvate kinase L-gene and identification of the promoter activity in erythroid cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1992;188:516–523.
134. Hilgard P, Gerken G. Liver cirrhosis as consequence of iron overload causes by hereditary nonsperocytic hemolytic anemia. *World J Gastroenterol* 2005;11(8):1241-1244.
135. Rao A, Hulbert M, Wilson D.B. Severe hypertriglyceridemia in an infant with red cell pyruvate kinase deficiency. *Indian Pediatr* 2007;44(4):303-5.
136. Beutler E, Blume K.G, Kaplna J.C, Löhner G.W, Ramot B, Valentine W.N. International committee for standardization in haematology: recommended methods for red-cell enzyme analysis. *Br J Haematol* 1977;35: 331-340.
137. Cossart Y. Parvovirus B19 finds a disease. *Lancet* 1981;2:988-989.
138. Allander T, Tammi M. T, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:12891-12896.
139. Jones M. S, Kapoor A, Lukashov V.V, Simmonds P, Hecht F, Delwart E. New DNA viruses identified in patients with acute viral infection syndrome. *J Virol* 2005; 79:8230-8236.
140. , Raymond P, Allaire M, Nabi I.R, Tijssen P. A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity. *Dev Cell* 2001;1:291–302.
141. Young N.S, Brown K.E. Parvovirus B19. *NEJM* 2004;350:586-597.
142. Munakata Y, Saito-Ito T, Kumura-Ishii K, Huang J, Kodera T, Ishii T, Hirabayashi Y, Koyanagi Y, Sasaki T. Ku80 autoantigen as a cellular coreceptor for human parvovirus B19 infection. *Blood* 2005;106:3449–3456.
143. Weigel-Kelley K. A, Yoder M.C, Srivastava A. A5β1 integrin as a cellular coreceptor for human parvovirus B19: requirement of functional activation of β1 integrin for viral entry. *Blood* 2003;102: 3927–3933.
144. Vihinen-Ranta M, Suikkanen S, Parrish C.R. Pathways of cell infection by parvoviruses and adeno-associated viruses. *J Virol* 2004; 78:6709-6714.
145. Dorsch S, Liebisch G, Kaufmann B, von Landenberg P, Hoffmann J.H, Drobnik W, Modrow S. The VP1 unique region of parvovirus B19 and its constituent phospholipase A2-like activity. *J Virol* 2002; 76:2014-2018.
146. Filippone C, Zhi N, Wong S, Lu J, Kajigaya S, Gallinella G, Kakkola L, Soderlund-Venermo M, Young N.S, Brown K.E. VP1u phospholipase activity is critical for infectivity of full-length parvovirus B19 genomic clones. *Virology* 2008; 374:444-452.
147. Guan W, Cheng F, Yoto Y, Kleiboeker S, Wong S, Zhi N, Pintel D.J, Qiu J. Block to the production of full-length B19 virus transcripts by internal polyadenylation is overcome by replication of the viral genome. *J Virol* 2008; 82:9951-9963.
148. Liu J.M, Green S.W, Shimada T, Young N.S. A block in full-length transcript maturation in cells nonpermissive for B19 parvovirus. *J Virol* 1992; 66:4686-4692.

149. Wong S, Zhi N, Filippone C, Keyvanfar K, Kajigaya S, Brown K.E, Young N.S. Ex vivo-generated CD36+ erythroid progenitors are highly permissive to human parvovirus B19 replication. *J Virol* 2008; 82:2470-2476.
150. Mortimer P. P, Humphries R.K, Moore J.G, Purcell R.H, Young N.S. A human parvovirus-like virus inhibits haematopoietic colony formation in vitro. *Nature* 1983;302:426-429.
151. Moffatt S, Yaegashi N, Tada K, Tanaka N, Sugamura K. Human parvovirus B19 nonstructural (NS1) protein induces apoptosis in erythroid lineage cells. *J Virol* 1998; 72:3018-3028.
152. Sol N, Le Junter L, Vassias I, Freyssinier J.M, Thomas A, Prigent A.F, Rudkin B.B, Fichelson S, Morinet F. Possible interactions between the NS-1 protein and tumor necrosis factor alpha pathways in erythroid cell apoptosis induced by human parvovirus B19. *J Virol* 1999; 73:8762-8770.
153. Zhi N, Mills I.P, Lu J, Wong S, Filippone C, Brown K.E. Molecular and functional analyses of a human parvovirus B19 infectious clone demonstrates [sic] essential roles for NS1, VP1, and the 11-kilodalton protein in virus replication and infectivity. *J Virol* 2006; 80:5941-5950.
154. Jurvansuu J, Raj K, Stasiak A, Beard P. Viral transport of DNA damage that mimics a stalled replication fork. *J Virol* 2005; 79:569-580.
155. Lunardi C, Tinazzi E, Bason C, Dolcino M, Corrocher R, Puccetti A. Human parvovirus B19 infection and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2008; 8:116-120.
156. Hemauer A, Beckenlehner K, Wolf H, Lang B, Modrow S. Acute parvovirus B19 infection in connection with a flare of systemic lupus erythematoses in a female patient. *J Clin Virol* 1999; 14:73-77.
157. Kerr J.R, Barah F, Matthey D.L, Laing I, Hopkins S.J, Hutchinson I.V, Tyrrell D.A. Circulating tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma are detectable during acute and convalescent parvovirus B19 infection and are associated with prolonged and chronic fatigue. *J Gen Virol* 2001; 82:3011-3019.
158. Kerr J.R, McCoy M, Burke B, Matthey D.L, Pravica V, Hutchinson I.V. Cytokine gene polymorphisms associated with symptomatic parvovirus B19 infection. *J Clin Pathol* 2003; 56:725-727.
159. Flunker G, Peters A, Wiersbitzky S, Modrow S, Seidel W. Persistent parvovirus B19 infections in immunocompromised children. *Med Microbiol Immunol* 1998;186:189-194.
160. Frickhofen N, Abkowitz J.L, Safford M, Berry J.M, Antunez-de-Mayolo J, Astrow A, Cohen R, Halperin I, King L, Mintzer D. Persistent B19 parvovirus infection in patients infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1): a treatable cause of anemia in AIDS. *Ann Intern Med* 1990;113:926-933.
161. LaMonte A.C, Paul M.E, Read J.S, Frederick M.M, Erdman D.D, Han L.L, Anderson L.J. Persistent parvovirus B19 infection without the development of chronic anemia in HIV-infected and -uninfected children: the Women and Infants Transmission Study. *J Infect Dis* 2004;189:847-851.
162. Cassinotti P, Burtonboy G, Fopp M, Siegl G. Evidence for persistence of human parvovirus B19 DNA in bone marrow. *J Med Virol* 1997;53:229-232.
163. Cassinotti P, Siegl G. Quantitative evidence for persistence of human parvovirus B19 DNA in an immunocompetent individual. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19:886-887.
164. Lefrère J. J, Servant-Delmas A, Candotti D, Mariotti M, Thomas I, Brossard Y, Lefrere F, Girot R, Allain J.P, Laperche S. Persistent B19 infection in

- immunocompetent individuals: implications for transfusion safety. *Blood* 2005; 106:2890-2895.
165. Lundqvist A, Tolfvenstam T, Bostic J, Soderlund M, Broliden K. Clinical and laboratory findings in immunocompetent patients with persistent parvovirus B19 DNA in bone marrow. *Scand J Infect Dis* 1999; 31:11-16.
 166. Nikkari S, Roivainen A, Hannonen P, Mottonen T, Luukkainen R, Yli-Jama T, Toivanen P. Persistence of parvovirus B19 in synovial fluid and bone marrow. *Ann Rheum Dis* 1995; 54:597-600.
 167. Parvovirus B19 (erythema infectiosum, fifth disease). In: *Red Book 2006: Report of the Committee on Infectious Diseases*. 27th ed. Washington, D.C.: American Academy of Pediatrics, 2006:484-7.
 168. Eid A, Brown R.A, Patel R, Raymund R.R, Razonable R. Parvovirus B19 Infection after Transplantation: A Review of 98 Cases. *Clinical Infectious Diseases* 2006;43:40-48.
 169. Heegaard E.D, Brown K.E. Human parvovirus B19. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:485-505.
 170. Ludíková B, Luhový M, Klásková E, Novák Z, Kopřiva F, Pospíšilová D. Neobvyklé manifestace infekce parvovirem B19 u dětí, *Čes-slov Pediat* 2012; 67 (3): 160-168.
 171. Plummer F.A, Hammond G.W, Forward K, Sekla L, Thompson L.M, Jones S.E, et al. An erythema infectiosum-like illness caused by human parvovirus infection. *N Engl J Med* 1985;313:74-9.
 172. Neshar G, Moore T.L. Human parvovirus infection. *Infect Med* 1997;14:638-42.
 173. Kudoh T, Yoto Y, Suzuki N, Oda T, Katoh S, Chiba S. Human parvovirus B19-induced aplastic crisis in iron deficiency anemia. *Acta Paediatr Jpn* 1994;36(4):448-9.
 174. Smith-Whitley K, Zhao H, Hodinka R.L, Kwiatkowski J, Cecil R, Cecil T, et al. Epidemiology of human parvovirus B19 in children with sickle cell disease. *Blood* 2004;103:422-7.
 175. Posfay-Barbe K.M, Michaels M.G. Parvovirus B19 in organ transplant recipients. *Curr Opin Organ Transpl* 2003;8:283-7.
 176. Katta R. Parvovirus B19: a review. *Dermatol Clin* 2002;20:333-42.
 177. Morey A.L, Keeling J.W, Porter H.J, Fleming K.A. Clinical and histopathological features of parvovirus B19 infection in the human fetus. *Br J Obstet Gynaecol* 1992;99:566-74.
 178. American College of Obstetrics and Gynecologists. ACOG practice bulletin. Perinatal viral and parasitic infections. Number 20, September 2000. *Int J Gynaecol Obstet* 2002;76:95-107.
 179. Kurtzman G, Frickhofen N, Kimball J, Jenkins D.W, Nienhuis A.W, Young N.S. Pure red-cell aplasia of 10 years' duration due to persistent parvovirus B19 infection and its cure with immunoglobulin therapy. *N Engl J Med* 1989;321:519-23.
 180. Boultonwood J, Yip B.H, Vuppusetty C, Pellagatti A, Wainscoat J.S. Activation of the mTOR pathway by the amino acid (L)-leucine in the 5q- syndrome and other ribosomopathies. *Adv Biol Regul* 2013;53(1):8-17.
 181. Jaako P, Debnath S, Olsson K, Bryder D, Flygare J, Karlsson S. Dietary L-leucine improves the anemia in a mouse model for Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 2012;120(11):2225-8.
 182. Simmonds H.A, Duley J.A, Davies P.M, Analysis of purines and pyrimidines in blood, urine and other physiological fluids, in: F. Hommes (Ed.), *Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics: A laboratory Manual*, 1991, 397-24.

183. Zander R, Lang W, Wolf HU., The determination of haemoglobin as cyanhaemoglobin or as alkaline haematin D-575. Comparison of method-related errors, *J Clin Chem Clin Biochem* 1989; 27:185–189.
184. Zadrazil J, Horak P, Horcicka V, Zahalkova J, Streb P. I, Hruby M. Endogenous erythropoietin levels and anemia in long-term renal transplant recipients. *Kidney Blood Press* 2007; 30:108–116.
185. Iscove N.N, Sieber F, Winterhalte K.H. Erythroid colony formation in cultures of mouse and human bone marrow: analysis of the requirement for erythropoietin by gel filtration and affinity chromatography on agarose-concanavalin A. *J Cell Physiol* 1974; 83:309–320.
186. Myers C.D, Katz F.E, Josh G, Millar J.L. A cell line secreting stimulating factors for CFU-GEMM culture. *Blood* 1984;64:152–155.
187. Quentmeier H, Zaborski M, Drexler H.G. The human bladder carcinoma cell line 5637 constitutively secretes functional cytokines. *Leuk Res* 1997; 21:343–350.
188. Draptchinskaia N, Gustavsson P, Andersson B, Pettersson M, Willig T.N, Dianzani I, et al. The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nat Genet* 1999;21: 169–175.
189. Orfali K.A, Ohene-Abuakwa Y, Ball S.E. Diamond Blackfan anaemia in the UK:clinical and genetic heterogeneity, *Br J Haematol* 2004;125:243–252.
190. Campagnoli M.F, Garelli E, Quarello P, Carando A, Varotto S, Nobili B, et al. Molecular basis of Diamond-Blackfan anemia: new findings from the Italian registry and a review of the literature. *Haematologica* 2004; 89: 480–489.
191. Boria I, Garelli E, Gazda H.T, Aspesi A, Quarello P, Pavesi E, et al. The ribosomal basis of Diamond-Blackfan Anemia: mutation and database update. *Hum Mutat* 2010; 31: 1269–1279.
192. Hayashi A.K, Kang Y.S, Smith B.M. Non-Hodgkin's lymphoma in a patient with Diamond-Blackfan anemia. *Am J Roentgenol* 1999; 173: 117–118.
193. Storch H, Krüger W, Rotzsch W. Adenosine deaminase activity in plasma and blood cells of patients with haematological and autoimmune diseases, *Acta Haemato* 1981; 65:183–188.
194. Sairam S, Goel N, Lisse J, McNearney T. Pericardial effusion and cardiomyopathy following arthritis with parvovirus B19 infection: response to intravenous immunoglobulin. *J Clin Rheumatol* 2001;7(5):346-9.
195. Ergül Y, Nişli K, Keleşoğlu F, Dindar A. Acute pericarditis and transient erythroblastopenia associated with human parvovirus B19 infection. *Turk Kardiyol Dern Ars* 2010;38(5):349-51.
196. Mogensen T.H, Jensen J.M, Hamilton-Dutoit S, Larsen C.S. Chronic hepatitis caused by persistent parvovirus B19 infection. *BMC Infect Dis* 2010;10:246.
197. Mihal V, Dusek J, Hajdich M, Cohen B.J, Fingerova H, Vesely J. Transient aplastic crisis in a leukemic child caused by parvovirus B19 infection. *Pediatr Hematol Oncol* 1996;13:173-177.
198. Šrámková L, Sedláček P, Pospíšilová D, Petrtýlová K, Starý J. Bone marrow transplantation and posttransplant care in Diamond-Blackfan anemia: report of three cases. Abstrakt. *Pediatric Research* 2001;49(6). European Society of Pediatric Haematology and Immunology Annual Meeting, Luzern 6/2001.
199. Mahrholdt H, Wagner A, Deluigi C.C, Kispert E, Hager S, Meinhardt G, Vogelsberg H, Fritz P, Dippon J, Bock C.T, Klingel K, Kandolf R, Sechtem U. Presentation, patterns of myocardial damage, and clinical course of viral myocarditis. *Circulation* 2006;114(15):1581-90.

200. Dettmeyer R, Kandolf R, Baasner A, Banaschak S, Eis-Hubinger A.M, Madea B. Fatal parvovirus B19 myocarditis in an 8-year boy. *J Forensic Sci* 2003;48(1):183-186.
201. Zack F, Klingel K, Kandolf R, Wegener R. Sudden cardiac death in a 5-year-old girl associated with parvovirus B19 infection. *Forensic Sci Int* 2005;155(1):13-7.
202. Munro K, Croxson M.C, Thomas S, Wilson N.J. Three cases of myocarditis in childhood associated with human parvovirus(B19 virus). *Pediatr Cardiol* 2003;24(5):473-5.
203. Pankuweit S, Ruppert V, Eckhardt H, Strache D, Maisch B. Pathophysiology and aetiological diagnosis of inflammatory myocardial diseases with a special focus on parvovirus B19. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2005;52(7-8):344-7.
204. Tschöpe C, Bock C.T, Kasner M, Noutsias M, Westermann D, Schwimmbeck P.L, Pauschinger M, Poller W.C, Kuhl U, Kandolf R, Schultheiss H.P. High prevalence of cardiac parvovirus B19 infection in patients with isolated left ventricular diastolic dysfunction. *Circulation* 2005;111(7):879-86.
205. Baasner A, Dettmeyer R, Graebe M, Rissland J, Madea B. PCR-based diagnosis of enterovirus and parvovirus B19 in paraffin-embedded heart tissue of children with suspected sudden infant death syndrome. *Lab Invest* 2003;83(10):1451-5.
206. Dettmeyer R, Baasner A, Schlamann M, Padosch S.A, Haag C, Kandolf R, Madea B. Role of virus-induced myocardial affections in sudden infant death syndrome: a prospective postmortem study. *Pediatr Res* 2004;55(6):947-52.
207. Kandolf R. Virus etiology of inflammatory cardiomyopathy. *Dtsch Med Wochenschr* 2004;129(41):2187-92.
208. Tarantino M.D, Shahidi N.T. Parvovirus B19-induced red blood cell aplasia complicating iron-deficiency anemia. *Clin Pediatr(Phila)* 1995;34(2):108-9.
209. Neshor G, Moore T.L. Human parvovirus infection. *Infect Med* 1997;14:638-42.

Publikační činnost související s disertační prací

Původní práce v časopise s IF

1. Cmejla R, Ludikova B, Sukova M, Blatny J, Pospisilova D. Can mutations in the ribosomal protein S26 (RPS26) gene lead to Klippel-Feil syndrome in Diamond-Blackfan anemia patients? An update from the Czech Diamond-Blackfan Anemia registry. *Blood, Cells Molecules, and Diseases* 2011 Apr 15;46(4):300-1. IF-2,351
2. Pospisilova D, Cmejlova J, Ludikova B, Sary J, Cerna Z, Hak J, Timr P, Petrylova K, Blatny J, Vokurka S, Cmejla R. The Czech National Diamond-Blackfan Anemia Registry: clinical data and ribosomal protein mutations update. *Blood Cells Mol Dis.* 2012 Apr 15;48(4):209-18. IF-2,259

Původní práce v recenzovaném časopise:

1. Ludíková B., Luhový M, Klásková E, Novák Z, Kopřiva F, Pospíšilová D. Méně obvyklé manifestace infekce Parvovirem B 19 u dětí. *Česko-slovenská pediatrie* 2012 Červen; 67 (3):152-59
2. 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 Červen; 67 (3):160-68

Publikovaná abstrakta v zahraničním časopise s IF:

1. Pospisilova D, Cmejlova J, Sary J, Cerna Z, Hak J, Cmejla R, Ludikova B. Phenotype/Genotype Correlations in Diamond-Blackfan Anaemia – An Update From the Czech National DBA Registry. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, Nov 2011; 118: 5269. IF-9,898
2. Pospisilova D, Holub D, Zidova Z, Ludikova B, Sulovska L, Divoky V, Horvathova M. Erythropoiesis and Iron Metabolism In Diamond-Blackfan Anemia. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* Oct.21, 2013. vol.122 no.21 2478. IF- 9,06 (2012)

Publikovaná abstrakta:

1. Ludíková B, Luhový M, Houda J, Novák Z, Pospíšilová D, XIX. Atypická manifestace infekce parvovirem B19 - Konference dětských hematologů a onkologů České a Slovenské republiky 2010
2. Ludíková B, Pospíšilová D. Aplastická krize při parvovirové infekci jako první manifestace hereditární sférocytózy - Festival Kazuistik z pediatrie 2010, Žilina
3. Ludíková B, Luhový M, Houda J, Novák Z, Pospíšilová D. Aplastická krize při infekci parvovirem B19 jako první manifestace hereditární sférocytózy - Konference dětských hematologů a onkologů České a Slovenské republiky 2010
4. Ludíková B, Pospíšilová D, Luhový M. Aplastic crisis at parvovirus B19 infection as first manifestation of hereditary spherocytosis - 3rd Midsummer meeting on Paediatric Haematology and Oncology 2011, Liberec, Czech republic
5. Ludíková B, Pospíšilová D, Mojžíková R, Hak J, Divoký V. XXI. Deficit pyruvátkinázy u pacientů s těžkou hemolytickou anémií a přetížením železem - Konference dětských hematologů a onkologů České a Slovenské republiky 2011
6. Ludíková B, Pospíšilová D, Mojžíková R, Hak J, Divoký V. Co se může skrývat za těžkou hyperbilirubinémií novorozence - VIII. Festival Kazuistik v Luhačovicích 2011
7. Ludíková B, Mojžíková R, Pospíšilová D, Pospíšilová P, Hak J, Divoký V. Pyruvatekinase deficiency in childhood - 4th Midsummer meeting on Paediatric Haematology and Oncology 2012, Gorlitz, Czech republic
8. Ludíková B, Mojžíková R, Pospíšilová D, Pospíšilová P, Hak J, Divoký V. Deficit pyruvátkinázy u pacientů s těžkou hemolytickou anémií a přetížením železem - Kongres pediatrie a dětských sester XXX. dny praktické a nemocniční pediatrie 2012
9. Ludíková B, Pospíšilová D, Mojžíková R, Pospíšilová P, Sulovská L, Hak J, Divoký V, Novák Z. Těžká hemolytická anémie s přetížením železem v novorozeneckém věku - XXII. Konference dětských hematologů a onkologů České a Slovenské republiky, Bratislava 2012
10. Ludíková B, Karásková E, Köcher M, Sulovská L, Pospíšilová D. Třikrát jiná anémie - VI. Festival Kazuistik z pediatrie 2013, Žilina
11. Ludíková B, Karásková E, Köcher M, Sulovská L, Pospíšilová D. Poland Three times different anemia? - 5th Midsummer meeting on Paediatric Haematology and Oncology and stem cell 2013
12. Ludíková B, Čmejla R, Starý J, Černá Z, Hak J, Timr P, Blažek B, Blatný J, Vokurka S, Pospíšilová D. XXIII. Databáze pacientů s Diamondovou-Blackfanovou anémií v České republice - Update 2013 - Konference dětských hematologů a onkologů České a Slovenské republiky, Ostrava 2013

Seznam přednášek:

1. Odborný / klinický seminář pořádaný dětskou při Fakultní nemocnici a Lékařské fakultě
Univerzity Palackého v Olomouci - Méně obvyklé manifestace parvovirové infekce
2. Odborný / klinický seminář pořádaný dětskou při Fakultní nemocnici a Lékařské fakultě
Univerzity Palackého v Olomouci - Neobvyklá příčina anémie a hyperbilirubinémie novorozence