

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Lékařská fakulta

Dětská klinika

Fakultní nemocnice Olomouc

**MUDr. Eva Karásková**

doktorský studijní program Pediatrie P 5174

**Regulace erythropoézy a metabolismu železa  
u anémie chronických chorob se zaměřením  
na anémii u nespecifických střevních zánětů**

Dizertační práce

Školitel: prof. MUDr. Dagmar Pospíšilová, Ph.D.

Olomouc 2019

## **ABSTRAKT**

**ÚVOD:** Crohnova choroba (CD) a ulcerózní kolitida (UC) jsou chronická zánětlivá onemocnění postihující trávicí trakt (inflammatory bowel diseases, IBD). Incidence IBD u dětí i dospělých celosvětově stoupá. Anémie, zejména sideropenická anémie a anémie chronických chorob, je nejčastější extraintestinální systémovou komplikací IBD. U těchto pacientů se často jedná o tzv. „funkční“ deficit železa, kdy i přes dostatečné celkové zásoby v organizmu, není železo pro erythropoézu dostupné. Klíčovým regulátorem metabolismu železa je hepcidin a jeho interakce s transmembránovým přenašečem železa ferroportinem. Produkce hepcidinu je ovlivněna především aktuálními zásobami železa a systémovou zánětlivou aktivitou organizmu. Všeobecně platí, že čím větší je deficit železa, tím nižší je hladina hepcidinu, naopak při aktivním zánětu jeho hladina stoupá. Laboratorní stanovení hladiny hepcidinu má i své praktické využití. Aktuální hodnota může, vedle ostatních markerů, přispět k rozhodnutí o správné strategii léčby železem (parenterální versus perorální forma).

**CÍL:** Prvním cílem bylo stanovit sérové hladiny hepcidinu u dětí s nespecifickým střevním zánětem v době diagnózy, porovnat výsledky u CD, UC a zdravých kontrol a korelovat hladiny hepcidinu s vybranými klinickými a laboratorními parametry. Druhým cílem bylo vyhodnotit změny sérových hladin hepcidinu v dalším průběhu onemocnění a zjistit vztah jeho případných změn k vybraným parametrům metabolismu železa, ukazatelům zánětu a druhu podávané léčby.

**METODY:** V první, průřezové části práce, byly analyzovány hladiny sérového hepcidinu, C-reaktivního proteinu (CRP), sérového železa, feritinu, solubilních transferinových receptorů a kalprotektinu ve stolici u dětských pacientů s nově diagnostikovaným nespecifickým střevním zánětem v období od ledna 2012 do září 2016. Ve druhé, prospektivní části, byla u vybraných dětí s IBD porovnána data z doby diagnózy s daty získanými v dalším průběhu onemocnění,

kdy byli pacienti léčeni udržovací protizánětlivou léčbou. Druhá fáze vyšetření probíhala v březnu až červnu 2018, kdy byly měřeny hladiny hepcidinu a parametry metabolismu železa a zánětu. Hladiny hepcidinu byly stanoveny pomocí kapalinové chromatografie spřažené s hmotnostní spektrometrií. Pro hodnocení aktivity CD byl použit index PCDAI (The Paediatric Crohn's Disease Activity Index) a pro hodnocení aktivity UC index PUCAI (The Paediatric Ulcerative Colitis Activity Index).

**VÝSLEDKY:** Nově diagnostikovaní pacienti s CD (n=53) měli signifikantně vyšší sérové hladiny hepcidinu než pacienti s UC (n=23): 22,6 (8,5–65,0) ng/ml versus 6,5 (2,4–25,8) ng/ml ( $p < 0,05$ ). V celém souboru nemocných s IBD byl hepcidin nezávisle asociován s feritinem. U dětí s CD byla zjištěna jeho signifikantní pozitivní korelace s počtem trombocytů. Negativní korelace hepcidinu s kalprotektinem ve stolici byla zaznamenána ve skupině UC. Během prospektivního sledování došlo u pacientů s CD (n=30) k signifikantnímu poklesu hladin hepcidinu: 36,5 (11,5-79,6) ng/ml versus 2,1 (0,9-6,7) ng/ml ( $p < 0,05$ ). Naopak u nemocných s UC (n=13) se hladiny hepcidinu významně nezměnily: 5,4 (3,4-16,6) ng/ml versus 4,8 (0,9-8,1) ng/ml. Změny hladin hepcidinu korelovaly u nemocných s CD se změnou aktivity choroby a parametrů zánětu (sedimentace erytrocytů, CRP), kdežto u nemocných s UC pouze s hladinami železa. Podání biologické léčby u jedinců s CD bylo ve srovnání s konvenční protizánětlivou terapií provázeno větším poklesem CRP a interleukinu-6.

**ZÁVĚR:** Rozdílné hladiny sérového hepcidinu mezi pacienty s CD a UC na počátku onemocnění a jejich odlišná dynamika v průběhu nemoci odráží různý podíl deficitu železa a zánětu na vzniku anémie. Hepcidin je slibným markerem metabolismu železa, jehož aktuální hladina může, společně s ostatními měřenými parametry, přispět k porozumění reakce organismu na depleci železa při současně probíhajícím zánětlivém procesu. Stanovení sérové hladiny hepcidinu může napomoci k rozhodnutí o typu suplementace železa. Při nízké sérové

hladině se bude železo dobře vstřebávat po perorálním podání, naopak při vysoké hladině hepcidinu bude feroportin v enterocytech blokovat resorpci železa, které pak bude nutné dodávat parenterální cestou.

**KLÍČOVÁ SLOVA:** děti, nespecifický střevní zánět, Crohnova choroba, ulcerózní kolitida, anémie, hepcidin

## **ABSTRACT**

**BACKGROUND:** Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) are chronic disorders affecting the gastrointestinal tract (inflammatory bowel diseases, IBD). Worldwide incidence of IBD both in adults and children is increasing. Anaemia is the most common extraintestinal complication of IBD, predominantly iron deficiency anaemia (IDA) and anaemia of chronic disease (ACD). These types of anaemia (IDA+ACD) are frequently concurrent in patients with IBD. In these cases, total iron body stores are sufficient but not available for erythropoiesis (i.e., "functional" iron deficiency). Hepcidin (and its interaction with ferroportin) is a key regulator of iron metabolism and also serves as a marker of systemic inflammation. Hepcidin binds to ferroportin and blocks its function. Hepcidin production is influenced by two main factors: iron stores and systemic inflammation. In general, hepcidin levels drop with increasing severity of iron deficiency, and conversely, levels of hepcidin rise during systemic inflammation. In addition to other markers, current serum level of hepcidin, may contribute to an appropriate choice of iron supplementation (intravenous versus oral).

**AIM:** The first part of this study was aimed to compare hepcidin levels in paediatric patients newly diagnosed with CD, UC and healthy controls and to evaluate the association of hepcidin levels with laboratory and clinical parameters of IBD activity. In the second phase of the study, we evaluated serum hepcidin levels during the later course of disease and correlated their changes with selected markers of iron metabolism, inflammation and provided treatment.

**METHODS:** Regarding the first phase of the study, children newly diagnosed with IBD between January 2012 and September 2016 were enrolled in this comparative cross-sectional trial. Levels of serum hepcidin, C-reactive protein (CRP), iron, ferritin, soluble transferrin receptors, blood count and faecal calprotectin were analyzed in all subjects. Second phase of the study was conducted between March and June 2018 and included comparison of hepcidin levels at the time of diagnosis and during later maintenance anti-inflammatory therapy in the

individual patients. Serum hepcidin levels were measured by reverse-phase liquid chromatography. The Paediatric Crohn's Disease Activity Index (PCDAI) was used to evaluate CD activity and Paediatric Ulcerative Colitis Activity Index (PUCAI) was used for the assessment of UC disease activity in children.

**RESULTS:** Newly diagnosed CD subjects (n=53) had significantly higher serum hepcidin levels compared with the UC group (n=23): 22.6 (8.5–65.0) ng/mL versus 6.5 (2.4–25.8) ng/mL ( $p<0.05$ ). Hepcidin was independently associated with ferritin levels in all IBD patients. Moreover, there was a significant positive correlation between hepcidin and platelet count in children with CD and a negative correlation between hepcidin and faecal calprotectin in children with UC. Subjects with CD (n=30) had significantly decrease of hepcidin levels during maintenance treatment: 36.5 (11.5-79.6) ng/mL versus 2.1 (0.9-6.7) ng/mL ( $p<0.05$ ). In contrast, no difference of hepcidin levels in UC patients was found: 5.4 (3.4-16.6) ng/mL versus 4.8 (0.9-8.1) ng/mL. Changes in hepcidin levels correlated with disease activity and markers of inflammation (erythrocyte sedimentation rate, CRP) in CD group, whereas only with serum iron level in UC patients. The use of biological treatment in CD patients was accompanied by a larger decrease in CRP and interleukin-6, compared to conventional therapy.

**CONCLUSIONS:** Differences in hepcidin levels between children with newly diagnosed CD and UC and their divergent changes during maintenance treatment suggest a distinct contribution of iron deficiency and/or systemic inflammation to anaemia. Hepcidin is a promising marker, whose current serum level together with other parameters can contribute to understanding the body's reaction to iron depletion during the inflammatory process. Assessment of serum hepcidin levels may contribute to an adequate choice of iron supplementation. In conditions with low serum hepcidin levels, iron should be well absorbed

after oral administration. Contrarily, if the hepcidin level is high, ferroportin in enterocytes will block iron absorption and intravenous iron substitution will be necessary.

**KEY WORDS:** children, inflammatory bowel disease, Crohn's disease, ulcerative colitis, anaemia, hepcidin

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně s uvedením všech použitých literárních zdrojů.

Práce byla podpořena granty IGA MZ NS 9951-4 2008, IGA LF UP 2015-010, IGA LF UP 2016-010, IGA LF UP 2017-013 a MZ ČR – RVO (FNOI, 00098892).

V Olomouci dne 28. března 2019

MUDr. Eva Karásková



## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala všem, kteří mi umožnili absolvovat doktorský studijní program, a kteří mě při studiu podporovali. Z celé řady spolupracovníků bych chtěla poděkovat především své školitelce paní prof. MUDr. Dagmar Pospíšilové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky v průběhu studia i při vypracování dizertační práce. Za všechny odborné rady a konzultace děkuji také prof. MUDr. Vladimíru Mihálovi, CSc. a všem kolegům z Dětské kliniky Fakultní nemocnice v Olomouci.

Sběr dat by nebyl možný bez mých blízkých spolupracovníků v oboru dětské gastroenterologie - MUDr. Márie Velgáňové-Véghové, MUDr. Michaely Špenerové, Ph.D., kteří se podíleli na vyšetřování a sledování pacientů. Rovněž děkuji zdravotní sestře Dagmar Balcárkové, za spolehlivou spolupráci a technickou pomoc při sběru dat, Mgr. Dušanu Holubovi za laboratorní stanovení hladin hepcidinu a paní RNDr. Mileně Krškové za statistické zpracování. Za cenné rady a připomínky během přípravy publikací děkuji MUDr. Janě Volejníkové, Ph.D. a doc. Mgr. Monice Horváthové, Ph.D.

Zvlášť srdečně bych chtěla poděkovat za podporu mému manželovi Davidovi, synům Davidovi a Tomášovi a celé mé milé rodině.

## **OBSAH**

ÚVOD.....	12
CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE.....	12
<b>1. TEORETICKÁ ČÁST</b>	
1.1. Nespecifické střevní záněty.....	13
1.2. Anémie u nespecifických střevních zánětů.....	29
1.3. Význam železa v organismu a regulace jeho metabolismu.....	37
1.4. Hepcidin.....	42
1.5. Souhrn teoretické části.....	51
<b>2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	
2.1. Hladiny hepcidinu u dětí s nově diagnostikovaným nespecifickým střevním zánětem	
2.1.1. Cíl.....	52
2.1.2. Metody.....	52
2.1.3. Výsledky.....	54
2.1.4. Diskuze.....	58
2.1.5. Závěr.....	62
2.2. Změny sérových hladin hepcidinu v průběhu onemocnění, jejich vztah k vybraným parametrům metabolismu železa a ukazatelům zánětu	
2.2.1. Cíl.....	63
2.2.2. Metody.....	63
2.2.3. Výsledky.....	65
2.2.4. Diskuze.....	72
2.2.5. Závěr.....	75

3. LITERATURA.....	76
4. SEZNAM ZKRATEK.....	91
5. SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ.....	94
6. SEZNAM PUBLIKACÍ A PŘEDNÁŠEK AUTORA.....	97
6.1. Publikace a přednášky související s dizertační prací.....	97
6.2. Publikace a přednášky ostatní.....	99
7. PŘÍLOHY.....	105

## ÚVOD

Anémie, zejména sideropenická anémie a anémie chronických chorob, jsou nejčastější extraintestinální systémovou komplikací nespecifických střevních zánětů. U těchto pacientů se často jedná o tzv. „funkční“ deficit železa, kdy i přes dostatečné celkové zásoby v organismu, není železo dostupné pro erytropoézu. Klíčovým regulátorem metabolismu železa je hepcidin a jeho interakce s transmembránovým přenašečem železa ferroportinem. Hepcidin je slibným markerem metabolismu železa, jehož aktuální hladina může, společně s ostatními měřenými parametry, přispět k porozumění reakce organismu na depleci železa při současně probíhajícím zánětlivém procesu.

## CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

- Srovnání sérových hladin hepcidinu u dětí s nespecifickým střevním zánětem v době diagnózy, porovnání výsledků u Crohnovy choroby, ulcerózní kolitidy a zdravých kontrol.
- Zhodnocení vztahu hladin hepcidinu s vybranými klinickými a laboratorními parametry.
- Vyhodnocení dynamiky sérových hladin hepcidinu v průběhu onemocnění (baseline versus follow-up).
- Zhodnocení vztahu případných změn hladin hepcidinu v průběhu onemocnění s vybranými parametry metabolismu železa a ukazateli zánětu.
- Zjištění případných prediktivních ukazatelů, které by v době diagnózy poukazovaly na budoucí závažnější, rizikový průběh onemocnění vyžadující podání biologické léčby.

# 1. TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1. Nespecifické střevní záněty

Crohnova choroba (CD), ulcerózní kolitida (UC) a tzv. neklasifikovatelné zánětlivé střevní onemocnění (IBD-U, IBD-unclassified) jsou chronická zánětlivá střevní onemocnění (inflammatory bowel diseases, IBD) postihující trávicí trakt. Onemocnění vznikne přibližně u 25% pacientů již během dětství a je pak často provázeno závažnějším průběhem, extenzivnějším postižením střeva a častějšími komplikacemi [1]. V literatuře se IBD v dětském věku uvádí pod zkratkou pIBD (paediatric-onset IBD). CD je chronické, často celoživotní, zánětlivé onemocnění kterékoliv části trávicí trubice s predilekčním postižením ileocekální oblasti a tlustého střeva. Postižení je segmentární a zánět postihuje celou tloušťku stěny střevní. V typických případech jde o zánět granulomatózní. Segmentární záněty byly známy již dříve, ale nebyly odlišovány od zánětů tuberkulózních. Až v roce 1932 Crohn, Ginzberg a Oppenheimer identifikovali nosologickou jednotku *ileitis terminalis*. Postupně bylo zjištěno, že onemocnění může postihovat i další části střeva a dostalo název regionální enteritida (řecky *enteron* zahrnuje střevo tenké i tlusté) [2]. UC je chronické, relabující zánětlivé onemocnění tlustého střeva, s maximem změn v rektu, odkud se šíří do různé vzdálenosti tračnicku. Podle rozsahu postižení jde pak o proktitidu, proktosigmoiditidu, levostrannou kolitidu (po lienální ohbí), extenzivní kolitidu (dále za lienální flexuru) a pankolitidu (celý tračník včetně céka). Onemocnění IBD-U je rovněž charakterizováno izolovaným postižením tlustého střeva, avšak endoskopický ani histologický náález neumožňuje v daném čase rozlišit, zda se jedná o CD nebo UC.

## Výskyt

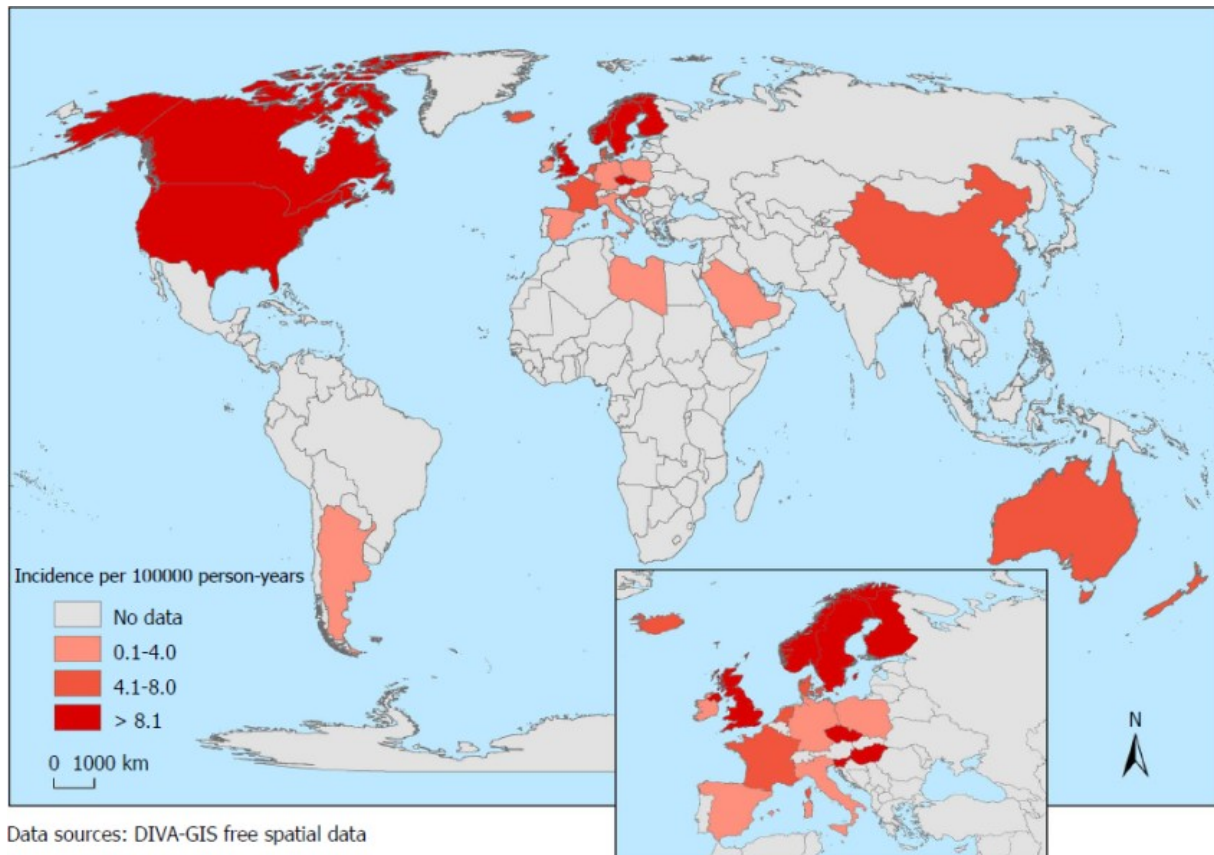
Podle aktuální práce Sýkory et al jsou Evropa (zejména Skandinávie) a Severní Amerika místy s nejvyšší incidencí pIBD na světě (Evropa 0,2-23/100000/rok, Severní Amerika 1,1-15,2/100000/rok). Naopak mezi místa s nejnižším dokumentovaným výskytem patří Latinská Amerika (0,2-2,4/100000/rok) a Afrika (0,0-0,9/100000/rok). Data (ač zpočátku omezená) sledují výskyt pediatrické IBD od roku 1940 a globálně ukazují na vzestupný trend. Některá data z posledních dvou dekad svědčí o stabilizaci incidence (plateau) pIBD v Evropě a Severní Americe, ale zvýšení výskytu v industrializovaných zemích Asie, středního východu a Afriky [3]. Česká republika patří mezi země s nejvyšší incidencí pIBD. Podle studií provedených v ČR došlo k nárůstu pIBD od roku 1990 (nulová incidence) do roku 2001 až na 2,69/100000/rok u CD a 1,84/100000/rok u UC [4], dále pak do roku 2015 na 6,2/100000/rok u CD resp. 2,8/100000/rok u UC [5].

**Tabulka 1.** Incidence nespecifických střevních zánětů u dětí podle kontinentů a regionů. Převzato a upraveno podle [3].

Region	incidence IBD	incidence UC	incidence CD	doba sledování
Severní a Západní Evropa	0,5-23	0,3-15	0,2-12,3	1951-2017
Východní Evropa	2,7-10,0	0,9-5,2	0,25-8,6	1997-2015
Jižní Evropa	0,1-18,3	0,1-9,6	0,5-10,3	1978-2005
Severní Amerika	1,1-15,2	0,5-10,6	0,7-13,9	1940-2010
Latinská Amerika	0,2-2,4	nezjištěno	nezjištěno	2012-2013
Afrika	0,0-0,9	nezjištěno	nezjištěno	1997-2006
Asie/Blízký východ	0,5-11,4	0,2-3,9	0,3-3,7	1968-2012
Australasie	2,9-7,3	0,4-1	0,1-3,5	1971-2015

IBD = nespecifický střevní zánět, UC = ulcerózní kolitida, CD = Crohnova choroba. Incidence - počet nových případů onemocnění na 100 000 obyvatel za rok.

**Obrázek 1.** Incidence nespecifických střevních zánětů u dětí celosvětově. Se souhlasem autora převzato z [3].



### Etiopatogeneze IBD

Zánětlivá střevní onemocnění vznikají jako následek vzájemné interakce mezi genetickými dispozicemi a zevním prostředím. Dalším faktorem, který zasahuje do tohoto procesu je střevní mikrobiom. Jasná příčina IBD dosud nebyla objasněna. Onemocnění je fenotypově heterogenní a příčin bude zřejmě více. U každého pacienta se jednotlivé etiologické faktory různou měrou individuálně kombinují. Ukazuje se, že jedním z nejsilnějších rizikových faktorů pro rozvoj IBD je pozitivní rodinná anamnéza. V případě, že se IBD vyskytuje u prvostupňového příbuzného, je riziko vzniku IBD až desetinásobné oproti běžné populaci [6]. Práce Bengtsona et al zjistila, že pokud u dětí rodičů s IBD vypukne rovněž IBD, tak věk v době diagnózy je dřívější, než u jejich rodičů: rozdíl v mediánu věku v době diagnózy byl až 17 let. Tento jev dávají autoři do souvislosti mimo

jiné s tzv. sdíleným prostředím (sparing environment), například typem stravování, kouřením apod. [7]. Zásadní vliv má genetická predispozice u CD (více než u UC). Konkordance byla prokázána u monozygotních dvojčat v 35% u CD a 16% u UC, u dizygotních dvojčat pouze v 3% u CD a 2% u UC [8].

### *Genetické vlivy*

Relativně dobře prozkoumána jsou monogenní onemocnění, která se projevují mimo jiné i střevním zánětem (tzv. „IBD-like“ onemocnění) a často vznikají již v raném dětství (tzv. very early onset IBD). Jde například o poruchy signalizace interleukinu -10, Wiscott-Aldrichův syndrom nebo chronickou granulomatózní chorobu. Naopak stále trvají nejasnosti v případě genetických dispozic „klasických“ forem IBD. U CD je nejvíce zkoumaným genem *NOD2* gen (nucleotide-binding oligomerization domain containing 2). Gen kóduje protein NOD2, který je intracelulárním receptorem pro složku bakteriální stěny muramyl-dipeptidu [9]. Jeho tři varianty (*p.L1007fsX*, *p.G908R* a *p.R702W*) jsou asociovány s CD [9,10]. NOD1 a NOD2 proteiny jsou také důležité mediátory v endoplazmatickém retikulu, kde se podílí na aktivaci proinflamatorních reakcí [11]. Nicméně přesný patogenetický mechanismus, kterým mutace *NOD2* genu vede ke vzniku CD, znám není. Ve velké studii publikované v roce 2016 (n=29838), která sledovala vztah genotypu a fenotypu IBD, byly zjištěny tři lokusy se signifikantním vztahem k IBD, zejména s lokalizací postižení střeva: *NOD2 (16q12)*, *MHC (6p21)* a *MST1 (3p21)*. Ileální forma CD je asociována s variantami *NOD2* a kolonická forma s alelami HLA systému. Z MHC (major histocompatibility komplex) regionu byla zjištěna nejsilnější vazba ke kolonické CD s alelou *HLA-DRB1\*01:03* a s UC pak alela *HLA-DRB1\*13:01*. Posledním uvedeným asociovaným genem je *MST1* gen, jehož varianty *rs2172252* a *rs3197999* mírně zvyšují relativní riziko pro ileální a ileokolickou formu CD. Varianty *NOD2* genu naopak nejsou asociovány se strikturující formou onemocnění. Závěrem



autoři podle svých výsledků navrhují dělení IBD podle výše uvedených asociací do tří skupin (namísto dvou: CD a UC), a to na 1: ileální CD, 2: kolonickou formu CD a 3: UC [10].

Familiární výskyt různých autoimunitních onemocnění včetně IBD ukazuje na výrazný vliv dědičnosti. Nicméně různé formy klinických projevů, a také různé odpovědi jednotlivých pacientů na léčbu, poukazují na přítomnost dalších, epigenetických vlivů, kdy změny v genové expresi jsou způsobeny například metylací DNA, acetylací histonů a dalšími faktory [12].

### *Střevní mikrobiom*

Mikrobiom střeva stojí na pomezí vlivů genetických a environmentálních. Složení střevní mikroflóry je ovlivněno jednak geneticky, ale také faktory z období raného života (forma porodu, délka kojení), stravovacími zvyklostmi nebo například kouřením [13]. Mikrobiom hraje významnou roli v regulaci funkce epiteliální střevní bariéry a udržení imunologické homeostázy střeva. Komenzální bakterie modulují expresi genů regulujících například intestinální maturaci, bariérovou funkci střeva nebo absorpci nutrietů [14]. Dysregulace interakcí mezi hostitelem a mikrobiomem může vést k abnormální imunitní zánětlivé reakci [15]. Dosud nebylo prokázáno, že by konkrétní kmen bakterie, kvasinky nebo viru byl zodpovědný za vznik IBD. Spíše se jedná o vzájemnou interakci mezi hostitelem a mikroby. Také některé výše uvedené geny (NOD2, ATG16L1) asociované s IBD jsou ty, které určují imunitní reakci hostitele s mikrobiomem [15]. Studována byla i diverzita střevního mikrobiomu u pacientů s IBD. Ve studii dětských pacientů s IBD byla popsána snížená diverzita střevní mikroflóry oproti zdravým kontrolám, a tento faktor signifikantně koreloval s hladinou kalprotektinu ve stolici [16]. Dále byly u dětských pacientů pozorovány změny ve složení střevního mikrobiomu po podání exkluzivní enterální výživy, a to zvýšení počtu a variability kmenů *Firmicutes*, jejichž diverzita je u pacientů s CD redukována [17]. U pacientů s CD byly zjištěny, oproti zdravým jedincům, změny jak v bakteriomu (bakteriálním

mikrobiomu) i tzv. mycobiomu (fugálním mikrobiomu), například vyšší koncentrace *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* a *Candida tropicalis* u pacientů s CD [18]. V jiné studii bylo popsáno snížení počtu a diverzity populace bifidobakterií u dětských IBD pacientů proti zdravým kontrolám [15].

### *Environmentální faktory*

Vzhledem k narůstající incidenci IBD zejména v rozvinutých zemích je zřejmé, že zevní vlivy hrají významnou roli v etiopatogenezi IBD. Diskutovány jsou především vliv stravy vč. kojení, kouření, rozdíly života ve městě a na venkově, antibiotická léčba a další. Prvním faktorem, který je ovšem obtížně uchopitelný, je složení přijímané stravy. Dosud chybí přímé důkazy pro to, že by určitá forma stravy (konzervované potraviny, vysokosacharidová dieta, lepek ve stravě apod.) vedla ke vzniku IBD. Opakovaně byl studován vliv kojení. Problémem je, že období kojení je od doby vzniku IBD velmi vzdálené, a navíc dítě má mimo kojení různorodé složení ostatní stravy. V jedné asijské studii (n=442) byl protektivní vliv kojení potvrzen [19]. V další práci byl zjištěn protektivní vliv kojení při rozvoji IBD v raném věku (early-onset IBD), ale při celkovém hodnocení na CD a UC vliv prokázán nebyl [20]. Metaanalýza z roku 2012 prokázala zvýšené riziko vzniku IBD (více u CD než u UC) u lidí žijících ve městech ve srovnání s obyvateli vesnic a autoři dávají toto riziko do souvislosti s tzv. „hygienickou hypotézou“, tedy nedostatečným kontaktem s různými antigeny včetně enteropatogenů v raném věku a dále se znečištěným životním prostředím [21]. Dalším studovaným rizikovým faktorem byla léčba antibiotiky během prvního roku života. U IBD pacientů byla tato expozice zjištěna v 58%, zatímco u zdravých kontrol v 39% [22].

## Klinický obraz

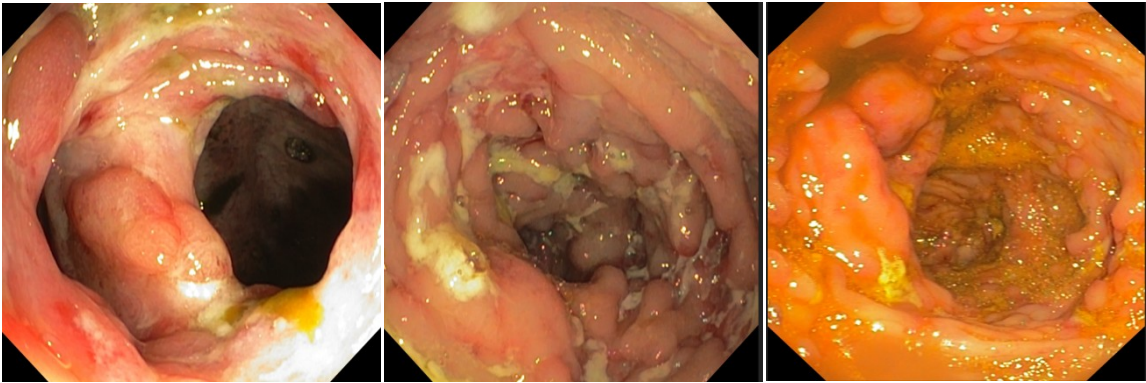
Mezi projevy Crohnovy choroby patří bolesti břicha, průjmy, hubnutí, anémie, únava a porucha růstu. U 13-60% pacientů je přítomno perianální zánětlivé postižení [23]. Pacienti s ulcerózní kolitidou mají typicky průjmy s příměsí krve, tenesmy, noční stolice, často je přítomna anémie. U IBD se u 6-23% dětí vyskytují extraintestinální příznaky, mezi které patří erythema nodosum, uveitida, enteropatická artritida atd. [24]. Děti s IBD mají také vyšší výskyt úzkostné poruchy a deprese [25].

## Diagnostika

Při podezření na IBD u dítěte je nezbytné úvodně vyloučit infekční příčinu potíží. Z laboratorních ukazatelů má být vyšetřen krevní obraz s diferenciálním rozpočtem, C-reaktivní protein, biochemický profil, parametry metabolismu železa a nutrice. Hladina kalprotektinu ve stolici (faecal calprotectin, FC) může významně napomoci k rozhodnutí o indikaci endoskopického vyšetření. Byla prokázána silná korelace mezi FC a endoskopickým nálezem jak u UC tak u CD [26].

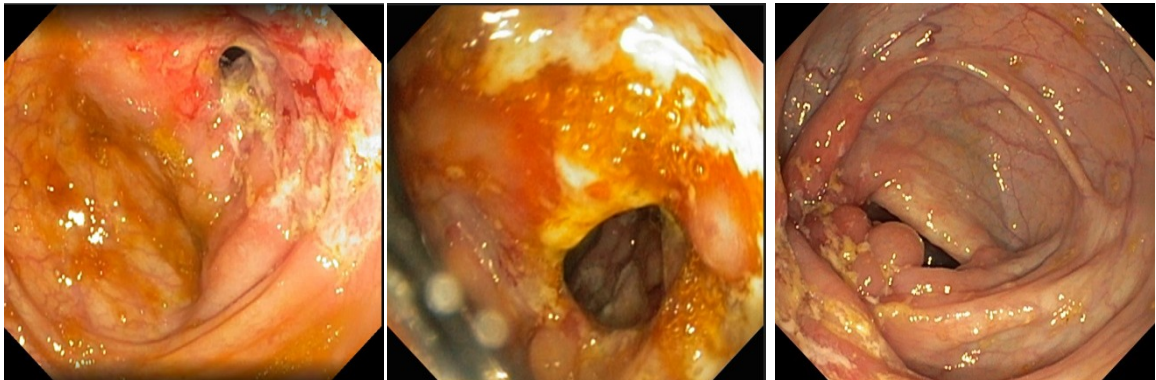
U všech dětí s podezřením na IBD má být podle tzv. portských kritérií provedena koloskopie s terminální ileoskopií a ezofagogastroduodenoskopie. Příklady endoskopických nálezů jsou na obrázcích 2-5. K zobrazení tenkého střeva je pak nejvhodnější magnetická rezonanční enterografie [27, 28].

**Obrázek 2.** Příklady endoskopických nálezů při těžké formě Crohnovy choroby.



Na všech obrázcích je endoskopický pohled do céka, vlevo s ileocekální chlopní. Sliznice je exulcerovaná, chlopeč zející. Na prvním obrázku je v úrovni chlopně cékum stenotizované.

**Obrázek 3.** Komplikace Crohnovy choroby - stenóza v ileocekální oblasti.



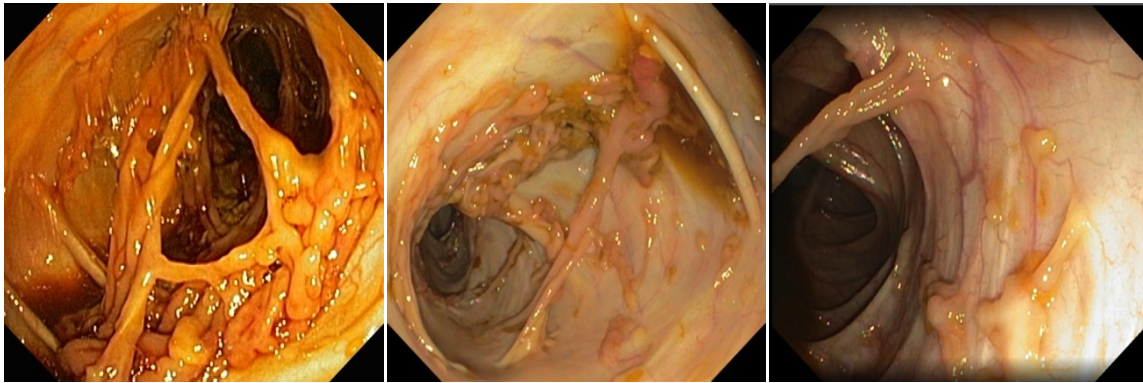
Na všech obrázcích jsou patrné stenózy lumen střeva v terénu zánětlivých změn.

**Obrázek 4.** Příklady endoskopických nálezů při ulcerózní kolitidě.



Při ulcerózní kolitidě má sliznice vymizelou cévní kresbu. Na sliznici jsou drobné plošné ulcerace, eroze a edém.

**Obrázek 5.** Obraz pozánětlivé pseudopolypózy střeva jako forma „hojení“ ulcerózní kolitidy.



Na obrázcích je endoskopický obraz tračníku s přisedlými nebo stopkatými pseudopolypy, z nichž některé jsou mezi sebou propletené a přemost'ují lumen střeva. Okolní sliznice je zhojena.

Rozlišení CD a UC může být obzvláště v pediatrii v některých případech složité a je samozřejmě možné až po kompletním zhodnocení GIT: ileokoloskopie, gastrokopie a zobrazení tenkého střeva. Potíže mohou nastat zejména při izolovaném postižení tlustého střeva, bez známek zánětu na tenkém střevu. Nápomocný je v těchto případech nedávno publikovaný tzv. *pIBD classes system*, který rozděluje znaky onemocnění do tří tříd (viz tabulka 2). V první třídě jsou znaky, které se vyskytují pouze u CD a jsou zcela inkompatibilní s UC, ve druhé třídě pak znaky, které se u UC vyskytují velmi vzácně (<5%) a ve třetí třídě jsou znaky, které se u UC mohou vyskytnout občas (5-10%). Podle počtu bodů je pak možné lépe rozhodnout, zda se jedná o kolonickou formu CD, UC nebo IBD-U (obrázek 6) [29].

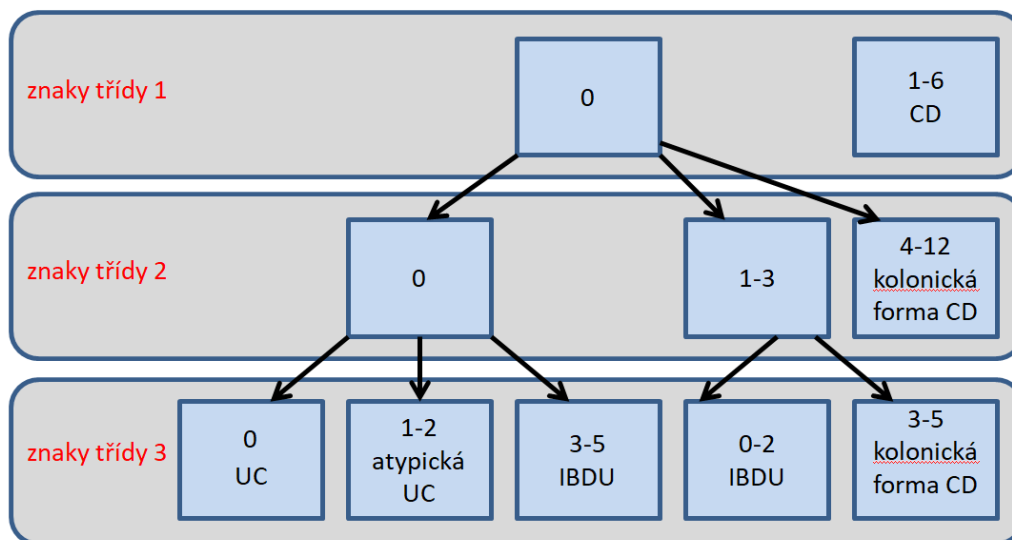
**Tabulka 2.** Systém diferenciální diagnostiky nespecifického střevního zánětu u dětí podle jednotlivých znaků (pIBD classes features). Upraveno podle [29].

Třída 1	1	nejméně jeden granulom kdekoliv v trávicím traktu
	2	nejméně jedna hluboká ulcerace, reliéf „dlažebních kostek“, nebo stenóza v tenkém střevu
	3	fistulující onemocnění
	4	velké, zánětlivé, perianální fibromy
	5	ztluštění stěny tenkého střeva podle zobrazovacích metod nebo zánětlivé změny při kapslové endoskopii (s výjimkou backwash ileitidy)
	6	jakékoliv ileální postižení při absenci zánětu v céku tj. inkompatibilní s backwash ileitidou
Třída 2	7	skip léze, s výjimkou „rectal sparing“ a „caecal patch“
	8	kompletní „rectal sparing“ (mikroskopicky i makroskopicky)
	9	úseky zánětlivě změněného kolon a makroskopicky normálního kolon s histologicky prokázaným zánětem
	10	signifikantní růstová retardace (růstová rychlost minus < 2SD) nevysvětlitelná jinak (celiakie, deficit růstového hormonu, dlouhodobá léčba kortikoidy apod.)
	11	transmurální zánět tračníku pokud se nejedná o těžkou akutní kolitidu
	12	ulcerace v tenkém střevu, duodenu nebo jícnu nevysvětlitelné jinak (infekce <i>Helicobacter pylori</i> , abusus nesteroidních antiflogistik, celiakie apod.)
	13	vícečetné (> 5) aftoidní ulcerace žaludku nebo tračníku v terénu normální sliznice, nevysvětlitelné jinak (infekce <i>Helicobacter pylori</i> , abusus nesteroidních antiflogistik apod.)
	14	backwash ileitida při relativně nevýznamném zánětu v céku
	15	pozitivita ASCA při negativitě pANCA
	16	opačný gradient zánětlivých změn (proximálně > distální) s výjimkou „rectal sparing“ efektu
	17	výrazné políčkování sliznice žaludku nebo duodena nevysvětlitelné jinak (infekce <i>Helicobacter pylori</i> , celiakie apod.)
	18	hluboké ulcerace (alespoň jedna) nebo „relief dlažebních kostek“ v žaludku nevysvětlitelný jinak (infekce <i>Helicobacter pylori</i> , abusus nesteroidních antiflogistik apod.)
Třída 3	19	histologicky fokální chronická duodenitida
	20	histologicky fokální aktivní kolitida
	21	několik (< 5) aftoidních ulcerací v tračníku nebo v žaludku
	22	průjmy bez krve
	23	histologicky fokální gastritida

Známky IBD zcela neslučitelné s UC (třída 1), výskyt u UC <5% (třída 2) a výskyt u UC 5-10% (třída 3).

ANCA = Anti Neutrophil Cytoplasmic Antibodies, ASCA = Anti *Saccharomyces Cerevisiae* Antibodies, rectal sparing effect = kolitida šetřící rektum, caecal patch = izolované zánětlivé změny v céku, periapendikulárně, SD = směrodatná odchylka

**Obrázek 6.** Rozhodovací algoritmus k rozdělení nespecifických střevních zánětů do jednotlivých podtříd (ulcerózní kolitida, kolonická forma Crohnovy choroby, neklasifikovatelný nespecifický střevní zánět). Upraveno podle [29].



CD = Crohnova choroba, UC = ulcerózní kolitida, IBD-U = neklasifikovatelné IBD

Aktivitu IBD lze objektivizovat pomocí indexů aktivity onemocnění. *Paediatric Crohn's Disease Activity Index* (PCDAI) hodnotí stav dle klinických příznaků, laboratorních, antropometrických dat a fyzikálního vyšetření pacienta (tabulka 3) [30]. PCDAI má rozsah od 0 do 100 bodů. Skóre  $\leq 10$  svědčí pro remisi onemocnění, rozmezí od 11 do 30 bodů ukazuje lehkou aktivitu nemoci a hodnoty nad 30 pak aktivitu vysokou. *Paediatric Ulcerative Colitis Activity Index* (PUCAI) vychází z klinických potíží pacienta (tabulka 4) [31]. Rozmezí indexu je od 0 do 85 bodů. Skóre menší než 10 bodů značí remisi, hodnoty mezi 10 až 34 body ukazují na lehkou aktivitu, na vysokou aktivitu pak body mezi 35 až 64. Pro těžkou akutní kolitidu svědčí PUCAI score nad 65 bodů.

**Tabulka 3.** Pediatrický index Crohnovy choroby (PCDAI). [27].

Anamnéza		Body
bolesti břicha	žádné	0
	mírné (krátce trvající, neruší denní aktivitu)	5
	těžké (déle trvající, noční, narušují denní aktivitu)	10
stolice za 24 h	0 – 1 tekuté stolice, bez krve	0
	do 2 kašovitých s příměsí krve nebo 2–5 tekutých	5
	výrazné krvácení, 6 a více stolic, noční průjem	10
denní aktivita, únava	bez limitace, cítí se dobře	0
	občasné potíže, podprůměrný pocit	5
	časté omezení denní aktivity, velmi špatný pocit	10
<b>Laboratorní hodnoty</b>		
hematokrit (%) 0–10 let	nad 32	0
	28–32	2,5
	pod 28	5
dívký 11–19 let	nad 33	0
	29–33	2,5
	pod 29	5
chlapci 11–14 let	nad 34	0
	30–34	2,5
	pod 30	5
chlapci 15–19 let	nad 36	0
	32–36	2,5
	pod 32	5
FW (mm/h)	pod 20	0
	20–50	2,5
	nad 50	5
albumin (g/l)	nad 34	0
	31–34	5
	pod 31	10
<b>Fyzikální vyšetření</b>		
tělesná hmotnost	přiměřený přírůstek hmotnosti	0
	neúmyslně stabilní hmotnost, ztráta hmotnosti 1–9 %	5
	ztráta hmotnosti víc než 9 %	10
růstová rychlost	větší než -1 SD	0
	-1 SD až -2 SD	5
	menší než -2 SD	10
břícho	žádná palpační bolestivost, bez hmatné patologické rezistence	0
	palpační bolestivost nebo hmatný infiltrát bez bolestivosti	5
	bolestivost, dobře hmatná rezistence	10
perianální postižení	žádné, asymptomatické výrůstky v okolí konečníku	0
	1–2 nebolestivé píštěle s malou sekrecí, žádná bolestivost	5
	aktivní píštěl se sekrecí, bolestivost nebo absces, drenáž	10
<b>Extraintestinální projevy</b> (horečka nad 38,5 °C po dobu tří dnů během týdne, artritida, uveitida, erythema nodosum, pyoderma gangrenosum):		
	žádné	0
	jeden	5
	více než jeden	10

FW = sedimentace, SD = směrodatná odchylka, maximální skóre = 100 bodů

Orientační rozmezí aktivity onemocnění:

- remise: PCDAI < 10 bodů

- mírná zánětlivá aktivita: PCDAI 10 – 30 bodů

- střední až vysoká zánětlivá aktivita: PCDAI > 30 bodů



**Tabulka 4.** Pediatrický index ulcerózní kolitidy (PUCAI) [27].

	Body
<b>Bolest břicha</b>	
žádná	0
může být ignorována	5
nemůže být ignorována	10
<b>Krev ve stolici</b>	
žádná	0
malé množství, v méně než 50 % stolic	10
malé množství ve většině stolic	20
velké množství (více než 50 % objemu stolice)	30
<b>Konzistence většiny stolic</b>	
formované	0
částečně formované	5
zcela neformované	10
<b>Počet stolic za 24 hodin</b>	
0–2	0
3–5	5
6–8	10
>8	15
<b>Noční stolice (jakákoliv epizoda vedoucí k probuzení)</b>	
ne	0
ano	10
<b>Denní aktivita</b>	
bez omezení	0
občasné omezení aktivity	5
významné omezení aktivity	10

Maximální skóre: 85 bodů

Orientační rozmezí aktivity onemocnění:

- remise: PUCAI < 10 bodů
- mírná zánětlivá aktivita: PUCAI 10 – 34 bodů
- střední zánětlivá aktivita: PUCAI 35 – 64 bodů
- vysoká zánětlivá aktivita: PUCAI > 65 bodů

Korelace obou indexů s endoskopickým nálezem, je rozdílná. Podle nedávné studie PCDAI špatně koreluje s endoskopickým skóre SES-CD (simple endoscopic score for Crohn's disease,  $r=0,33$ ) [32], ačkoliv recentní studie Turnera uvádí o něco lepší výsledky ( $r=0,42-0,45$ ) [33]. Naopak u PUCAI byla korelace s endoskopickým nálezem (Mayo score) výborná ( $r=0,95$ ) [29]. Z těchto důvodů se v klinické praxi podstatně více využívá PUCAI index, kdy již podle klinických potíží, které index zahrnuje, je možné usuzovat na tíži onemocnění.

## Léčba Crohnovy choroby

Terapie CD se u dětí v posledních letech významně změnila, a to především díky biologické léčbě a výlučné (exkluzivní) enterální výživě (EEV). Cílem léčby je nejen zmírnit či alespoň odstranit klinické symptomy a v ideálním případě dosáhnout slizničního hojení, ale také zlepšit kvalitu života za minimalizace lékové toxicity a obnovit růst a zrání dětského organismu. Lékem první volby k indukci remise pediatrické CD je EEV, která v posledních letech z velké části nahradila léčbu kortikoidy. EEV spočívá v podávání tekutých, sterilních a komplexních (vyvážená směs makro a mikronutrientů) preparátů enterální výživy po dobu 6-8 týdnů. Dávka se vypočítá podle potřeb organismu v daném věku. K EEV pak již dítě nedostává žádnou jinou stravu a pije pouze neslazenou balenou vodu [34]. Celkový účinek léčby EEV je minimálně srovnatelný s kortikoidy při získání přidané hodnoty ve smyslu zlepšení nutričního stavu [35]. Bylo zjištěno, že po terapii EEV (v týdnu 10) dojde ke slizničnímu hojení u 74% dětí, zatímco po léčbě kortikoidy pouze v 33% [36]. Mechanismus účinku EEV není přesně objasněn. Při EEV se obnovuje epiteliální bariéra a ovlivněn je i střevní mikrobiom [17]. EEV se vyznačuje minimálním výskytem nežádoucích účinků. Pozor je třeba dát při zahajování léčby zejména u předtím malnutričních dětí a dávkovat EEV postupně ve vzestupných dávkách, aby se předešlo vzniku refeeding syndromu [37]. Kortikoidy jsou indikovány při selhání nebo intoleranci EEV a při extraintestinální manifestaci onemocnění. Indukční léčba (EEV event. kortikoidy) je následovaná udržovací léčbou imunomodulačními léky (azathioprin, 6-merkaptopurin nebo methotrexát). Nejčastěji používaným lékem je azathioprin. Udržovací léčba má být zahájena u všech dětí s CD se středně těžkou a těžkou formou onemocnění. U pacientů, kteří na léčbu neodpovídají, může být prospěšné zjištění hladin metabolitů azathioprinu: 6-thioguaninu a 6-metylmerkaptopurinu a podle výsledků upravit terapii. V případě těžkých forem CD se při selhání imunomodulační léčby indikuje léčba biologická pomocí anti-TNF (anti-tumor necrosis factor) léčiv. Pro

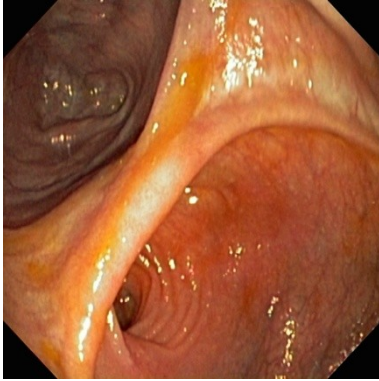
indukční a udržovací léčbu CD v pediatrii je prozatím schválen infliximab a adalimumab. Obě léčiva mají srovnatelnou účinnost i bezpečnostní profil. Podávání jiných biologik (golimumab, vedolizumab), používaných u dospělých s IBD, je u dětí zatím možné pouze v režimu off-label. Chirurgická léčba CD připadá v úvahu při selhání medikamentózní léčby a při komplikacích. Akutní výkony zahrnují řešení ileózních stavů, perforací, krvácení nebo abscesů. V případě izolovaného ileocekálního postižení se strikturou lze zvážit elektivní ileocekální resekci jako léčebnou možnost vedle léčby medikamentózní. Při extenzivnějším postižení střeva je naopak třeba vyvinout maximální úsilí k využití všech konzervativních léčebných modalit, aby se předešlo vzniku syndromu krátkého střeva [23,27].

### Léčba ulcerózní kolitidy

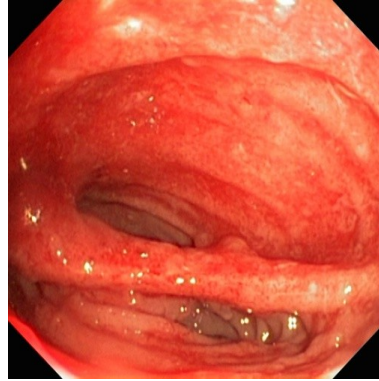
Základem léčby lehké a středně těžké UC jsou aminosalicyláty, nejčastěji mesalazin. V případě, že je uvedená léčba bez efektu, podáváme systémově působící kortikoidy. U akutní těžké kolitidy jsou kortikoidy lékem první volby. Při jejich neúčinnosti pak následuje léčba biologická (infliximab). K udržení remise se užívají imunomodulační léky (viz výše léčba CD). Podle aktuálních doporučení pro léčbu UC je z biologik nejvhodnější infliximab. U primárních nonrespondérů na anti-TNF léčbu lze, po vyloučení jiné příčiny potíží (zejm. infekce a stenóza), podat vedolizumab (protilátka proti  $\alpha_4\beta_7$  integrinu). U sekundárních nonrespondérů je indikováno podání adalimumabu nebo golimumabu [29]. Chirurgická léčba UC zahrnuje akutní výkony u stavů s vysokým rizikem vzniku toxického megacolon nebo nezvladatelným krvácením. Jediným elektivním výkonem u UC je restorativní proktokolektomie s ileal-pouch-anální anastomózou [27] (obrázek 7).

**Obrázek 7.** Stav po totální proktokolektomii s modelací ileo-pouch-anální anastomózy při těžké ulcerózní kolitidě.

A: bez známek aktivního zánětu



B: s obrazem zánětu tzv. pouchitidy



Na obou obrázcích jsou endoskopické nálezy přívodného i slepého raménka rezervoáru (pouche) a septa mezi nimi.

Cílem adekvátní léčby IBD je maximální léčebný účinek při minimální lékové toxicitě. Proto se hledají prediktivní faktory, které by pomohly již od počátku odlišit pacienty s nízkým a naopak vysokým rizikem vzniku rychlé progresy a komplikací onemocnění, a podle toho pak stratifikovat terapii. Tedy především včas zahájit podání biologické léčby u dětí s vysokým rizikem nebo naopak ponechat dítě s nízkým rizikem bez udržovací imunomodulační léčby. Zkoumány jsou v tomto směru různé prediktivní faktory, jako je věk v době diagnózy, závažnost vstupního endoskopického nálezu, růstová retardace v době diagnózy atd. Nicméně prozatím nebyly tyto faktory jasně specifikovány [38].

## 1.2. Anémie a nespecifické střevní záněty

Anémie představuje nejčastější extraintestinální systémovou komplikaci IBD. Postihuje 6-74% dospělých hospitalizovaných pacientů a 19-21% pacientů sledovaných ambulantně [39]. U dětí s IBD je výskyt anémie také velmi častý a odhaduje se v rozmezí 41% až 75% [40]. Přítomnost anémie zhoršuje kvalitu života, fyzické, emoční a kognitivní funkce IBD pacientů, a to zejména z důvodů akcentovaného únavového syndromu [39,41]. Je také známo, že léčba IBD pacienta s anémií je nákladnější než léčba pacienta bez anémie [42].

Etiologie anémie je u IBD multifaktoriální. Nejčastěji se kombinuje anémie z nedostatku železa (iron deficiency anaemia, IDA) a anémie chronických chorob (anaemia of chronic disease, ACD). Mezi další, méně časté typy patří anémie z deficitu vitamínu B12, nejčastěji po resekci terminálního ilea. Anémie z nedostatku kyseliny listové může nastat u malnutričních dětí nebo jako nežádoucí účinek léčby metotrexátem nebo sulfasalazinem. Dalšími léky, které mohou přispívat ke vzniku anémie, jsou azathioprin a 6-merkaptopurin. Jejich podání může u disponovaných pacientů, kteří mají sníženou aktivitu enzymu thiopurin-methyl-transferázy, vést k leukopenii, trombocytopenii, anémii a v extrémním případě až k aplázii kostní dřeně [39]. Všechny typy anémie u IBD bez deficitu železa jsou někdy řazeny do skupiny tzv. non-iron deficiency anaemia (NIDA) (tabulka 5) [43].

**Tabulka 5.** Příčiny anemie bez deficitu železa (NIDA) podle četnosti výskytu. Převzato z [43].

časté	anémie chronických chorob
méně časté	deficit kobalaminu, folátu polékové: aminosalicyláty, azathioprin, 6-merkaptopurin
vzácné	hemolýza myelodysplastický syndrom aplastická anémie deficit glukózo-6-fosfát dehydrogenázy

Příčinou vzniku IDA jsou krevní ztráty do trávicího traktu, snížený příjem železa ve výživě a snížená absorpce železa po resekcích výkonech na tenkém střevu. Na vzniku ACD se podílí především zánětlivými cytokiny indukovaná produkce hepcidinu v játrech s následnou poruchou vstřebávání železa z enterocytů a sníženým uvolňováním železa z buněk retikuloendotelového systému. Zánět se podílí také na snížení sekrece erytropoetinu, zvýšení rezistence receptorů erytroidních buněk k erytropoetinu, snížení proliferace a maturace erytroidních prekurzorů a snížení přežívání erytrocytů při akcentované erytrofagocytóze [39].

ACD je většinou lehká nebo středně těžká anémie. Hodnoty hemoglobinu pod 80g/l jsou vzácné [39]. Je snižená hladina retikulocytů, normální nebo snížený střední objem erytrocytů (MCV, mean cell volume), snížené sérové železo a normální nebo zvýšený feritin. Železo je sekvestrováno v retikuloendotelovém systému, ale díky nadprodukcí hepcidinu s následnou internalizací feroportinu, nedostupné v séru, což vede k tzv. funkčnímu deficitu železa (functional iron deficiency, FID).

### Diagnostika anémie

Přestože je anémie u IBD častá, zůstává někdy nedagnostikovaná a neléčená. Nedávná studie v USA zjistila, že asi třetina anemických pacientů s UC nebyla vůbec na parametry metabolismu železa testována [44].

Anémii definuje snížená hladina hemoglobinu. Tento parametr se mění v průběhu života a ovlivňují ho různé faktory (např. věk, etnikum, gravidita, nadmořská výška apod.). Normální hladiny hemoglobinu u dětí a dospělých podle WHO kritérií jsou uvedeny v tabulce 6 a platí i pro IBD pacienty [43].

**Tabulka 6.** Cut-off hladiny hemoglobinu a hematokritu používané k definování anémie. Převzato a upraveno podle [43].

	hemoglobin (g/l)	hematokrit (%)
děti 6 měsíců-5 let	110	33
děti 5-11 let	115	34
děti 12-13 let	120	36
muži >13 let	130	39
ženy > 13 let	120	36

Podle doporučení Evropské společnosti pro Crohnovu chorobu a ulcerózní kolitidu (ECCO) mají být na přítomnost anémie pravidelně testováni všichni nemocní s IBD. ECCO doporučuje ke screeningu anémie vyšetřovat kompletní krevní obraz, sérový feritin a C-reaktivní protein. U pacientů v remisi má být screening prováděn jednou za 6-12 měsíců, u pacientů s aktivním onemocněním nejméně jednou za 3 měsíce. Pokud je anémie diagnostikována, je třeba doplnit další parametry: šíře distribuce erytrocytů (RDW, red cell distribution width), střední objem erytrocytů (MCV, mean cell volume), počet retikulocytů, procento hypochromních erytrocytů (%HYPO) a koncentrace hemoglobinu v retikulocytech (RetHb, reticulocyte hemoglobin concentration). K rozšířenému panelu vyšetření dále patří diferenciální rozpočet leukocytů, solubilní transferinové receptory (sTfR), případně index sTfR/log feritin, saturace transferinu (TSAT), hladina vitamínu B12, folátu, haptoglobinu, laktátdehydrogenázy, urey a kreatininu. U pacientů po resekci terminálního ilea je třeba hladinu vitamínu B<sub>12</sub> (ev. homocysteinu a methylmalonátu v moči) monitorovat minimálně jednou ročně [39,43].

Diferenciální diagnostika anémií u IBD zahrnuje nejčastěji tři varianty: IDA (bez přítomnosti známek zánětu), ACD a kombinaci IDA+ACD. Z pohledu metabolismu železa se u IDA jedná o absolutní deficit železa, při ACD o funkční deficit železa a při IDA+ACD se oba mechanismy v různé míře kombinují (tabulka 7).

**Tabulka 7.** Diagnostika deficitu železa. Převzato a upraveno podle [45].

	absolutní deficit železa	funkční deficit železa při zánětu	kombinace absolutního a funkčního deficitu železa
sérový feritin	↓	↑	záleží na stupni deficitu železa
TSAT	↓	↓	↓
hepcidin	↓	↑	záleží na stupni deficitu železa
RetHb	↓	↓	↓
%HYPO	↑	↑	↑
sTfR	↑	↓	↓ nebo normální
sTfR/log ferritin	↑	↓	↑
CRP	normální	↑	↑

TSAT = saturace transferinu, RetHb = koncentrace hemoglobinu v retikulocytech, %HYPO = procento hypochromních erytrocytů, sTfR = solubilní transferinové receptory, CRP = C-reaktivní protein.

*Parametry metabolismu železa:*

**Saturace transferinu (TSAT)** se vypočítává jako poměr sérového železa a celkové vazebné kapacity pro železo [46]. Pro deficit železa svědčí TSAT < 20%. [45].

**Procento hypochromních erytrocytů (%HYPO)** je považováno za časný indikátor deficitu železa. Pro deficit železa svědčí hodnota nad 6%. [45].

**Koncentrace hemoglobinu v retikulocytech (RetHb)** poukazuje na aktuální (3-4 dny) dostupnost železa k syntéze hemoglobinu. Nízká hodnota (< 28 pg) svědčí pro deficit železa při erytropoéze [45].

**Sérová hladina železa** bývá snížena u IDA i ACD. Její vyšetření, bez doplnění dalších parametrů, je ale pro hodnocení deficitu železa zavádějící. Hladina diurnálně kolísá, a proto by měl být odběr proveden ráno, na lačno, aby se minimalizovala variabilita tohoto markeru [46].

**Sérový feritin** za fyziologických okolností odráží tělesné zásoby železa. Při zánětu se ale chová jako reaktant akutní fáze zánětu, takže v tomto případě jeho zvýšená hladina deficit železa nevylučuje [43]. Pokud byly sérové hladiny feritinu měřeny několik dnů po sobě, tak se individuálně lišily až o 15% u mužů, o 27% u žen a v dlouhodobém sledování dokonce o



62% [47,48]. Cut-off hodnota feritinu svědčící pro deficit železa je u pacientů bez zánětlivé aktivity méně než 30 µg/l (92% senzitivita, 98% specificita). Při zánětu ukazuje na deficit železa hladina feritinu pod 100 µg/l. Pokud se koncentrace feritinu pohybuje mezi 100-300 µg/l, pak je vhodné kombinovat toto vyšetření s měřením TSAT. Pro deficit železa pak svědčí TSAT < 20%. Pokud ani tako kombinace neurčí přesně deficit železa, je třeba doplnit ostatní parametry (viz tabulka 7) [45].

**Solubilní transferinové receptory (sTfR)** jsou jednoduché polypeptidy (85 kDa), které se uvolňují do séra z transmembránových transferinových receptorů (190 kDa) exprimovaných na povrchu erytroidních buněk. Plazmatická koncentrace sTfR odráží denzitu receptorů na povrchu buněk, tedy přímo ukazuje aktivitu erythropoézy a inverzně dostupnost železa pro erythropoézu [49,50]. Na rozdíl od feritinu a transferinu není jejich hodnota ovlivněna zánětem [39]. Nárůst sTfR registrujeme při deficitu železa nebo zmnožení erytroidních elementů v kostní dřeni, které může být důsledkem hemolýzy nebo neefektivní erythropoézy. Jeho stanovení může pomoci v diferenciální diagnostice IDA a ACD.

**Index sTfR/log feritin** je vhodným vyšetřením, které má výhodu recipročního vztahu mezi dvěma proměnnými, což zvýrazňuje rozdíl mezi nimi a zlepšuje tak diferenciální diagnostiku mezi IDA, ACD a IDA+ACD. Hodnota indexu nad 1,4 (tj. zvýšení sTfR a snížení feritinu) ukazuje na deficit železa [39].

**Sérová hladina hepcidinu** může přispět k diferenciální diagnostice anémií (ACD versus IDA). Všeobecně platí, že čím větší je deficit železa, tím nižší je hladina hepcidinu, naopak při zánětu jeho hladina stoupá.

## Léčba anémie u IBD

Léčba anémie u IBD spočívá jednak v substituci železa a současně v potlačení systémové zánětlivé aktivity vlastního onemocnění (kortikoidy, imunomodulancia, biologická léčba). Správná volba léčebného postupu je zásadní pro dosažení efektu při současné eliminaci nežádoucích účinků léčby.

Mezi cíle léčby anémie patří odstranění klinických symptomů, zlepšení kvality života, normalizace hemoglobinu a doplnění zásob železa. Vzestup hladiny hemoglobinu alespoň o 20 g/l za čtyři týdny považuje ECCO za akceptovatelnou odpověď na léčbu [43]. Léčba železem je doporučena u všech pacientů s IBD pokud je zjištěna IDA. Opakovaně bylo v literatuře diskutováno, zda je u pacientů s IBD bezpečná perorální forma železa. Na animálních modelech vedlo perorální podávání k toxickému efektu železa na sliznici tlustého střeva a vzestupu produkce zánětlivých cytokinů (interleukin-1 $\alpha$ , interleukin-6, interferon- $\gamma$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ ) [51,52,53]. Po léčbě perorálním železem byly popsány i změny střevního mikrobiomu. Došlo k signifikantnímu zvýšení množství enterobakterií a snížení počtu lactobacilů. Zvýšené hladiny fekálního kalprotektinu svědčily o aktivaci zánětu v trávicím traktu [54]. Jiná studie u IBD pacientů zjistila po léčbě perorálním (ve srovnání s parenterálním) železem snížení diverzity střevní mikroflóry (snížení množství *Faecalibacterium prausnitzii*, *Ruminococcus bromii*, *Dorea species* a *Collinsella aerofaciens*) [55].

Efekt perorální a intravenózní aplikace železa na úpravu anémie byl porovnáván v randomizované prospektivní multicentrické studii u 46 IBD pacientů. V obou skupinách došlo ke srovnatelnému vzestupu hemoglobinu, ale pouze ve skupině s parenterální aplikací byl dokumentován i vzestup feritinu. Ve skupině s perorálně podávaným železem muselo pět pacientů (20,8%) přerušit léčbu pro gastrointestinální potíže, zatímco ve skupině s

intravenózní aplikací byl zaznamenán nežádoucí účinek pouze u jednoho pacienta (4,5%) [56]. V meta-analýze, která zahrnula 333 pacientů s IBD, byly po intravenózní (versus perorální) léčbě železem zjištěny vyšší hladiny hemoglobinu a feritinu [57]. Také v další práci zahrnující 694 IBD pacientů se hladiny hemoglobinu více zvýšily ve skupině, kde bylo železo podáváno parenterálně [58]. Dobrý bezpečnostní profil intravenózně podávaného železa (Fe-karboxymaltózy) a efektivita léčby u dětí s IBD byly potvrzeny ve studii Laasse et al [59].

Intravenózní substituce železa má být podle ECCO doporučení zvažena jako léčba první linie u pacientů s klinicky aktivním IBD a u pacientů s předchozí intolerancí perorálního železa, pokud jejich hladina hemoglobinu klesne pod 100 g/l. Parenterální substituce vede u těchto pacientů k rychlejšímu nástupu účinku, je efektivnější a lépe tolerovaná než léčba perorální. Efekt léčby lze sledovat podle hladin hemoglobinu, feritinu a saturace transferinu. Hodnoty feritinu nad 800 µg/l a saturace transferinu nad 50% už svědčí pro přetížení železem s potenciálem orgánové toxicity. Riziko přetížení železem při léčbě je ale u pacientů s IBD většinou nízké pro chronické ztráty železa do trávicího traktu [43].

Perorální substituce železa, obvyklá u jiných diagnóz, je u aktivní formy IBD limitována a indikujeme ji pouze v případech lehké anémie u pacientů v remisi [43]. Studie Morettiho na malém souboru pacientů ukazuje, že podávání perorálního železa denně vede k rychlé elevaci hladiny hepcidinu s následným snížením resorpce železa. Naproti tomu alternativní podávání železa obden (48 hodin) „dává čas“ hepcidinu vrátit se na normální hladinu a nesuprimovat resorpci železa [60]. Studie Schaapa et al ale tyto poznatky nepotvrdila. Podle ní, má na hladiny hepcidinu větší vliv jeho diurnální kolísání, než perorální substituce železa [61].

K rozhodnutí o perorální vs. parenterální léčbě železem může přispět znalost sérové hladiny hepcidinu. Při vysokých hladinách hepcidinu je perorální léčba železem neúčinná.

Naopak nízké nebo až nedetekovatelné hladiny hepcidinu ukazují, že perorální léčba železem by měla být efektivní [53]. Studie Bregmana et al sledovala pacienty s IDA neodpovídající na perorální léčbu železem. Hladiny hepcidinu byly u nonrespondérů signifikantně vyšší než u respondérů: 38,4 ng/ml (SD 66,7) versus 11,3 ng/ml (SD 19,0) [62].

Léčba anémie bez deficitu železa (NIDA) spočívá v léčbě příčiny. Nejčastěji jde o parenterální substituci vitamínu B<sub>12</sub> (u stavů po resekci terminálního ilea) nebo substituci folátu. V případě toxického působení azathioprinu nebo aminosalicylátů je pak nutné snížit dávku nebo lék vysadit.

Pokud není u IBD pacienta s optimalizovanou protizánětlivou léčbou efektivní parenterální aplikace železa, může být zvážena léčba pomocí erytropoézu stimulujících látek (erythropoiesis stimulating agents, ESA). Transfúze erytrocytární masy má být u IBD pacientů podána při poklesu hemoglobinu pod 70g/l, při akutním vzniku anémie, hemodynamické nestabilitě nebo selhání ostatních léčebných metod. Po transfúzi následuje intravenózní léčba železem [43].

#### Prevence deficitu železa u IBD pacientů

Po efektivní intravenózní léčbě recidivuje do 10 měsíců anémie až u 50% IBD pacientů, proto je podle ECCO doporučení dnes preferován proaktivní přístup. Po úspěšné léčbě anémie má být léčba obnovena, pokud klesne sérový feritin pod 100 µg/l nebo hemoglobin pod 120 g/l [43].

### 1.3. Význam železa v organismu a regulace jeho metabolismu

Železo je esenciální prvek téměř všech živých organismů s výjimkou některých druhů laktobacilů. Hraje významnou roli při mnoha metabolických dějích, od dělení buněk až po transport kyslíku. Jako součást hemu participuje na funkci hemoglobinu, myoglobinu a cytochromů. Podílí se na syntéze enzymů, je nepostradatelné pro funkci mitochondrií a produkci energie. Je součástí sloučenin obsahujících železo a síru (iron-sulphur clusters), kde má esenciální roli v procesech buněčné proliferace a reparační DNA [53].

Lidské tělo obsahuje celkem 3 - 4 g železa a většina je uložena intracelulárně, zejména v erythrocytech (v hemoglobinu, 2 - 2,5 g), dále v makrofázích a hepatocytech ve formě feritinu (0,5 - 1 g), v myoglobinu a některých enzymech (0,5 g). Obsah železa v organismu závisí na pohlaví, stavu výživy a zdravotním stavu. Běžná strava obsahuje přibližně 10 – 20 g železa/den, ale z toho se vstřebává pouze asi 10% [63].

Náš organismus nemá kontrolované mechanismy exkrece železa, homeostáza železa je řízena přes jeho absorpci, utilizaci a recyklaci [64]. Koncentrace extracelulárního železa závisí na rovnováze mezi dodávkou železa a jeho využitím v tkáních. Pozoruhodné je, že plazmatická hodnota železa se udržuje v relativně úzkém rozmezí 10-30  $\mu\text{mol/l}$ . Tato relativní stabilita je výsledkem vzájemné interakce mezi klíčovými regulátory hepcidinem, ferroportinem, dále feritinem, transferinem, hephaestinem a dalšími proteiny [65,66].

#### *Vstřebávání železa*

Nehemová forma železa ( $\text{Fe}^{3+}$ ) je v duodenu na apikální membráně enterocytů redukována pomocí ferrireduktázy DCYT-B (duodenal cytochrome B) na  $\text{Fe}^{2+}$  a posléze resorbována do enterocytu pomocí DMT1 (divalent metal transporter 1). Hemové železo (z masa a ryb) se vstřebává lépe než nehemové (30% vs. 10%) a prochází přes apikální membránu enterocytu pomocí HCP-1 (heme carrier protein-1) transportéru [66]. Hem je po

vstřebání do enterocytu katabolizován enzymem hemoxygenázou (HO) a uvolňuje se volné železo. Železo pak prochází k bazolaterální membráně, kde se váže na transmembránový exportér železa feroportin. Po exportu z buňky je železo zpět oxidováno na  $\text{Fe}^{3+}$  pomocí membránové ferroxidázy hephaestinu a zřejmě i ceruloplasminu [45]. V séru se železo váže na apotransferin (transferin bez navázaného železa) za vzniku holotransferinu. Cirkulující plazma obsahuje pouze několik miligramů železa, a z toho téměř všechno je vázáno na transportní protein transferin. Takto je železo dodáváno k cílovým buňkám, kde se vazbou na membránový transferinový receptor 1 (TfR1) za vzniku komplexu železo/transferin/TfR1 spustí endocytóza železa do buňky. V buňkách železo převezmou od transferinu endosomy, ve kterých metaloreduktáza STEAP3 (six-transmembrane epithelial antigen of prostate 3) redukuje  $\text{Fe}^{3+}$  zpět na  $\text{Fe}^{2+}$ , které je z endosomu exportováno do cytosolu pomocí endosomálního DMT1. V buňkách je železo k dispozici pro mnoho výše uvedených metabolických dějů. Nakonec je transferin (již bez železa) uvolněn z komplexu transferin/TfR1 na membráně buňky zpět do plazmy [67].

#### *Skladování, recyklace a sekvestrace železa*

Senescentní erythrocyty jsou fagocytovány makrofágy retikuloendotelového systému, hem je metabolizován hemoxygenázou-1 a železo, pokud není aktuálně potřebné, je uskladněno intracelulárně ve formě feritinu. Hlavní roli při exportu recyklovaného železa zpět do oběhu hraje feroportin na povrchu makrofágů [67].

#### *Volné železo*

Volná forma železa (NTBI, Non Transferin Bound Iron) je potencionálně toxická. Zapojuje se do oxidačních a redukčních reakcí s tvorbou volných radikálů. Fentonova reakce železa s peroxidem vodíku vede k produkci hydroxylových radikálů:  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{OH}^\cdot$  a  $\text{OH-Fe}^{3+}$  s následným oxidativním stresem (poškození lipidových membrán, organel, proteinů

a nukleových kyselin v buňkách). Volné železo bez vazby na transferin se v séru objeví, pokud saturace transferinu překročí 70% a železo se pak akumuluje ve tkáních (srdce, játra, pankreas). Transportní mechanismus, jakým se volné železo dostává ze séra do buněk, není zatím přesně znám. V literatuře se uvádí jako možný přenašeč volného železa transportér zinku ZIP14 (Zrt- and Irt-like protein 14) v hepatocytech a pankreatických buňkách, dále kalciové kanály v buňkách myokardu, které mají stejnou afinitu k  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{2+}$  [63].

#### *Regulace extracelulární koncentrace železa jako obranný mechanismus během infekce*

Siderofilní bakterie například *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* nebo některé kmeny *Yersinia enterocolitica* se vážou na receptory hostitelských feroproteinů a využívají železo pro svůj metabolismus. Hostitel má ale k dispozici obranné mechanismy vrozené imunity, které zajišťují nedostupnost železa pro tyto bakterie. Mezi ně patří obranné systémy na slizničním povrchu, jako je lactoferin, který je secernován epiteliálními buňkami, vycytává železo a zajišťuje jeho sekvestraci na slizničním povrchu. Dále lipocalin-2 (neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), ze skupiny malých proteinů, secernovaný epiteliálními buňkami, aktivovanými neutrofily a makrofágy, který váže a transferuje přes membrány malé hydrofobní látky organických molekul. Jeho primární funkcí je sekvestrovat bakteriální siderofory [65,67].

Během prvních několika hodin od počátku infekce nebo jiného zánětlivého podnětu dochází v organismu k poklesu plazmatické hladiny železa (často až pod 10  $\mu\text{mol/l}$ ). Tato reakce je nazývána „záněťová hypoferremie“. Mechanismem, kterým vznikne tento stav, je cytokiny (zejména interleukinem-6) indukované zvýšení hladiny hepcidinu s následnou bloádou funkce feroportinu. Železo pak není vstřebáváno z trávicího traktu a zůstává také sekvestrováno v makrofázích jater a sleziny [68].

### *Buněčná a systémová regulace metabolismu železa*

Buněčná regulace je udržována pomocí systému IRP 1 a 2 (iron regulatory proteins), což jsou cytosolové RNA-vázající bílkoviny, které regulují metabolismus železa v buňkách. Vážou se na IRE (iron responsive elements), netranslatované úseky (UTR, untranslated region) mRNA, které kódují různé proteiny zasahující do metabolismu železa (transferinové receptory, feritin, DMT-1 nebo feroportin). Podle toho, na kterou cílovou sekvenci mRNA (IRE pozice na 5' nebo 3') se IRP se váží, tak buďto aktivují nebo suprimují syntézu jednotlivých proteinů [53].

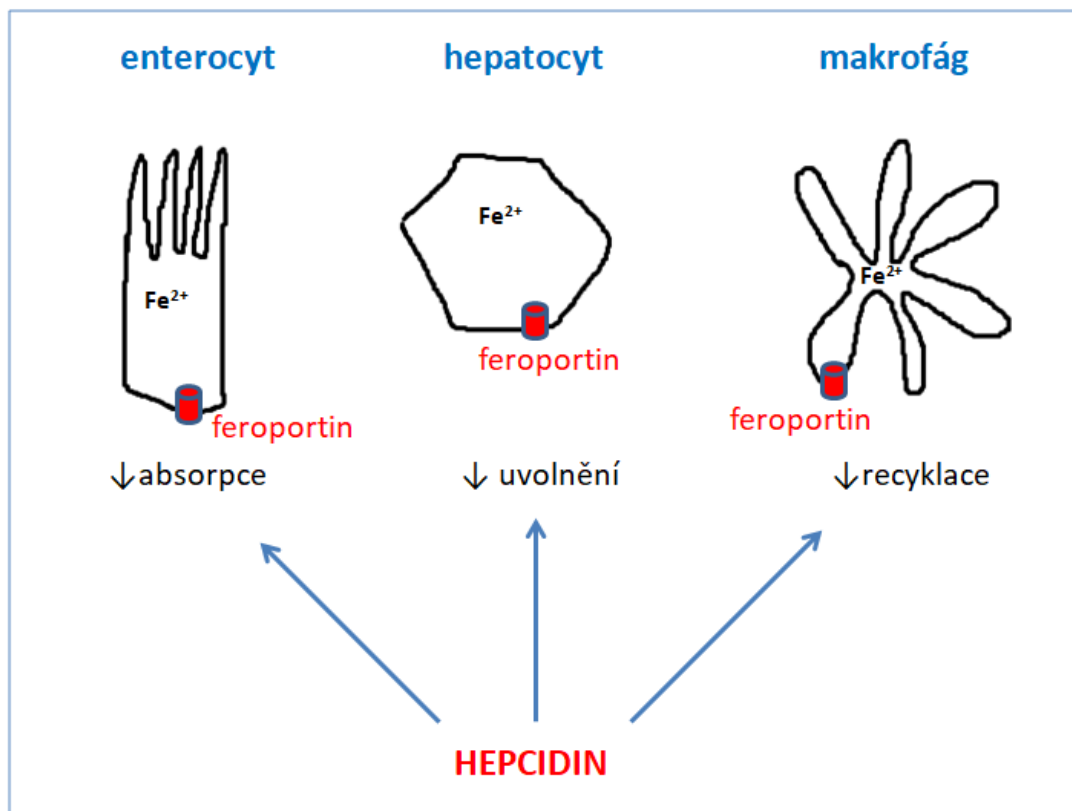
Systémová regulace je zajišťována komplexními ději s ústřední interakcí hepcidinu a feroportinu, viz dále [53].

**Feroportin-1** je jediný dosud známý transmembránový přenašeč (exportér) železa, který je kódován *SLC40A1* genem. Mezi buňky s vysokou expresí tohoto přenašeče patří bazolaterální membrána epiteliálních buněk střevní sliznice (především duodena), makrofágy retikuloendotelového systému a sinusoidální povrch hepatocytů. Feroportin se také vyskytuje na bazální membráně placentárních syncytiotrofoblastů kudy je transportováno železo z oběhu matky do oběhu plodu [66]. Homeostáza železa je udržována pomocí osy hepcidin-feroportin. Po vazbě hepcidinu na feroportin dochází k jeho inaktivaci změnou jeho konfigurace, endocytóze a lysozomální degradaci komplexu hepcidin-feroportin [66].



**Obrázek 8.** Mechanismus transportu železa přes feroportinový transmembránový přenašeč železa z enterocyty, hepatocytu a makrofágu a inhibice tohoto přenašeče hepcidinem.

Upraveno podle [69].



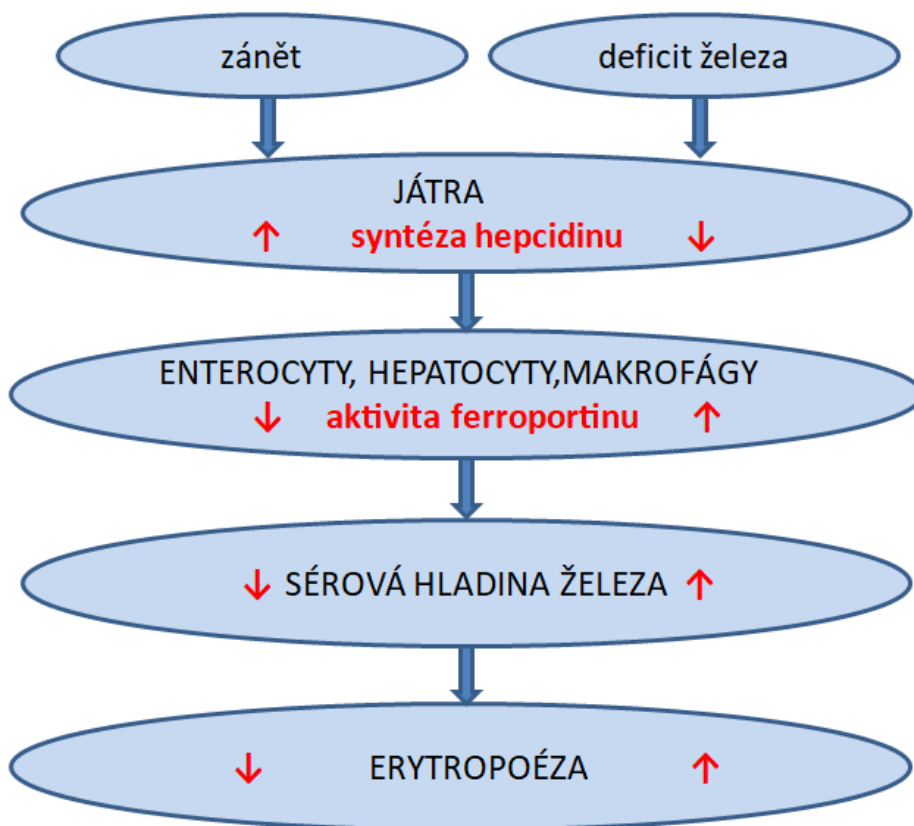
#### 1.4. Hepcidin

Hepcidin je malý peptidický hormon regulující metabolismus železa. Je syntetizován v játrech a odtud také pochází počátek jeho jména „hep-“. Koncovku pak tvoří „-cidin“, protože původně byl objeven jako peptid s baktericidní aktivitou [70]. Hepcidin projevoval antifungální a antibakteriální účinky (proti kandidám, aspergilu, *E.coli* nebo zlatému stafylokoku). Dříve byl proto také nazýván zkratkou HAMP (hepcidin antimicrobial peptide) [68]. Jeho syntézu kóduje *HAMP1* gen lokalizovaný na 19. chromozómu. (*Mutace genu pro hepcidin vede ke vzniku vzácné formy juvenilní hemochromatózy typ 2B*).

Syntéza hepcidinu probíhá v sinusoidálních endotelových buňkách jater, kde vzniká prepropeptid (84 aminokyselin), který se štěpí na prohepcidin (60 aminokyselin) a následně na hepcidin (25 aminokyselin). Hepcidin je vylučován ledvinami. Je centrálním regulátorem metabolismu železa (interakce hepcidinu s feroportinem) a současně se uplatňuje jako marker systémového zánětu [71].

Hepcidin působí na transmembránový přenašeč železa feroportin. Při systémové zánětlivé reakci se zvyšuje syntéza hepcidinu, který se váže na feroportin a inhibuje jeho aktivitu (dochází k internalizaci a degradaci feroportinu) [72]. Tento proces vede k inhibici absorpce železa přes bazolaterální membránu enterocytů do krevního oběhu a inhibici uvolňování železa z hepatocytů a makrofágů. Naproti tomu je syntéza hepcidinu suprimována při stavech vyžadujících zvýšený přísun železa při zvýšené erytropoéze, například při IDA nebo při hypoxii [73]. V tomto případě není feroportin blokován a železo je na bazolaterální membráně enterocytů aktivně resorbováno do krevního oběhu (obrázek 8).

**Obrázek 9.** Zjednodušené schéma syntézy hepcidinu a jeho působení na ferroportin během zánětu a při deficitu železa.



### Regulace syntézy hepcidinu

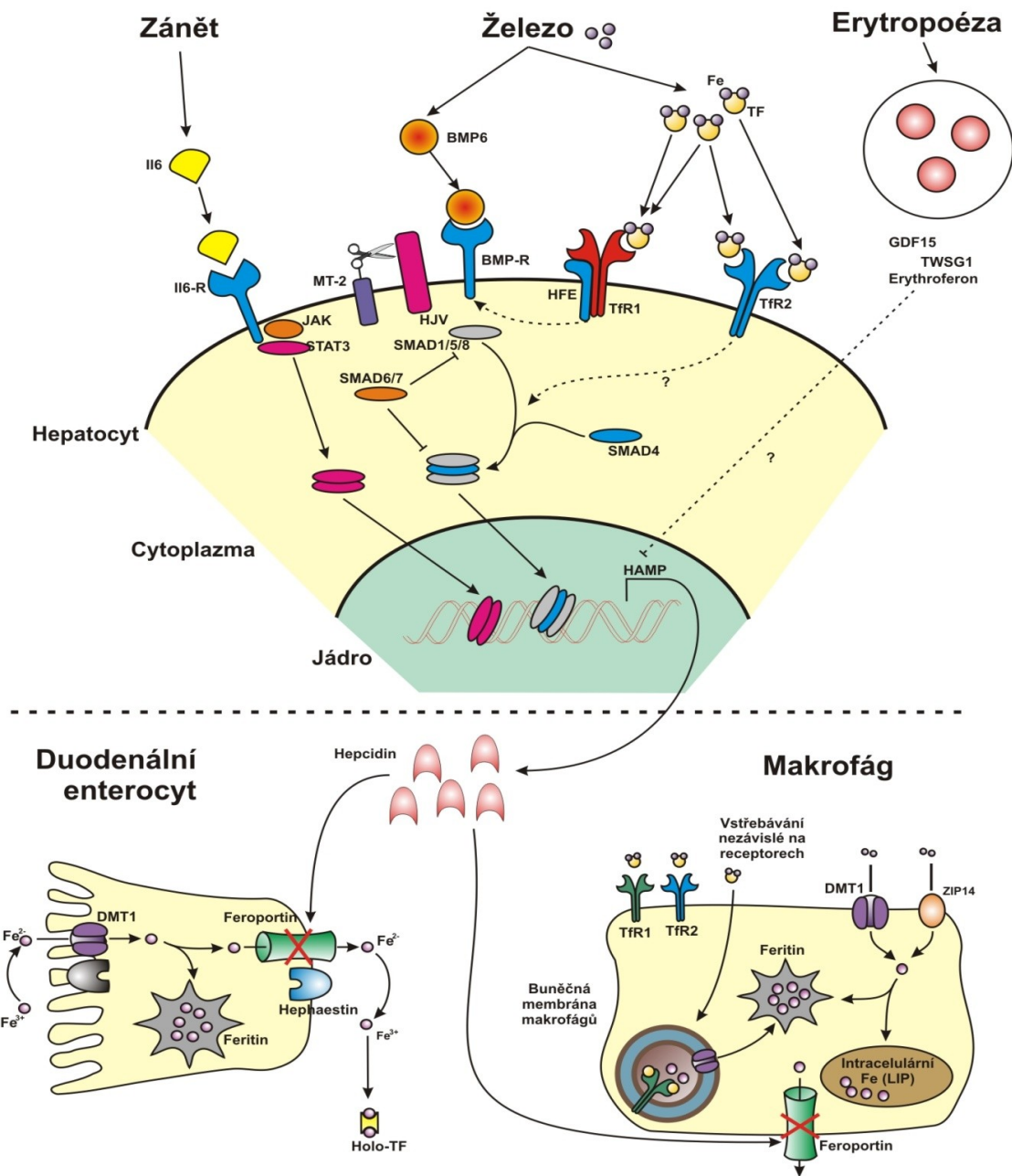
Syntézu a produkci hepcidinu ovlivňují tři základní faktory: 1. především stav celotělových zásob železa (nadbytek, normální stav, nedostatek), 2. systémová zánětlivá aktivita (zejména IL-6 a IL-1 $\beta$ ) a 3. aktivita erytropoézy.

### *Regulace syntézy hepcidinu podle hladiny železa*

Při nadbytku železa v játrech je stimulována parakrinní sekrece BMP-6 (Bone Morphogenic Protein-6), což je cytokin zvyšující expresi genu pro hepcidin (*HAMP1*), produkovány sinusoidálními buňkami jater jako odpověď na zvýšený obsah železa v séru nebo v játrech (obrázek 10). Za těchto podmínek dojde ke zvýšení exprese BMP-6, který se pak váže na BMP-receptor za účasti koreceptoru hemojuvelinu (HJV) a formuje se komplexní

molekula BMP/HJV/SMAD (Small Mother Against Decapentaplegic), která je po fosforylaci translokována do jádra hepatocytu, kde aktivuje transkripci *HAMP1* genu s následným zvýšením exprese hepcidinu. Hladina sérového železa může indukovat expresi hepcidinu také nezávisle na BMP-6 proteinu v případě, že je zvýšená saturace transferinu (i bez zvýšení železa v játrech). V tomto případě kooperuje s komplexem BMP/HJV/SMAD ještě HFE protein (hereditary hemochromatotic protein) - viz obrázek 10. Přesný mechanismus není zatím objasněn [66].

**Obrázek 10.** Schéma regulace syntézy hepcidinu. Upraveno podle [64].



Obrázek ukazuje jednotlivé mechanismy regulace syntézy hepcidinu (exprese HAMP genu) v hepatocytech (horní část obrázku), transport železa přes enterocyt (vlevo dole) a přes membránu makrofágů (vpravo dole).

Il-6 (interleukin 6), Il-6-R (receptor pro interleukin 6), JAK (Janus kinase), STAT 3 (signal transducer and activator of transcription 3), BMP-6 (Bone Morphogenetic Protein-6), BMP-R (BMP receptor), HJV (hemojuvelin), MT-2 (matriptáza-2), HFE protein (hereditary hemochromatotic protein), Fe (železo), TF (transferin), Tfr1 (TF receptor 1), Tfr2 (TF receptor 2), GDF15 (growth differentiation factor 15), TWSG1 (twisted gastrulation), HAMP (hepcidin antimicrobial peptide), SMAD (small mother against decapentaplegic homologue), DMT1 (divalent metal transporter 1), ZIP 14 (transportér zinku), DCytB (duodenal cytochrome B), CP (ceruloplasmin), Fe (LIP) labilní pool železa

Mezi negativní regulátory syntézy hepcidinu patří matriptáza-2 (MT-2, serine protease type II transmembrane protein). Jde o transmembránový protein syntetizovaný a exprimovaný zejména v játrech, který inhibuje expresi hepcidinu prostřednictvím štěpení (proteolýzy) hemojuvelinu (HJV) jako odpověď na deficit železa. Přesné mechanismy vzájemné interakce obou klíčových, protichůdně působících, regulátorů exprese hepcidinu BMP a matriptázy-2 nejsou dosud přesně objasněny [63,74].

#### *Regulace syntézy hepcidinu při zánětu*

Zvýšení exprese hepcidinu při zánětu je zprostředkované interleukinem-6, který po vazbě na svůj receptor zvyšuje aktivitu JAK/STAT3 (Janus kinase / signal transducer and activator of transcription 3) signální cesty, což zvyšuje fosforylaci STAT3, která se pak váže na hepcidinový promotor *HAMP1* (obrázek 10) [63]. Hecpidin se pak váže na feroportin, dochází k blokádě transportu železa přes bazolaterální membránu enterocytů a membránu hepatocytů a makrofágů s následným poklesem hladiny sérového železa. V tomto případě mohou být celotělové zásoby železa normální a přesto je snížena dostupnost železa pro transferin (snížená TSAT). Železo tak není dostupné pro potřeby buněk. Tento stav se nazývá „funkční deficit železa“ nebo také „iron restricted erythropoiesis“ [45].

#### *Regulace syntézy hepcidinu erytropoézou*

Nedávno byl odhalený faktor, tzv. ERFE (erythroferrone), který je uvolňovaný z erytroblastů po krevních ztrátách nebo po aplikaci erytropoetinu. Jde o cytokin, který působí přímo na hepatocyty, kde suprimuje expresi hepcidinu (obrázek 10). Mechanismus není dosud přesně objasněn [63].

## Porucha osy hepcidin-feroportin

V současné době jsou již známá onemocnění, která jsou způsobena poruchami osy hepcidin-feroportin, ať už ve smyslu *minus* (deficit hepcidinu), tak ve smyslu *plus* (nadprodukce hepcidinu). Vedle toho stojí pak genetické poruchy funkce feroportinu.

### *Deficit hepcidinu*

Nejvíce prozkoumaným onemocněním z této skupiny je hereditární hemochromatóza, což je multigenové onemocnění jehož příčinou je defektní exprese hepcidinu v játrech. Mutace různých genů (*HFE*, *TFR2*, *HJV*, *HAMP1*) vede k deficitu příslušných proteinů, které regulují metabolismus železa a vedou také ke snížení hladin hepcidinu, a tím vysoké expresi feroportinu se zvýšenou absorpcí a excesivním uvolňováním železa z makrofágů s následným orgánovým poškozením volným železem (NTBI) [75].

### *Hyperprodukce hepcidinu*

Zvýšená hladina hepcidinu vede k sideropenii a anémii. Příčinou může být například vzácné vrozené autozomálně recesivní onemocnění způsobené mutací genu pro matriptázu-2, které se nazývá IRIDA (iron-refractory iron-deficient anemia) [76]. Další, mnohem častější příčinou zvýšené produkce hepcidinu, je zvýšená systémová zánětlivá aktivita při anémii chronických chorob.

### *Poruchy funkce feroportinu*

Nedávno objevené autozomálně dominantní onemocnění způsobené mutacemi genu pro feroportin se dělí do dvou skupin. Jako *feroportinová nemoc* (*Ferroportin disease*) se označují ty mutace genu pro feroportin, které vedou ke ztrátě funkce feroportinu jako přenašeče železa, tzv. *loss-of-function* mutace. Onemocnění je charakterizováno akumulací železa především v buňkách RES a lehkou anémií. Druhý typ mutací nezpůsobuje ztrátu funkce feroportinu, ale

vede k rezistenci ferroportinu k hepcidinu, tzv. *gain-of-function* mutace. Zde dochází k nekontrolované absorpci železa z trávicího traktu a jeho akumulaci v tkáních. Tento typ se nazývá *FPN-1 asociovaná hemochromatóza* [77].

### Měření hladin hepcidinu

Hladina hepcidinu má cirkadiánní rytmus, takže je vhodné měření ráno na lačno. Normální hladiny se liší podle věku a pohlaví. Výsledná hodnota má být hodnocena v kontextu s klinickým stavem pacienta, proto je doporučeno současné vyšetření CRP, funkce ledvin a jater [53]. Měření hladin hepcidinu je možné jednak imunochemickými metodami (ELISA) nebo metodou hmotnostní spektrometrie. Mezi metody hmotnostní spektrometrie patří SELDI TOF-MS (surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry), MALDI TOF-MS (matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) a LC-MS/MS (liquid chromatography tandem-mass-spectrometry) [78,79,80]. Referenční hodnoty sérových hladin hepcidinu byly sice publikovány u dospělých [80,81] i u dětí [82,83,84], nicméně metody k rutinnímu vyšetření dosud nejsou standardizovány a unifikovány. Publikované normy se liší, někdy až několikanásobně [78]. Navíc část cirkulujícího hepcidinu je navázána na  $\alpha$ 2-makroglobulin, což vyvolává otázku, zda je třeba měřit volný nebo na bílkovinu vázaný hepcidin [78].

ELISA metoda je dostupnější a levnější. Nicméně většina imunotestů hodnotí celkový hepcidin a nerozlišuje úplný (bioaktivní) hepcidin (25 aminokyselin) od menších izoform (hepcidin-20,-22,-24), které vznikají degradací hepcidinu-25. Koncentrace mohou být navíc zvýšeny při selhání ledvin. Kvantifikaci hladiny hepcidinu dále komplikuje fakt, že hepcidin má tendenci agregovat na plast odběrových zkumavek zejména v případě dlouhodobé expozice odebraného vzorku při pokojové teplotě [85]. Dosud není jasné, zda měření ostatních izoform hepcidinu (než hepcidinu-25) má význam při diagnostice poruch metabolismu železa [85].



Měření hepcidinu v moči zhruba koreluje se sérovou hladinou, ale nevýhodou je vysoká koncentrace kratších izoform hepcidinu v moči, široká analytická variační šíře a závislost metody na glomerulární filtraci a tubulární resorpci [86]. Z výše popsaných důvodů nejsou metody měření hepcidinu zatím využitelné v běžné klinické praxi [66].

#### Léčebné možnosti pomoci ovlivnění osy hepcidin-feroportin

Tato potencionální léčiva se dají rozdělit do dvou skupin: agonisty a antagonisty hepcidinu. Jednotlivé molekuly jsou v různé fázi výzkumu (in vitro, animální modely, klinické studie). Terapeutické využití agonistů hepcidinu by mohlo být prospěšné pro pacienty se syndromem z přetížení železem, které vznikne na základě deficitu hepcidinu. Příkladem je hereditární hemochromatóza a  $\beta$ -thalasemie.

V nedávné době byly publikovány práce o vývoji nových molekul, které in vitro vykazují schopnost indukovat internalizaci a degradaci feroportinu-1. Šlo o krátké peptidy s terminálním aminokyselinovým segmentem hepcidinu tzv. minihepcidiny (MHs). Studie na myších modelech ukazují jejich efekt u hepcidin-knockoutovaných myší (animální model hemochromatózy), kde snížily mortalitu. Příznivé výsledky minihepcidinů byly popsány i u „thalasemických“ myší. Dále jsou ve fázi výzkumu molekuly stimulující produkci hepcidinu a inhibitory feroportinu, které mohou v budoucnu přispět k léčbě hemochromatózy,  $\beta$ -thalasemie nebo polycytemie vera [68,86].

Antagonisté hepcidinu naopak mohou být přínosem u stavů se zvýšenou hladinou hepcidinu při léčbě anémie chronických chorob (ACD), u některých nádorových onemocnění a v léčbě vrozené anémie IRIDA. Studovány jsou inhibitory BMP a IL-6, protilátky proti hepcidinu nebo feroportinu. Ve fázi klinické studie je LY2787106, monoklonální protilátka proti hepcidinu. Jedním z faktorů stimulujících syntézu hepcidinu je IL-6. Tocilizumab (humanizovaná monoklonální protilátka proti IL-6 receptoru) byl studován na animálních

modelech a snižoval hladiny hepcidinu [87]. Pokles hladin hepcidinu při léčbě tocilizumabem byl popsán i v klinických studiích například v práci Suzukiho et al u dospělých pacientů s revmatoidní artritidou [88].

## 1.5. Souhrn teoretické části

U pacientů s nespecifickým střevním zánětem je anémie nejčastější extraintestinální komplikací. Vyskytuje se u nich zejména anémie sideropenická, anémie chronických chorob nebo jejich kombinace. Metabolismus železa ovlivňuje zánětlivá aktivita základního onemocnění v kombinaci s krevními ztrátami stolicí. Přičemž u každého pacienta se tyto faktory uplatňují v různé míře. Při zvýšené systémové zánětlivé aktivitě stoupá hladina hepcidinu zejména prostřednictvím interleukinu-6. Hecpidin se váže na ferroportin a blokuje jeho funkci jako přenašeče železa. Tento proces vede k inhibici transportu železa přes bazolaterální membránu enterocytů do krevního oběhu a inhibici uvolňování železa z hepatocytů a makrofágů. V tomto případě mohou být celotělové zásoby železa normální, a přesto železo není dostupné pro metabolismus. Jde o tzv. „funkční deficit železa“. Naproti tomu při zvýšených ztrátách krve (resp. železa) stolicí je syntéza hepcidinu suprimována. V tomto případě není ferroportin blokován a železo se z enterocytů aktivně resorbuje do krevního oběhu a uvolňuje z hepatocytů a makrofágů pro potřeby erythropoézy. Vyšetření hladiny hepcidinu může, vedle ostatních markerů, přispět k rozhodnutí o správné strategii léčby železem (parenterální versus perorální forma). V případě nízké hladiny hepcidinu není ferroportin blokován a lze předpokládat, že se železo bude dobře vstřebávat při podání per os. Naopak při vysoké hladině nebude železo přes ferroportin transportováno, a pak bývá nezbytná parenterální substituce. Dá se předpokládat, že u nově diagnostikovaných případů IBD, bude různý podíl etiopatogenetických mechanismů na vzniku anémie u dětí s CD nebo UC, a že v průběžném sledování během navození remise dojde k signifikantním změnám hladiny hepcidinu.

## **2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **2.1. Hladiny hepcidinu u dětí s nově diagnostikovaným nespecifickým střevním zánětem**

#### **2.1.1. Cíl**

Cílem práce bylo porovnat sérové hladiny hepcidinu u dětských pacientů s Crohnovou chorobou a ulcerózní kolitidou. Do souboru byli zařazeni pouze nově diagnostikovaní pacienti s IBD. Toto základní kritérium jsme zvolili proto, že pacienti nejsou dosud ovlivněni protizánětlivou léčbou a hladiny hepcidinu i ostatních parametrů odráží pouze aktivitu vlastního onemocnění, nikoliv vliv podávané terapie. Na základě znalostí o roli hepcidinu při metabolismu železa během probíhajícího zánětu jsme chtěli zjistit, zda jsou přítomny rozdíly hladin sérového hepcidinu mezi dětskými pacienty s CD versus UC. Předpokládali jsme, že u Crohnovy choroby bude přítomna vyšší systémová zánětlivá aktivita, a proto bude vyšší výskyt anémie chronických chorob. Naopak u UC, kde je dominantním příznakem enterorhagie, by měla být častější ztrátová sideropenická anémie. Dále nás zajímalo, zda budou s hladinou hepcidinu asociovány parametry metabolismu železa a hladina kalprotektinu ve stolici, který odráží tíži postižení střevní sliznice zánětem.

#### **2.1.2. Metody**

Průřezové srovnání bylo provedeno u dětí s nově diagnostikovaným nespecifickým střevním zánětem na dětské klinice FN a LF UP Olomouc v období od ledna 2012 do září 2016. Design a metodika byly schváleny Etickou komisí Fakultní nemocnice Olomouc a Lékařské fakulty UP v Olomouci. Pacienti nebo jejich zákonní zástupci podepsali informovaný souhlas.

U všech pacientů byla diagnóza Crohnovy choroby nebo ulcerózní kolitidy stanovena podle platných doporučení evropské společnosti pro gastroenterologii, hepatologii a výživu (ESPGHAN) [28]. U pacientů byla provedena ezofagogastroduodenoskopie, koloskopie

s terminální ileoskopií a zobrazení tenkého střeva magnetickou rezonanční enterografií nebo výjimečně rentgen kontrastním vyšetřením. Index aktivity onemocnění PCDAI (Paediatric Crohn's Disease Activity Index) byl použit u dětí s CD [30]. U pacientů s UC byla aktivita hodnocena pomocí PUCAI indexu (Paediatric Ulcerative Colitis Activity Index) [31]. U dětí byly měřeny antropometrické ukazatele: hmotnost, výška a body mass index. Diagnóza anémie byla stanovena podle platných norem v dětském věku [43,89]. Kontrolní skupinu tvořily děti hospitalizované na dětské klinice k provedení malých chirurgických zákroků, bez probíhajícího zánětlivého onemocnění, s normální hladinou hemoglobinu.

U všech pacientů jsme před zahájením léčby IBD provedli odběry krve ke zjištění hladin hepcidinu, kompletního krevního obrazu, C-reaktivního proteinu (CRP), sérového železa, solubilních transferinových receptorů (sTfR) a kalprotektinu ve stolici. Krevní obraz byl hodnocen automatickým analyzátozem, CRP imunturbidimetrickou metodou (CRPL3; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), stejně tak parametr sTfR (STFR; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Hladiny feritinu se měřily chemiluminiscenčním imunotestem (ARCHITECT Ferritin Reagent Kit; Abbott Laboratories, Diagnostics Division, Chicago, IL, USA). Index TfR/log feritin byl vypočítán [90]. Hladina sérového železa byla hodnocena pomocí absorpční spektrofotometrie (IRON2; Roche Diagnostics GmbH). Kvantitativní stanovení kalprotektinu ve stolici bylo provedeno pomocí LFIA (lateral flow immunoassay, Quantum Blue Calprotectin; Bühlmann Laboratories AG, Schönenbuch, Switzerland). Vzorky séra ke stanovení hladin hepcidinu byly po odběru zmrazeny na minus 80°C. Vlastní měření probíhalo metodou reverzní kapalinové chromatografie (UltiMate 3000 Nano LC System (Thermo Fischer Scientific, Sunnyvale, CA, USA) spřažené s hmotnostní spektrometrií (QTRAP 5500 mass spectrometer, AB SCIEX, Framingham, MA, USA) podle pokynů výrobce.

*Statistické hodnocení:* Měřené parametry byly vyjádřeny jako průměr ± směrodatná odchylka, nebo v případě nenormální distribuce hodnot jako medián s interkvartilovým intervalem. Veličiny s nenormálním rozdělením byly před statistickou analýzou logaritmicky transformovány. Rozdíly mezi jednotlivými skupinami byly analyzovány pomocí Mann-Whitneyho U-testu. Pro testování univariačních korelací byl použit Spearmanův korelační koeficient ( $\rho$ ). Multivariační lineární regresní analýza sloužila k testování nezávislé asociace mezi proměnnými. Jako statisticky významná byla hodnocena hodnota  $p < 0,05$ .

### **2.1.3. Výsledky**

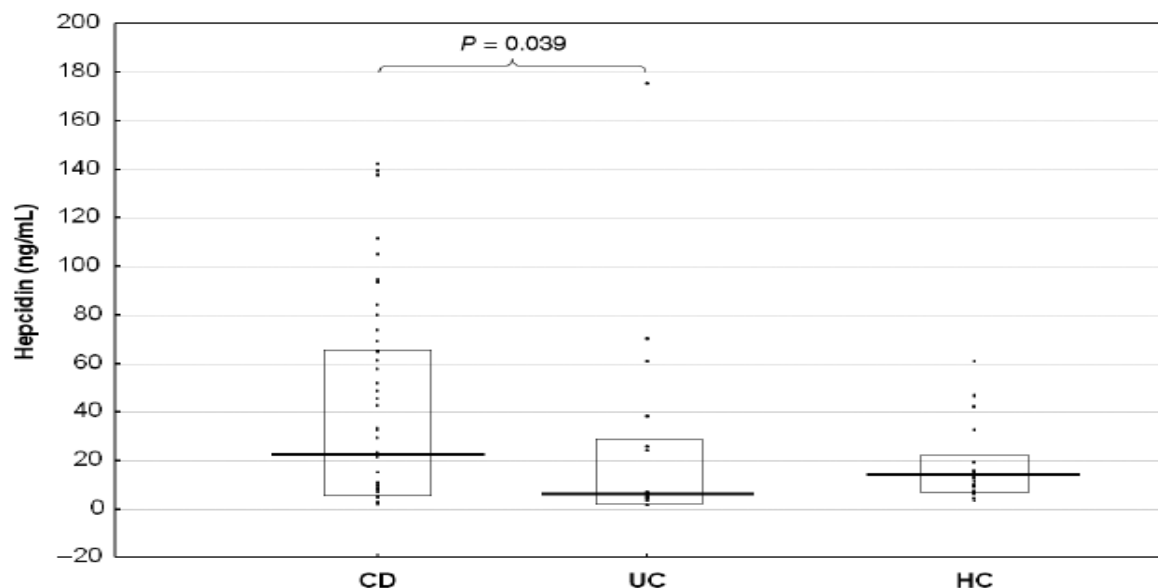
Soubor pacientů s IBD ( $n=76$ ) zahrnoval 53 dětí s CD (32 chlapců a 21 děvčat, věk =  $13,7 \pm 2,9$  let) a 23 s UC (11 chlapců a 12 dívek, věk =  $11,8 \pm 4,7$  let). Zdravých kontrol bylo dvacet (11 chlapců a 9 děvčat, věk =  $12,1 \pm 3,4$  let). Tabulka 8 ukazuje základní charakteristiku všech pacientů s IBD a srovnání parametrů po rozdělení podle diagnózy (CD versus UC). Děti s CD měli signifikantně vyšší hladinu trombocytů, CRP, feritinu a nižší střední objem erytrocytů (MCV) ve srovnání s dětmi s UC. Mezi dětmi s CD a UC nebyl zjištěn signifikantní rozdíl ve věku, hmotnosti, výšce, body mass indexu, hladině hemoglobinu, železa, sTfR, indexem sTfR/log feritin a kalprotektinu ve stolici. Pacienti s CD měli signifikantně vyšší hladiny hepcidinu ve srovnání s dětmi s UC: 22,6 (8,5–65,0) ng/mL versus 6,5 (2,4–25,8) ng/mL. Při srovnání hladin hepcidinu mezi skupinou IBD pacientů a zdravých kontrol nebyl statistický rozdíl (obrázek 11).

**Tabulka 8.** Klinické a laboratorní parametry u dětí s nespecifickým střevním zánětem (IBD) v době diagnózy. Převezato z [91].

	All IBD patients (n = 76, boys = 43, girls = 33), median (1st–3rd quartile)	CD patients (n = 53, boys = 32, girls = 21), median (1st–3rd quartile)	UC patients (n = 23, boys = 11, girls = 12), median (1st–3rd quartile)
Haemoglobin, g/L	114.0 (103.0–128.5)	112.0 (104.0–122.5)	115.0 (95.5–138.0)
MCV, fL	74.6 (69.2–79.6)	72.3 (68.7–78.0)*†	78.2 (72.4–82.9)†
Thrombocytes, $\times 10^9/L$	406.5 (313.1–498.3)	424.0 (342.5–502.4)*†	336.1 (268.0–446.1)†
CRP, mg/L	20.1 (2.5–43.9)	28.2 (8.7–62.9)**†	1.9 (0.7–8.7)†
Iron, $\mu\text{mol/L}$	5.0 (3.4–10.0)	4.8 (3.3–7.2)	6.9 (3.6–12.7)
Ferritin, $\mu\text{g/L}$	26.5 (12.1–50.8)	31.1 (18.9–102.0)**†	11.0 (6.1–21.8)†
sTfR, mg/L	4.4 (3.2–6.1)	4.4 (3.2–6.1)	4.4 (3.2–6.2)
sTfR/log(ferritin)	3.4 (2.2–4.7)	3.1 (2.1–4.4)	4.0 (2.4–8.5)
Faecal calprotectin, $\mu\text{g/g}$	2020 (1347–5560)	2025 (1442–6180)	1720 (1095–5190)
PCDAI	—	36.3 (28.8–45.0)	—
PUCAI	—	—	30.0 (20.0–45.0)
Hepcidin, ng/mL	14.4 (5.4–61.1)	22.6 (8.5–65.0)*†	6.5 (2.4–25.8)†

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ . †Significant differences between Crohn's disease (CD) versus ulcerative colitis (UC): Differences in variables were analysed using the Mann–Whitney *U*-test. CRP, C-reactive protein; MCV, mean corpuscular volume; PCDAI, Paediatric Crohn's Disease Activity Index; PUCAI, Paediatric Ulcerative Colitis Activity Index; sTfR, soluble transferrin receptors.

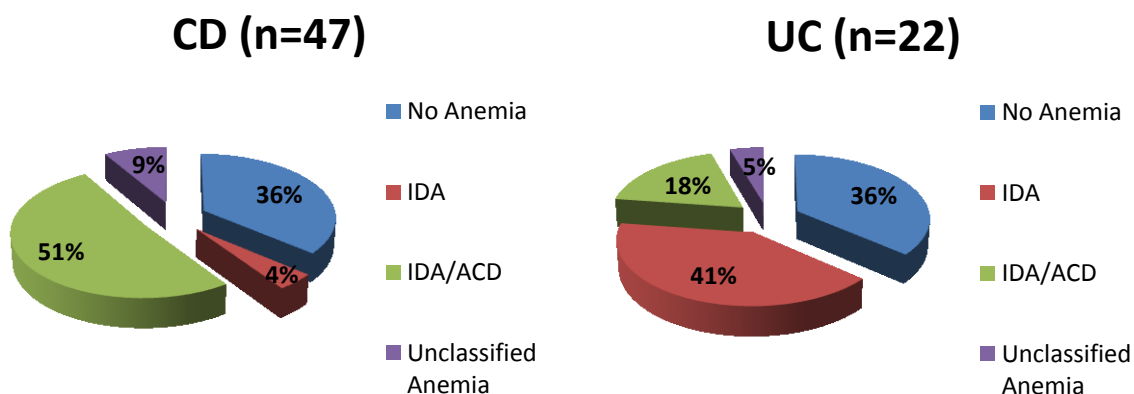
**Obrázek 11.** Hladiny hepcidinu u dětí s Crohnovou chorobou (CD), ulcerózní kolitidou (UC) a zdravých kontrol (HC). Převezato z [91].



**Fig. 1** Hepcidin levels in children with Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) and healthy controls (HC). (—), Median; (.....), individual values, (□), 25–75%.

Výskyt anémie byl zjištěn u 69 IBD pacientů (u šesti dětí nebylo možné parametry anémie spolehlivě hodnotit pro nekompletní data). Anémii mělo u obou typů onemocnění stejný počet pacientů (64%), kteří byli dále rozděleni podle typu anémie na čistou sideropenickou anémii (IDA), anémii chronických chorob (ACD), kombinovanou anémii (IDA/ACD) a neklasifikovatelnou anémii [49]. Výskyt jednotlivých typů anémie u CD i UC ukazuje obrázek 12. V CD skupině převažovala kombinace IDA/ACD - 80%, následovaná IDA - 7% a neklasifikovatelnou anémií - 13%. V UC skupině byla pak nejčastější čistá IDA - 64%, dále kombinace IDA/ACD - 29% a neklasifikovatelná anémie - 7%.

**Obrázek 12.** Výskyt jednotlivých typů anémie u pacientů s Crohnovou chorobou a ulcerózní kolitidou. Převzato z [91].



CD = Crohn's disease, Crohnova choroba, UC = ulcerative colitis, ulcerózní kolitida, IDA = iron deficiency anaemia, ACD = anaemia of chronic disease

U všech IBD pacientů hladina hepcidinu pozitivně korelovala s hladinou trombocytů, CRP a negativně s indexem TfR/log feritin (tabulka 9). V CD skupině byla zjištěna statisticky významná pozitivní korelace hepcidinu s hladinou trombocytů, CRP, feritinem, PCDAI a negativní s indexem TfR/log feritin. U pacientů s UC hepcidin pozitivně koreloval pouze s hemoglobinem a feritinem a negativně s kalprotektinem ve stolici. V této skupině koreloval



kalprotektin pozitivně s PUCAI indexem ( $\rho=0.65$ ), ale ne s CRP, feritinem ani trombocyty. U pacientů s CD korelace mezi hepcidinem a kalprotektinem nalezena nebyla. U těchto dětí kalprotektin pozitivně koreloval s CRP ( $\rho=0.51$ ) a trombocyty ( $\rho=0.42$ ) a negativně s hemoglobinem ( $\rho= -0.56$ ) a sérovým železem ( $\rho= -0.47$ ).

**Tabulka 9.** Univariační korelační analýza mezi hepcidinem a klinickými a laboratorními parametry u dětí s nespecifickým střevním zánětem v době diagnózy. Převzato z [91].

	All IBD patients, $\rho$ , $P$ value	CD patients, $\rho$ , $P$ value	UC patients, $\rho$ , $P$ value
Haemoglobin	0.01, NS	-0.14, NS	0.55, 0.023*
MCV	-0.03, NS	-0.08, NS	0.46, NS
Thrombocytes	0.37, 0.002*	0.38, 0.006*	-0.09, NS
CRP	0.45, <0.001*	0.44, 0.002*	0.12, NS
Iron	-0.11, NS	-0.25, NS	0.51, NS
Ferritin	0.63, <0.001*	0.54, <0.001*	0.69, 0.004*
sTfR	-0.22, NS	-0.10, NS	-0.49, NS
sTfR/log(ferritin)	-0.49, <0.001*	-0.43, 0.005*	-0.49, NS
Faecal calprotectin	0.05, NS	0.31, NS	-0.51, 0.046*
PCDAI	—	0.33, 0.020*	—
PUCAI	—	—	-0.40, NS

\* $P < 0.05$ . CD, Crohn's disease; CRP, C-reactive protein; MCV, mean corpuscular volume of red blood cells; NS, non-significant; PCDAI, Paediatric Crohn's Disease Activity Index; PUCAI, Paediatric Ulcerative Colitis Activity Index; sTfR, soluble transferrin receptors; UC, ulcerative colitis;  $\rho$ , Spearman correlation coefficient.

V tabulce 10 jsou uvedeny výsledky multivariační regresní analýzy, kdy byl zjišťován vztah mezi hladinou hepcidinu jako závislou veličinou a korelujícími parametry jako nezávislými prediktory. Ve skupině všech pacientů s IBD byl hepcidin nezávisle asociován

pouze s feritinem. V CD skupině pak navíc s trombocyty. V UC skupině pak byla zjištěna asociace s feritinem a kalprotektinem ve stolici.

**Tabulka 10.** Multivariační regresní analýza vztahu mezi sérovým hepcidinem jako závislou veličinou a korelujícími parametry jako nezávislými prediktory. Převzato z [91].

	All IBD patients, $\beta$ , <i>P</i> value	CD patients, $\beta$ , <i>P</i> value	UC patients, $\beta$ , <i>P</i> value
Thrombocytes	0.337, NS	0.430, 0.020*	0.193, NS
CRP	0.063, NS	0.219, NS	0.050, NS
Ferritin	0.452, 0.032*	0.372, 0.041*	2.075, 0.030*
sTfR/log(ferritin)	-0.206, NS	-0.142, NS	0.997, NS
Faecal calprotectin	0.290, NS	0.260, NS	-2.839, 0.035*
PCDAI	—	0.076, NS	—
PUCAI	—	—	0.700, NS

\**P* < 0.05 were statistically significant. CD, Crohn's disease; CRP, C-reactive protein; IBD, inflammatory bowel disease; NS, non-significant; PCDAI, Paediatric Crohn's Disease Activity Index; PUCAI, Paediatric Ulcerative Colitis Activity Index; sTfR, soluble transferrin receptors; UC, ulcerative colitis.

#### 2.1.4. Diskuze

V našem souboru byly zjištěny signifikantně vyšší hladiny hepcidinu u nově diagnostikovaných pacientů s CD ve srovnání s UC pacienty. Navíc byla u CD pacientů zjištěna signifikantní asociace mezi hladinami sérového hepcidinu a markery systémové zánětlivé reakce, zatímco nižší hladiny hepcidinu u pacientů s UC byly ve vztahu s deficitem železa.

Tato data jsou ve shodě s některými předchozími studiemi. U dospělých zjistil Oustamanolakis et al. signifikantně vyšší hladiny sérového hepcidinu a prohepcidinu u pacientů s CD a UC ve srovnání se zdravými kontrolami [92]. Hepcidin u dospělých pacientů byl také studován v práci Mecklenburga et al., kde všichni pacienti se sníženou hladinou feritinu ( $<30 \mu\text{g/l}$ ) měli signifikantně nižší hladiny hepcidinu než zdravé kontroly s normální hladinou feritinu ( $>30 \mu\text{g/l}$ ). V multivariačním regresním analytickém modelu signifikantně korelovaly hladiny feritinu a hepcidinu, ale autoři neprováděli analýzu CD a UC odděleně [93].

Hepcidin byl také studován u dětí. Ve studii Semrina et al byly testovány hladiny hepcidinu v moči u dětských CD pacientů. Pacienti s aktivním onemocněním ve srovnání s pacienty v remisi měli zhoršenou absorpci železa a zvýšený interleukin-6 (IL-6). Hladiny hepcidinu v moči u nich pozitivně korelovaly s CRP a IL-6 [94]. V nedávné práci Martinelliho et al byly také nalezeny signifikantně vyšší hladiny sérového hepcidinu u dětí s aktivním IBD onemocněním ve srovnání se zdravými kontrolami i pacienty s diagnózou celiakie. PUCAI a PCDAI  $\geq 30$  byly jediné proměnné, které byly nezávisle asociovány s hladinou sérového hepcidinu. Hepcidin pozitivně koreloval s feritinem a CRP a negativně s výsledky zátěžového testu s železem [95]. V předchozí studii z našeho pracoviště byla měřena hladina hepcidinu u 56 dětských IBD pacientů. Anémie byla zjištěna u 47,7 % z nich. Medián hladiny hepcidinu byl u těchto pacientů v mezích normy 42,0 ng/ml (norma udávaná výrobcem ELISA kitu je 13,3 - 54,4 ng/ml) a nebyl rozdíl mezi pacienty s IBD a zdravými kontrolami. U 55% dívek a 18% chlapců v různé fázi nemoci byly zjištěny zvýšené sérové hladiny hepcidinu a nalezena byla signifikantní pozitivní korelace mezi hepcidinem a CRP ( $r=0,30$ ,  $p<0,041$ ). V této studii byly měřeny parametry vč. sérové hladiny hepcidinu u IBD dětí v různé fázi vývoje onemocnění s variabilní protizánětlivou terapií [96].

Pozitivní korelace mezi sérovou hladinou hepcidinu a IL-6 u IBD pacientů byla zjištěna ve studii Basseriho et al [97]. V naší práci jsme hladiny IL-6 netestovali. Nalezli jsme nicméně asociaci mezi hepcidinem a hladinou trombocytů, která by mohla být odrazem zvýšené produkce IL-6, který byl popsán jako mediátor vzniku trombocytózy [98]. Zvýšená hladina trombocytů pravděpodobně odráží interleukinem-6 mediovanou syntézu hepcidinu [99].

Několik studií u dospělých pacientů nezjistilo signifikantní rozdíl hladin hepcidinu mezi pacienty s CD a UC. Nicméně ve všech studiích byli testováni pacienti v různých fázích onemocnění s rozdílnou protizánětlivou léčbou [73,92,100,101]. U dětí s CD versus UC zjistil Martinelli pouze nesignifikantní rozdíl v hladinách sérového hepcidinu, nicméně i zde byla podstatná část pacientů již léčena (steroidy – 20 %, mesalazin – 62%, azathioprin – 22%, methotrexát – 2%, biologická léčba – 4%) a aktivita onemocnění vyšetřovaných dětí byla relativně nízká (PCDAI = 11,4 ± 14,4, PUCAI = 13,8 ± 16,4) [95]. Nedávná práce polských autorů také zjistila pouze statisticky nevýznamný rozdíl sérových hladin hepcidinu mezi dětskými pacienty s CD versus UC. Hepcidin byl signifikantně nižší pouze u IBD pacientů s deficitem železa a koreloval pouze s feritinem. Výsledky zřejmě ovlivnil i fakt, že 39,1% UC pacientů a 10,3% CD pacientů bylo v remisi onemocnění [71]. Po podání protizánětlivé léčby dochází s poklesem parametrů zánětu také ke zlepšení nebo úpravě anémie se zánětem asociované (ACD) [43]. Například biologická léčba infliximabem signifikantně snížila hladiny hepcidinu u pacientů s revmatoidní artritidou [102] a u IBD pacientů zlepšila anémii [103]. A nedávno byla publikována pediatrická studie, která prokázala pokles hladin hepcidinu u dětských pacientů s CD po podání biologické léčby (anti-TNF- $\alpha$ ) (27,9 [16,2 - 52,9] vs 23,2 [11,1 - 37,7] ng/ml,  $p=0.01$ ). [104].

Jak už bylo zmíněno výše, do naší studie byli zařazeni pouze pacienti dosud neléčení, se středně zvýšenou aktivitou CD (PCDAI = 36,3 (28,8 - 45,0)) a mírně zvýšenou UC

(PUCAI = 30,0 (20,0 – 45,0)). Tento faktor by se rovněž mohl podílet na rozdílu hladin hepcidinu mezi oběma skupinami. Signifikantně nižší hladiny hepcidinu v UC skupině společně se signifikantně nižší hladinou feritinu odráží také vyšší výskyt IDA u pacientů s UC. Nezávislá negativní asociace mezi hepcidinem a kalprotektinem ve stolici může ukazovat na vztah mezi rozsahem zánětem postižené sliznice tračníku, kde čím větší rozsah postižení je, tím větší jsou krevní ztráty se vznikem ztrátové sideropenické anémie, a tomu pak odpovídá snížená hladina hepcidinu. Tyto nálezy dále podporuje i korelace mezi hladinou kalprotektinu ve stolici a aktivitou UC (PUCAI skóre). U některých našich pacientů jsme zjistili velmi nízké hladiny hepcidinu při normální nebo zvýšené hladině feritinu a CRP. U nich zřejmě vliv deficitu železa převážil nad signály zánětlivé aktivity. Tento fenomén, kdy signály na podkladě deficitu železa snižující expresi hepcidinu jsou silnější, než zánětlivé signály zvyšující expresi je zmiňován také v literatuře [67].

Rozlišení mezi IDA a ACD u IBD pacientů může být někdy obtížné. Ke správné diagnóze může přispět zhodnocení indexu sTfR/log feritin. Oustamanolakis uvádí, že index  $>1,4$  má pro diagnózu IDA u IBD pacientů 91% senzitivitu a 92% specificitu [105]. Většina našich IBD pacientů (78%) měla sTfR/log ferritin index  $>1,4$  a nebyl zjištěn rozdíl mezi CD a UC skupinou. Přesto se výskyt IDA a ACD v obou skupinách lišil (obrázek 2). Index sTfR/log feritin samostatně k rozlišení čisté IDA od kombinace IDA/ACD nepostačuje [49]. Diagnostiku by mohly upřesnit sérové hladiny hepcidinu. Výsledky pak mohou napomoci ke správně zvolené léčbě anémie: perorální nebo intravenózní aplikace železa. Nízké nebo až nedetekovatelné hladiny hepcidinu ukazují, že perorální léčba železem by měla být efektivní [53]. Naopak vyšší hladiny hepcidinu by mohly predikovat sníženou resorpci železa při perorální léčbě způsobenou hepcidinem mediovanou blokádu resorpce železa přes bazolaterální membránu enterocytů [62]. Pacienti s vysokou hladinou hepcidinu mohou

vyžadovat parenterální aplikaci železa. Zimmermann et al. našli hepcidin jako možný prediktivní marker resorpce různých preparátů perorálního železa [106].

Mezi limitace naší práce patří její průřezový charakter, který poukazuje pouze na signifikantní asociaci nikoliv kauzalitu mezi hepcidinem a ostatními měřenými parametry. Soubor pacientů byl relativně malý, ale porovnatelný s ostatními pediatrickými studiemi [71,94,95]. Naopak oproti ostatním studiím jsme testovali nově diagnostikované pacienty a výsledky proto nebyly ovlivněny protizánětlivou léčbou.

### **2.1.5. Závěr**

V této části jsme zjistili signifikantní rozdíly hladin hepcidinu, feritinu, CRP a trombocytů mezi skupinou dětí s CD oproti UC u pacientů s nově diagnostikovaným IBD. Domníváme se, že typ IBD a rozsah postižení střeva může ovlivnit sérovou hladinu hepcidinu podle toho, zda převažuje deficit železa nebo systémová zánětlivá aktivita. Zajímavé bylo, že u některých našich pacientů jsme zjistili velmi nízké hladiny hepcidinu při normální nebo zvýšené hladině feritinu a CRP. U nich zřejmě vliv deficitu železa převážil nad signály zánětlivé aktivity. Tato hierarchie není dosud přesně známa a budou nutné další studie, které by vliv a význam obou faktorů pomohly objasnit.

Pokud by se v budoucnosti podařilo unifikovat vyšetřovací metody sérových hladin hepcidinu, mohlo by to přispět k upřesnění typu anémie také v případě chronických zánětlivých onemocnění jakým je například nespecifický střevní zánět. Výsledek by pak mohl pomoci k rozhodnutí o správné léčbě anémie.

## **2.2. Změny sérových hladin hepcidinu v průběhu onemocnění, jejich vztah k vybraným parametrům metabolismu železa a ukazatelům zánětu**

### **2.2.1. Cíl**

Cílem práce bylo zhodnotit dynamiku sérových hladin hepcidinu, parametrů metabolismu železa, zánětu a kalprotektinu ve stolici během sledování nemocných dětí s IBD a zjistit eventuelní efekt podávané protizánětlivé léčby.

### **2.2.2. Metody**

Do prospektivní fáze jsme zařadili nově diagnostikované dětské pacienty, u kterých byl IBD zjištěn v období od ledna 2012 do září 2016 na dětské klinice FN a LF UP Olomouc. Pacienti nebo jejich zákonní zástupci podepsali informovaný souhlas se zařazením do sledování. U všech pacientů byl nespecifický střevní zánět diagnostikován podle platných doporučení evropské společnosti pro gastroenterologii hepatologii a výživu (ESPGHAN) [28]. Před zahájením indukční léčby (baseline) byly pacientům odebrány vzorky krve a stolice a vyhodnoceny sérové hladiny hepcidinu, hemoglobinu, trombocytů, sedimentace erytrocytů (FW), C-reaktivního proteinu (CRP), interleukinu-6 (IL-6), feritinu, sérového železa, solubilních transferinových receptorů (sTfR) a kalprotektinu ve stolici. Hodnoceny byly antropometrické ukazatele (hmotnost, výška, body mass index) a index aktivity onemocnění. PCDAI (Paediatric Crohn's Disease Activity Index) byl použit u dětí s CD [30]. U pacientů s UC byla aktivita měřena pomocí PUCAI indexu (Paediatric Ulcerative Colitis Activity Index) [31]. Následně byla zahájena indukční a poté udržovací terapie. Pacienti byli dále sledováni a v období od března do června 2018 (v průměru za 39 měsíců od stanovení diagnózy, minimálně 20 měsíců, maximálně 75 měsíců) u nich byly vyšetřeny stejné parametry a srovnávány s původními.

Krevní obraz byl hodnocen automatickým analyzátozem, CRP a sTfR imunoturbidimetrickou metodou (CRPL3 a STFR; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Hladiny feritinu se měřily chemiluminiscenčním imunotestem (ARCHITECT Ferritin Reagent Kit; Abbott Laboratories, Diagnostics Division, Chicago, IL, USA). Index TfR/log feritin byl vypočítán [90]. Hladina sérového železa byla hodnocena pomocí absorpční spektrofotometrie (IRON2; Roche Diagnostics GmbH). Kvantitativní stanovení kalprotektinu ve stolici bylo provedeno pomocí LFIA (lateral flow immunoassay, Quantum Blue Calprotectin; Bühlmann Laboratories AG, Schönenbuch, Switzerland). Vzorky séra ke stanovení hladin hepcidinu byly po odběru zmrazeny na minus 80°C. Vlastní měření probíhalo metodou reverzní kapalinové chromatografie (UltiMate 3000 Nano LC System (Thermo Fischer Scientific, Sunnyvale, CA, USA) spřažené s hmotnostní spektrometrií (QTRAP 5500 mass spectrometer, AB SCIEX, Framingham, MA, USA) podle pokynů výrobce. Diagnóza anémie byla stanovena na základě zjištění subnormálních hladin hemoglobinu u dětí podle věku a pohlaví [89].

PCDAI u dětí s CD se vypočítává z ukazatelů klinických (bolest břicha, denní aktivita, počet stolic za den), laboratorních (hematokrit, sedimentace erytrocytů, sérový albumin), antropometrických dat (hmotnost, růstová rychlost), fyzikálního nálezu na břicho, perianální oblasti a event. přítomnosti extraintestinální manifestace onemocnění [30]. Skóre má rozmezí od 0 do 100 bodů. Hodnoty pod 10 bodů jsou kompatibilní s remisí CD, rozmezí od 11 do 30 bodů ukazuje na lehkou aktivitu a nad 30 bodů je nemoc hodnocena jako středně těžká až těžká. Hodnocení PUCAI indexu u pacientů s UC vychází z klinických dat (bolesti břicha, přítomnost krve ve stolici, konzistence stolice, počet stolic za den, přítomnost nočních stolic a aktivita+ pacienta) [31]. PUCAI skóre má rozpětí od 0 do 85 bodů. Hodnota pod 10 bodů ukazuje na remisi UC, rozmezí od 10 do 34 bodů na mírnou aktivitu, 35-64 bodů na aktivitu střední a hodnoty 65-85 bodů na aktivitu vysokou.



*Statistické hodnocení:* Měřené parametry byly vyjádřeny jako průměr ± směrodatná odchylka, nebo v případě veličin s nenormální distribucí hodnot (dle Shapiro-Wilkova testu) jako medián s interkvartilovým intervalem. Rozdíly mezi jednotlivými parametry během sledování byly analyzovány pomocí párového Wilcoxonova U-testu, kategorická data pomocí Fischerova exaktního testu. Pro testování univariačních korelací byl použit Spearmanův korelační koeficient ( $\rho$ ). Veličiny v jednotlivých skupinách byly srovnávány pomocí Mann-Whitneyova U-testu. Jako statisticky významná byla hodnocena hodnota  $p < 0,05$ .

### 2.2.3. Výsledky

Soubor pacientů s IBD ( $n=43$ ) zahrnoval 30 dětí s CD (21 chlapců a 9 děvčat) a 13 s UC (8 chlapců a 5 dívek). Tabulka 11 ukazuje základní demografické a antropometrické parametry v době diagnózy (baseline) a na konci sledování (follow-up) u všech pacientů s IBD a zvláště pro nemocné s CD, resp. UC. V tabulce 12 je uveden rozsah postižení trávicího traktu podle Pařížské klasifikace v době diagnózy a spektrum dlouhodobé udržovací protizánětlivé léčby v jednotlivých skupinách.

**Tabulka 11.** Demografické a klinické parametry u dětí s nespecifickým střevním zánětem v době diagnózy (baseline) a na konci sledování (follow-up).

		všichni IBD pacienti ( $n=43$ , chlapci=29, dívkky=14)	CD pacienti ( $n=30$ , chlapci=21, dívkky=9)	UC pacienti ( $n=13$ , chlapci=8, dívkky=5)
věk (roky)	baseline	12,5 (10,5-14,5)	13,0 (11,0-14,5)	12,0 (10,0-13,0)
	follow-up	16,0 (13,0-17,0)***	17,0 (14,0-18,0)***	15,0 (13,0-17,0)*
hmotnost (kg)	baseline	40,9±14,3	40,7±14,8	41,3±13,6
	follow-up	60,2±18,0***	62,2±19,0***	55,6±15,2**
výška (cm)	baseline	157 (137-164)	155 (137-166)	158 (140-164)
	follow-up	169 (157-167)***	172 (157-177)***	164 (160-174)*
BMI ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	baseline	16,9±2,6	16,7±2,9	17,5±2,0
	follow-up	21,2±4,0***	21,5±4,3***	20,5±3,1**

IBD = inflammatory bowel disease, nespecifický střevní zánět, CD = Crohn's disease, Crohnova choroba, UC = ulcerative colitis, ulcerózní kolitida, BMI = body mass index hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil) – u veličin s nenormální distribucí hodnot, nebo jako průměr ± směrodatná odchylka – u veličin s normální distribucí hodnot

\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ , tzn. statisticky významný rozdíl mezi baseline a follow-up hodnotou podle párového Wilcoxonova U-testu

**Tabulka 12.** Rozsah postižení trávicího traktu podle Pařížské klasifikace [107] v době diagnózy a spektrum dlouhodobé udržovací protizánětlivé léčby v jednotlivých skupinách.

	IBD (n=43)	CD (n=30)	UC (n=13)
<b>Lokalizace onemocnění v době diagnózy (Pařížská klasifikace)</b>			
L1	-	9 (30,0%)	-
L2	-	2 (6,7%)	-
L3	-	8 (26,6%)	-
L <sub>4a</sub> +L <sub>4b</sub>	-	11 (36,7%)	-
E1	-	-	1 (7,6%)
E2	-	-	2 (15,4%)
E3	-	-	0 (0%)
E4	-	-	10 (77%)
<b>Udržovací protizánětlivá léčba</b>			
infiximab	4 (9,3%)	3 (10%)	1 (7,7%)
infiximab + azathioprin	11 (25,6%)	10 (33,3%)	1 (7,7%)
adalimumab	2 (4,7%)	2 (6,7%)	0
azathioprin	8 (18,6%)	5 (16,7%)	3 (23,1%)
azathioprin + mesalazin	13 (30,2%)	9 (30%)	4 (30,7%)
methotrexát	1 (2,3%)	0	1 (7,7%)
mesalazin	3 (7%)	1 (3,3%)	2 (15,4%)
bez léčby	1 (2,3%)	0	1 (7,7%)

IBD = inflammatory bowel disease, nespecifický střevní zánět, CD = Crohn's disease, Crohnova choroba, UC = ulcerative colitis, ulcerózní kolitida

V tabulce 13 jsou uvedeny informace týkající se prevalence anemie, aktivity choroby, parametry zánětu, metabolismu železa a fekální kalprotektin u jednotlivých skupin dětí s IBD.

**Tabulka 13.** Prevalence anémie, indexy aktivity choroby, parametry zánětu a metabolismu železa v době diagnózy (baseline) a na konci sledování (follow-up).

		IBD (n=43)	CD (n=30)	UC (n=13)	
prevalence anémie	baseline	76,7%	83,3%	61,5%	§
	follow-up	20,9%***	23,3%***	15,3%**	§
PCDAI	baseline	-	37,5 (30,0-45,1)	-	
	follow-up	-	0,0 (0,0-5,1)***	-	
PUCAI	baseline	-	-	30,0 (30,0-35,00)	
	follow-up	-	-	0,0 (0,0-0,0)**	
hemoglobin (g/l)	baseline	113,3±16,7	111,7±14,4	116,8±21,3	
	follow-up	132,5±17,6***	132,2±19,7**	133,3±11,9*	
trombocyty (*10 <sup>9</sup> /l)	baseline	446,1±131,0	477,0±111,1	374,6±149,5	§
	follow-up	321,0±90,7***	328,1±86,2***	304,6±102,2	
CRP (mg/l)	baseline	17,4 (3,0-44,9)	40,0 (8,7-69,1)	1,7 (0,5-4,9)	§
	follow-up	1,2 (0,5-7,5)***	1,7 (0,6-8,4)***	0,8 (0,5-1,6)	
IL-6 (ng/l)	baseline	14,0 (6,1-19,6)	15,5 (11,0-26,7)	3,8 (3,1-8,6)	§
	follow-up	2,6 (1,5-5,4)***	2,5 (1,6-6,3)**	2,7 (1,4-3,1)	
FW (mm/h)	baseline	33,9 (17,1-45,0)	34,0 (17,0-50,1)	31,5 (17,2-42,6)	
	follow-up	4,0 (2,3-6,9)***	4,0 (2,1-7,0)**	3,0 (2,4-5,0)	
železo (μmol/l)	baseline	4,9 (3,4-8,4)	4,8 (3,3-7,1)	5,6 (3,7-11,3)	
	follow-up	9,1 (5,7-12,8)**	9,5 (5,2-12,7)**	8,7 (6,5-16,0)	
feritin (μg/l)	baseline	28,0 (11,1-55,8)	39,0 (18,5-97,1)	11,0 (7,0-21,9)	§
	follow-up	15,0 (11,0-27,9)**	15,5 (12,1-29,0)**	11,0 (9,0-18,1)	
sTfR (mg/l)	baseline	4,5 (3,2-6,1)	4,3 (3,2-6,1)	5,3 (3,3-6,6)	
	follow-up	3,8 (3,2-4,5)*	3,8 (3,2-4,3)	3,8 (3,3-5,5)	
sTfR/log[feritin]	baseline	3,5 (2,2-4,9)	3,2 (2,0-4,5)	4,3 (3,1-11,1)	§
	follow-up	3,3 (1,9-4,3)	3,0 (1,9-3,8)	4,2 (3,3-4,6)	
kalprotektin ve stolici (μg/g)	baseline	2765 (1445-6180)	2530 (1482-6450)	2793 (1135-5190)	
	follow-up	608 (130-1325)***	631 (102-1325)***	583 (345-1299)**	
hepcidin (ng/ml)	baseline	23,4 (7,5-69,7)	36,5 (11,5-79,6)	5,4 (3,4-16,6)	§
	follow-up	4,0 (0,9-7,2)***	2,1 (0,9-6,7)***	4,8 (0,9-8,1)	

IBD = inflammatory bowel disease, nespecifický střevní zánět, CD = Crohn's disease, Crohnova choroba, UC = ulcerative colitis, ulcerózní kolitida, PCDAI = Paediatric Crohn's Disease Activity, PUCAI = Paediatric Ulcerative Colitis Activity Index, CRP = C-reaktivní protein, IL-6 = interleukin 6, FW = sedimentace krve za hodinu, sTfR = solubilní transferinové receptory

hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil) – u veličin s nenormální distribucí hodnot, nebo jako průměr ± směrodatná odchylka – u veličin s normální distribucí hodnot, kategorické parametry (prevalence anémie) jako procentuální výskyt

\* = p<0,05, \*\* = p<0,01, \*\*\* = p<0,001, tzn. statisticky významný rozdíl mezi baseline a follow-up hodnotou podle Wilcoxonova U-testu, pro kategorická data podle Fischerova exaktního testu,

§ = p<0,05, tzn. statisticky významný rozdíl mezi CD a UC skupinou podle Mann-Whitneyova U-testu.

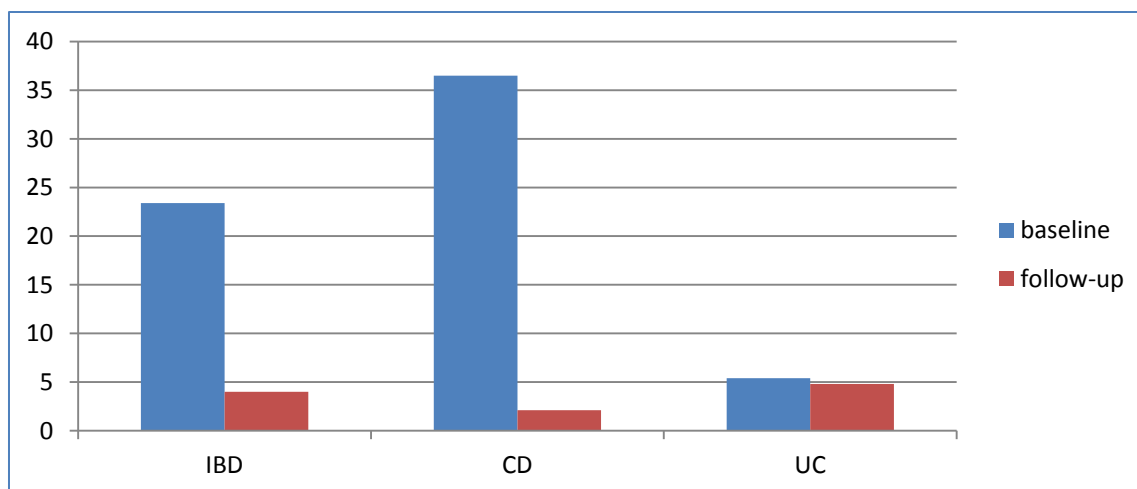
Na začátku sledování (baseline) jsme zjistili následující statisticky významné rozdíly mezi CD a UC pacienty. Pacienti s CD měli signifikantně vyšší prevalenci anémie, vyšší počet trombocytů, CRP, IL-6, feritinu, sTfR/log[feritin] a hladinu hepcidinu – viz tabulka 13.

Během sledování došlo v celé skupině nemocných s IBD k signifikantnímu poklesu prevalence anémie, nárůstu hladin hemoglobinu a sérového železa a poklesu počtu trombocytů, CRP, IL-6, FW, feritinu, sTfR, fekálního kalprotektinu a hepcidinu – viz tabulka 13. Při rozdělení pacientů do skupin (CD a UC) jsme zjistili, že statisticky významný pokles trombocytů, CRP, IL-6, FW, feritinu, hepcidinu a vzestup sérového železa byl zaznamenán pouze u nemocných s CD. Zatímco u nemocných s UC nedošlo v těchto parametrech k signifikantním změnám.

Hladiny hepcidinu poklesly tedy v celé skupině, což bylo dáno signifikantní poklesem u nemocných s CD, zatímco u nemocných s UC se hladiny hepcidinu signifikantně nezměnily (tabulka 13 a obrázek 13).

Na konci sledování (follow-up) nebyl, kromě nižší prevalence anémie u UC, zjištěn žádný signifikantní rozdíl ve sledovaných parametrech mezi CD a UC – viz tabulka 13.

**Obrázek 13.** Hladiny hepcidinu (ng/ml) v jednotlivých skupinách v době diagnózy (baseline) a na konci sledování (follow-up).



IBD = inflammatory bowel disease, nespecifický střevní zánět, CD = Crohn's disease, Crohnova choroba, UC = ulcerative colitis, ulcerózní kolitida

Změny v hladinách hepcidinu ( $\Delta\text{hepcidin} = \text{hepcidin}_{\text{baseline}} - \text{hepcidin}_{\text{follow-up}}$ ) korelovaly u nemocných s CD se změnou aktivity choroby (PCDAI) a změnou některých parametrů zánětu – CRP, FW, ale nikoliv s parametry metabolismu železa. Zatímco v UC skupině změny v hladinách hepcidinu signifikantně korelovaly pouze s hladinami železa. V celém souboru pacientů s IBD byly zaznamenány signifikantní korelace změny hladiny hepcidinu se změnou hladiny trombocytů a CRP (viz tabulka 14).

**Tabulka 14.** Korelace rozdílu v hladinách hepcidinu během sledování ( $\Delta$  hepcidin) s rozdíly ostatních parametrů.

	IBD	CD	UC
$\Delta$ PCDAI	-	<b><math>\rho=0.54</math></b>	-
$\Delta$ PUCAI	-	-	n.s.
$\Delta$ hemoglobin	n.s.	n.s.	n.s.
$\Delta$ trombocyty	<b><math>\rho=0.44</math></b>	n.s.	n.s.
$\Delta$ CRP	<b><math>\rho=0.56</math></b>	<b><math>\rho=0.50</math></b>	n.s.
$\Delta$ IL-6	n.s.	n.s.	n.s.
$\Delta$ FW	n.s.	<b><math>\rho=0.85</math></b>	n.s.
$\Delta$ Fe	n.s.	n.s.	<b><math>\rho=0.83</math></b>
$\Delta$ ferritin	n.s.	n.s.	n.s.
$\Delta$ sTfR	n.s.	n.s.	n.s.
$\Delta$ sTfR/log(ferritin)	n.s.	n.s.	n.s.
$\Delta$ kalprotektin	n.s.	n.s.	n.s.

IBD = inflammatory bowel disease, nespecifický střevní zánět, CD = Crohn's disease, Crohnova choroba, UC = ulcerative colitis, ulcerózní kolitida, PCDAI = Paediatric Crohn's Disease Activity, PUCAI = Paediatric Ulcerative Colitis Activity Index, CRP = C-reaktivní protein, IL-6 = interleukin 6, FW = sedimentace krve za hodinu, sTfR = solubilní transferinové receptory,  $\Delta$  = rozdíl v hladinách jednotlivých parametrů během sledování,  $\rho$  =

Spearmanův korelační koeficient je uveden v případě signifikantní korelace ( $p < 0,05$ ), n.s. = nesignifikantní

Dále jsme se pokusili nalézt rozdíly ve sledovaných parametrech podle toho, zda jedinci s IBD dostávali biologickou léčbu či nikoliv. Vzhledem k tomu, že pacienti s UC představovali malou skupinu ( $n=13$ ) a pouze 2 byli léčeni biologickou léčbou, provedli jsme tuto analýzu jen u pacientů s CD ( $n=30$ ) – viz tabulka 15. Pacienti v první skupině biologickou léčbu nedostávali, byli léčeni azathioprinem a/nebo mesalazinem. Do druhé skupiny byli zařazeni ti, kteří dostávali biologickou léčbu (infliximab, adalimumab), nejčastěji v kombinaci s azathioprinem (67% z nich). V obou skupinách došlo během sledování (baseline versus follow-up) k signifikantnímu poklesu prevalence anémie, PCDAI, trombocytů, CRP, IL-6, FW, feritinu, hepcidinu a kalprotektinu ve stolici a vzestupu hemoglobinu a hladiny sérového železa. Statisticky významný rozdíl mezi oběma skupinami jsme zaznamenali pouze v hladinách CRP a IL-6 na konci sledování, kdy pacienti na biologické léčbě měli signifikantně nižší follow-up hodnoty CRP a IL-6 ve srovnání s pacienty, kteří biologickou léčbu nedostávali. I když iniciálně měli nemocní, co si vyžádali biologickou léčbu, o něco vyšší PCDAI, počet trombocytů, FW a hladinu feritinu i hepcidinu, tyto rozdíly nebyly statisticky významné. Z iniciálně vyšetřených parametrů jsme tedy nezjistili žádné statisticky významné prediktivní ukazatele, které by v době diagnózy poukazovaly na budoucí závažnější, rizikový průběh onemocnění vyžadující podání biologické léčby.

**Tabulka 15.** Porovnání jednotlivých parametrů u pacientů s CD, kteří nebyli léčeni biologickou léčbou oproti těm s biologickou léčbou.

		CD biologická léčba 0 (n=15)	CD biologická léčba 1 (n=15)
prevalence anémie	baseline follow-up	84,6% 21,4%**	67% 26,7%**
PCDAI	baseline follow-up	35,0 (25,0-40,5) 0,0 (0,0-5,0)***	40,0 (30,0-55,0) 0,0 (0,0-10,0)***
hemoglobin (g/l)	baseline follow-up	110,9±6,2 132,4±22,8***	112,6±19,8 131,9±16,8**
trombocyty (*10 <sup>9</sup> /l)	baseline follow-up	454,5±105,6 344,6±98,9***	499,6±115,3 311,6±70,8***
CRP (mg/l)	baseline follow-up	44,0 (4,0-72,1) 7,3 (0,6-14,5)***	29,0 (8,7-62,9) 1,2 (0,6-3,7)*** §
IL-6 (ng/l)	baseline follow-up	14,9 (11,0-26,7) 5,8 (1,5-8,5)***	16,0 (9,8-55,2) 2,0 (1,6-2,6)** §
FW (mm/h)	baseline follow-up	26,0 (16,0-36,0) 5,0 (1,1-9,0)***	47,5 (23,5-67,5) 3,0 (2,1-7,2)**
železo (μmol/l)	baseline follow-up	4,6 (3,3-6,4) 10,6 (5,2-12,7)**	4,8 (2,9-7,2) 9,1 (5,1-12,6)**
feritin (μg/l)	baseline follow-up	31,0 (14,1-87,8) 16,0 (13,0-28,9)**	50,0 (19,0-161,1) 15,0 (9,1-72,0)**
sTfR (mg/l)	baseline follow-up	4,6 (3,2-5,7) 3,8 (3,4-4,4)*	3,9 (3,1-6,1) 3,4 (2,6-4,3)
sTfR/log[feritin]	baseline follow-up	3,5 (2,1-4,5) 3,0 (2,7-3,8)	2,5 (1,4-4,3) 3,0 (1,6-3,9)
kalprotektin ve stolici (μg/g)	baseline follow-up	3715 (1445-6450) 661 (99-1430)***	1850 (1504-5560) 600 (105-1230)***
hepcidin (ng/ml)	baseline follow-up	21,4 (7,5-74,3) 5,1 (0,9-7,6)***	49,6 (13,0-84,7) 1,1 (0,9-5,6)***

CD = Crohn's disease, Crohnova choroba, PCDAI = Paediatric Crohn's Disease Activity, CRP = C-reaktivní protein, IL-6 = interleukin 6, FW = sedimentace krve za hodinu, sTfR = solubilní transferinové receptory

hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (25.-75. percentil) – u veličin s nenormální distribucí hodnot, nebo jako průměr ± směrodatná odchylka – u veličin s normální distribucí hodnot, kategoričké parametry (prevalence anemie) jako procentuální výskyt

\* = p<0,05, \*\* = p<0,01, \*\*\* = p<0,001, tzn. statisticky významný rozdíl mezi baseline a follow-up hodnotou podle párového Wilcoxonova U-testu, pro kategoričká data podle Fischerova exaktního testu

§ = p<0,05, tzn. statisticky významný rozdíl mezi CD 1 a CD 0 skupinou podle Mann-Whitneyova U-testu.

#### 2.2.4. Diskuze

Většina studií, které byly publikovány, hodnotí hladiny hepcidinu a ostatních parametrů metabolismu železa průřezově v různých fázích onemocnění a léčby IBD. V této studii jsme chtěli u nově diagnostikovaných jedinců posoudit dynamiku těchto parametrů během prospektivního sledování. Na začátku (baseline) měli pacienti s CD ve srovnání s UC signifikantně vyšší prevalenci anémie, vyšší hodnoty trombocytů, CRP, IL-6, feritinu, sTfR/log[feritin] a hladinu hepcidinu, zatímco na konci studie (follow-up) se kromě vyšší prevalence anemie v těchto sledovaných parametrech nelišili. V rámci celého souboru IBD nemocných došlo během sledování (baseline versus follow-up) k signifikantnímu nárůstu hemoglobinu a poklesu prevalence anemie a fekálního kalprotektinu. Dále u nich došlo k významnému poklesu počtu trombocytů, CRP, IL-6, FW, feritinu, hepcidinu a vzestupu sérového železa, což bylo dáno signifikantními změnami těchto parametrů pouze u CD pacientů, zatímco ve skupině dětí s UC v těchto parametrech nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl.

Tento rozdíl mohou napomoci vysvětlit data z naší předchozí práce provedené u nově diagnostikovaných IBD pacientů [91]. V době diagnózy převažovala u nemocných s CD anémie chronických chorob v kombinaci s IDA (80% anemických pacientů), zatímco jedinci s UC měli dominantně „čistou“ IDA (64%). Tomu pak odpovídal statisticky významný rozdíl v hladinách hepcidinu u dětí s CD versus UC [91]. Během nynějšího prospektivního sledování jsme u všech pacientů zjistili signifikantní vzestup hladin hemoglobinu, a to jak ve skupině dětí s CD tak i s UC. To, že se sérové hladiny hepcidinu v UC skupině při současném zvýšení hladiny hemoglobinu signifikantně nezměnily, potvrzuje fakt, že u těchto nemocných v patogenezi anémie dlouhodobě převažuje deficit železa nad zánětlivou aktivitou. Tento fenomén byl již dříve popsán Daherem, který uvádí, že hladina hepcidinu je více ovlivněna deficitem železa než zánětlivou aktivitou onemocnění [67].



V celé skupině pacientů s IBD změny v hladinách hepcidinu signifikantně korelovaly se změnou hladiny CRP a počtu trombocytů. Ve skupině nemocných s CD, kde na rozdíl od pacientů s UC, iniciálně zvýšené hladiny hepcidinu dominovaly, byla zaznamenána významná korelace poklesu hepcidinu se změnou aktivity choroby (PCDAI) a s některými parametry zánětu – CRP, FW. Některé práce dokládají efekt protizánětlivé léčby na hladiny hepcidinu nebo prohepcidinu. Ve studii Cavallary et al. srovnali hladiny prohepcidinu u šestnácti dospělých pacientů s CD a pěti s UC po léčbě infliximabem nebo adalimumabem. Sérové hladiny prohepcidinu byly měřeny před podáním první dávky biologické léčby a za šest týdnů po první aplikaci. V obou skupinách (CD i UC) došlo k signifikantnímu poklesu hladin sérového prohepcidinu po zahájení biologické léčby. Pokles hladin autoři dávají do souvislosti se snížením sérové hladiny interleukinu-6 [108]. U dětí byly hladiny hepcidinu srovnávány před a po zahájení anti-TNF léčby v nedávné práci Atkinsona et al., během které došlo k signifikantnímu poklesu hladin hepcidinu, vzestupu hemoglobinu a albuminu [104]. Pokles hladin hepcidinu po podání biologické léčby byl popsán také u jiných zánětlivých onemocnění. Ve studii Suzukiho et al. byl zjištěn pokles hladiny hepcidinu po léčbě tocilizumabem u dospělých pacientů (n=10) s revmatoidní artritidou v týdnu 12 po zahájení léčby [88]. Dále byl u dospělých pacientů (n=93) s revmatoidní artritidou porovnáván efekt tocilizumabu a infliximabu. Autoři zjistili v obou skupinách pokles hladin hepcidinu, IL-6 a zvýšení hladin hemoglobinu, ale při léčbě tocilizumabem byl pokles hladin hepcidinu oproti infliximabu signifikantně větší [102]. Všechny tyto výsledky ukazují na pozitivní vliv protizánětlivé léčby na metabolismus železa. Potlačením zánětlivé aktivity dochází k poklesu hladin hepcidinu, což vede ke zlepšení vstřebávání železa z trávicího traktu a jeho reutilizaci z endogenních zdrojů.

V našem souboru nemocných s CD došlo u všech k signifikantnímu poklesu prevalence anémie, vzestupu hladiny hemoglobinu a sérových koncentrací železa, bez ohledu

na to, zda byli či nebyli léčeni biologickou léčbou. Stejně tak nebyl patrný efekt podávání biologické léčby ve srovnání se standardní terapií na pokles aktivity onemocnění, zánětlivých parametrů, hladin feritinu i hepcidinu, či kalprotektinu ve stolici. Signifikantní rozdíl byl zaznamenán pouze ve finálních (follow-up) hladinách CRP a IL-6, což svědčí pro intenzivnější protizánětlivý efekt biologické léčby ve srovnání s konvenční protizánětlivou terapií. Předmětem současného výzkumu v oblasti IBD je sledování rizikových faktorů přítomných v době diagnózy, podle kterých by bylo možné již v tomto období odlišit vysoce rizikové pacienty, kteří budou s vysokou pravděpodobností vyžadovat intenzifikovanou léčbu včetně léčby biologické. My jsme ve sledovaných parametrech u dětí s CD na začátku léčby statisticky významné rozdíly nenašli, i když nemocní, kteří si následně vyžádali biologickou léčbu, jeví tendenci mít o něco vyšší PCDAI, počet trombocytů, FW, hladiny feritinu i hepcidinu. Tyto rozdíly by možná mohly být statisticky významné, pokud bychom porovnávali větší skupiny nemocných.

Mezi limitace naší práce patří tedy relativně malý soubor pacientů. Navíc byla poměrně velká variabilita v čase mezi baseline a follow-up vyšetřením. Výhodou naší studie se jeví prospektivní sledování dynamiky sérových hladin hepcidinu a ostatních vyšetřovaných parametrů. Další přednost spatřujeme v tom, že iniciální hodnoty vyšetřovaných parametrů nebyly ovlivněny žádnou léčbou.

### 2.2.5. Závěr

Během prospektivního sledování jsme u nemocných s IBD zaznamenali signifikantní pokles hladin hepcidinu, feritinu, zánětlivých parametrů, fekálního kalprotektinu, snížení prevalence anémie, vzestup hladin hemoglobinu a sérového železa, což bylo dáno signifikantními změnami těchto parametrů především u jedinců s CD. U dětí s UC došlo pouze ke snížení výskytu anémie, poklesu kalprotektinu a vzestupu hladin hemoglobinu. Změny v hladinách hepcidinu byly u dětí s CD signifikantně asociovány se změnou aktivity choroby (PCDAI) a změnou některých parametrů zánětu (FW, CRP). Použití biologické léčby u těchto nemocných nebylo provázeno statisticky významným rozdílem v poklesu hladin hepcidinu. Byl však zaznamenán rozdíl ve finálních hladinách CRP a IL-6, který svědčí pro intenzivnější protizánětlivý efekt biologické léčby ve srovnání s konvenční protizánětlivou terapií.

Rozdílné hladiny sérového hepcidinu mezi CD a UC pacienty na počátku onemocnění a dále v průběhu nemoci, během udržovací terapie, odráží rozdílný podíl deficitu železa a zánětu na vzniku anémie. Hepcidin je slibným markerem, jehož aktuální hladina může, společně s ostatními měřenými parametry, přispět k lepšímu pochopení metabolismu železa v průběhu zánětlivého procesu u IBD.

### 3. LITERATURA

1. Bousvaros A. Use of immunomodulators and biologic therapies in children with inflammatory bowel disease. *Expert Rev Clin Immunol* 2010; 6:659-666.
2. Mařatka Z. *Gastroenterologie*. Karolinum, Praha, 1999.
3. Sýkora J, Pomahačová R, Kreslová M, Cvalínová D, Štych P, Schwarz J. Current global trends in the incidence of pediatric-onset inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2018; 24:2741-2763.
4. Kolek A, Janout V, Tichý M, Grepl M. The incidence of inflammatory bowel disease is increasing among children 15 years old and younger in the Czech Republic. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004; 38:362-363.
5. Schwarz J, Sýkora J, Cvalínová D, Pomahačová R, Klečková J, Kryl M, Včelák P. Inflammatory bowel disease incidence in Czech children: A regional prospective study, 2000-2015. *World J Gastroenterol* 2017; 23:4090-4101.
6. Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sørensen TI, Binder V. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 1991; 324:84-88.
7. Bengtson MB, Solberg C, Aamodt G, Jahnsen J, Moum B, Sauar J, Vatn MH; Ibsen Study Group. Clustering in time of familial IBD separates ulcerative colitis from Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15:1867-1874.
8. Spehlmann ME, Begun AZ, Burghardt J, Lepage P, Raedler A, Schreiber S. Epidemiology of inflammatory bowel disease in a German twin 76esist: results of a nationwide study. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14:968-976.
9. Hradsky O, Lenicek M, Dusatkova P, Bronsky J, Nevoral J, Valtrova V, Kotalova R, Szitanyi P, Petro R, Starzykova V, Bortlik M, Vitek L, Lukas M, Cinek O. Variants of CARD15, TNFA and PTPN22 and susceptibility to Crohn's disease in the Czech population: high frequency of the CARD15 1007fs. *Tissue Antigens* 2008; 71:538-547.

10. Cleynen I, Boucher G, Jostins L, Schumm LP, Zeissig S, Ahmad T, Andersen V, Andrews JM, Annese V, Brand S, Brant SR, Cho JH, Daly MJ, Dubinsky M, Duerr RH, Ferguson LR, Franke A, Gearry RB, Goyette P, Hakonarson H, Halfvarson J, Hov JR, Huang H, Kennedy NA, Kupcinskis L, Lawrance IC, Lee JC, Satsangi J, Schreiber S, Théâtre E, van der Meulende Jong AE, Weersma RK, Wilson DC; International Inflammatory Bowel Disease Genetics Consortium, Parkes M, Vermeire S, Rioux JD, Mansfield J, Silverberg MS, Radford-Smith G, McGovern DP, Barrett JC, Lees CW. Inherited determinants of Crohn's disease and ulcerative colitis phenotypes: a genetic association study. *Lancet* 2016; 387:156-167.
11. Keestra-Gounder AM, Byndloss MX, Seyffert N, Young BM, Chávez-Arroyo A, Tsai AY, Cevallos SA, Winter MG, Pham OH, Tiffany CR, de Jong MF, Kerrinnes T, Ravindran R, Luciw PA, McSorley SJ, Bäumlér AJ, Tsolis RM. NOD1 and NOD2 signalling links ER stress with inflammation. *Nature* 2016; 532:394-397.
12. Farh KK, Marson A, Zhu J, Kleinewietfeld M, Housley WJ, Beik S, Shores N, Whitton H, Ryan RJ, Shishkin AA, Hatan M, Carrasco-Alfonso MJ, Mayer D, Luckey CJ, Patsopoulos NA, De Jager PL, Kuchroo VK, Epstein CB, Daly MJ, Hafler DA, Bernstein BE. Genetic and epigenetic fine mapping of causal autoimmune disease variants. *Nature* 2015; 518:337-343.
13. Laing B, Barnett MPG, Marlow G, Nasef NA, Ferguson LR. An update on the role of gut microbiota in chronic inflammatory diseases, and potential therapeutic targets. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2018; 1:1-15.
14. Karásková E. Role synbiotik v managementu léčby alergie na bílkovinu kravského mléka kojenců: Mohou pre/probiotika napomoci v léčbě? *Pediatr Praxi* 2017; 18:249-251.
15. Maukonen J, Kolho KL, Paasela M, Honkanen J, Klemetti P, Vaarala O, Saarela M. Altered Fecal Microbiota in Paediatric Inflammatory Bowel Disease. *J Crohns Colitis* 2015; 9:1088-1095.

16. Kolho KL, Korpela K, Jaakkola T, Pichai MV, Zoetendal EG, Salonen A, de Vos WM. Fecal Microbiota in Pediatric Inflammatory Bowel Disease and Its Relation to Inflammation. *Am J Gastroenterol* 2015; 110:921-930.
17. Schwerd T, Frivolt K, Clavel T, Lagkouvardos I, Katona G, Mayr D, Uhlig HH, Haller D, Koletzko S, Bufler P. Exclusive enteral nutrition in active pediatric Crohn disease: Effects on intestinal microbiota and immune regulation. *J Allergy Clin Immunol* 2016; 138:592-596.
18. Hoarau G, Mukherjee PK, Gower-Rousseau C, Hager C, Chandra J, Retuerto MA, Neut C, Vermeire S, Clemente J, Colombel JF, Fujioka H, Poulain D, Sendid B, Ghannoum MA. Bacteriome and Mycobiome Interactions Underscore Microbial Dysbiosis in Familial Crohn's Disease. *MBio* 2016; 7 pii: e01250-16.
19. Ng SC, Tang W, Leong RW, Chen M, Ko Y, Studd C, Niewiadomski O, Bell S, Kamm MA, de Silva HJ, Kasturiratne A, Senanayake YU, Ooi CJ, Ling KL, Ong D, Goh KL, Hilmi I, Ouyang Q, Wang YF, Hu P, Zhu Z, Zeng Z, Wu K, Wang X, Xia B, Li J, Pisespongsa P, Manatsathit S, Aniwana S, Simadibrata M, Abdullah M, Tsang SW, Wong TC, Hui AJ, Chow CM, Yu HH, Li MF, Ng KK, Ching J, Wu JC, Chan FK, Sung JJ; Asia-Pacific Crohn's and Colitis Epidemiology Study ACCESS Group. Environmental risk factors in inflammatory bowel disease: a population-based case-control study in Asia-Pacific. *Gut* 2015; 64:1063-1071.
20. Barclay AR, Russell RK, Wilson ML, Gilmour WH, Satsangi J, Wilson DC. Systematic review: the role of breastfeeding in the development of pediatric inflammatory bowel disease. *J Pediatr* 2009;155:421-426.
21. Soon IS, Molodecky NA, Rabi DM, Ghali WA, Barkema HW, Kaplan GG. The relationship between urban environment and the inflammatory bowel diseases: a systematic review and meta-analysis. *BMC Gastroenterol* 2012;12:51.

22. Shaw SY, Blanchard JF, Bernstein CN. Association between the use of antibiotics in the first year of life and pediatric inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2010; 105:2687-2692.
23. Bronský J, Beránková K, Černá Z, Čopová I, Ďuricová D, Durilová M, Hradský O, Karásková E, Mitrová K, Nevorál J, Poš L, Schwarz J, Szitányi P, Škába R, Šuláková A, Tuková J. Doporučení Pracovní skupiny dětské gastroenterologie a výživy ČPS pro diagnostiku a léčbu nespecifických střevních zánětů u dětí – doplněk k 1. vydání. *Gastroent Hepatol* 2017; 71:11-18.
24. Nevorál J et al. Praktická pediatrická gastroenterologie, hepatologie a výživa. Mladá fronta a.s. Praha, 2013.
25. Karásková E, Praško J, Jelenová D, Kolářová J, Hunková M, Ocisková M, Mihál V. Psychosociální aspekty nespecifických střevních zánětů u dětí. *Čes-slov Pediat* 2016; 71:111–115.
26. Aomatsu T, Yoden A, Matsumoto K, Kimura E, Inoue K, Andoh A, Tamai H. Fecal calprotectin is a useful marker for disease activity in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2011; 56:2372-2377.
27. Adamcová M, Bajer M, Bajerová K, Bronský J, Dědek P, Hradský O, Karásková E, Kavalcová L, Mitrová K, Netvalová S, Nevorál J, Pozler O, Schwarz J, Szitányi P, Škába R, Šuláková A. Doporučení Pracovní skupiny dětské gastroenterologie a výživy při ČPS pro diagnostiku a léčbu nespecifických střevních zánětů u dětí. *Čes-slov Pediat* 2012; 67(Suppl 2):4
28. Levine A, Koletzko S, Turner D, Escher JC, Cucchiara S, de Ridder L, Kolho KL, Veres G, Russell RK, Paerregaard A, Buderus S, Greer ML, Dias JA, Veereman-Wauters G, Lionetti P, Sladek M, Martin de Carpi J, Staiano A, Ruemmele FM, Wilson DC; European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. ESPGHAN revised porto criteria for

the diagnosis of inflammatory bowel disease in children and adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2014; 58:795-806.

29. Turner D, Ruemmele FM, Orlanski-Meyer E, Griffiths AM, de Carpi JM, Bronsky J, Veres G, Aloï M, Strisciuglio C, Braegger CP, Assa A, Romano C, Hussey S, Stanton M, Pakarinen M, de Ridder L, Katsanos K, Croft N, Navas-López V, Wilson DC, Lawrence S, Russell RK. Management of Paediatric Ulcerative Colitis, Part 1: Ambulatory Care-An Evidence-based Guideline From European Crohn's and Colitis Organization and European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2018; 67:257-291.

30. Hyams JS, Ferry GD, Mandel FS, Gryboski JD, Kibort PM, Kirschner BS, Griffiths AM, Katz AJ, Grand RJ, Boyle JT. Development and validation of a pediatric Crohn's disease activity index. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1991; 12:439-447.

31. Turner D, Hyams J, Markowitz J, Lerer T, Mack DR, Evans J, Pfefferkorn M, Rosh J, Kay M, Crandall W, Keljo D, Otley AR, Kugathasan S, Carvalho R, Oliva-Hemker M, Langton C, Mamula P, Bousvaros A, LeLeiko N, Griffiths AM; Pediatric IBD Collaborative Research Group. Pediatric IBD Collaborative Research Group. Appraisal of the pediatric ulcerative colitis activity index (PUCAI). *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15:1218-1223.

32. Zubin G, Peter L. Predicting Endoscopic Crohn's Disease Activity Before and After Induction Therapy in Children: A Comprehensive Assessment of PCDAI, CRP, and Fecal Calprotectin. *Inflamm Bowel Dis* 2015; 21:1386-1391.

33. Turner D, Levine A, Walters TD, Focht G, Otley A, López VN, Koletzko S, Baldassano R, Mack D, Hyams J, Griffiths AM. Which PCDAI Version Best Reflects Intestinal Inflammation in Pediatric Crohn Disease? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2017; 64:254-260.

34. Karásková E. Výlučná enterální výživa – léčba první volby Crohnovy choroby u dětí. *Gastroent Hepatol* 2015; 69:531-535.



35. Dziechciarz P, Horvath A, Shamir R, Szajewska H. Meta-analysis: enteral nutrition in active Crohn's disease in children. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26:795-806.
36. Borrelli O, Cordischi L, Cirulli M, Paganelli M, Labalestra V, Uccini S, Russo PM, Cucchiara S. Polymeric diet alone versus corticosteroids in the treatment of active pediatric Crohn's disease: a randomized controlled open-label trial. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4:744-753.
37. Karásková E, Vydra D, Smolka V, Véghová-Velgáňová M, Tkachyk O, Ťoukálková L, Mihál V. Refeeding syndrom v dětském věku. *Čes-slov Pediat* 2014; 69:363-369.
38. Walters TD, Kim MO, Denson LA, Griffiths AM, Dubinsky M, Markowitz J, Baldassano R, Crandall W, Rosh J, Pfefferkorn M, Otley A, Heyman MB, LeLeiko N, Baker S, Guthery SL, Evans J, Ziring D, Kellermayer R, Stephens M, Mack D, Oliva-Hemker M, Patel AS, Kirschner B, Moulton D, Cohen S, Kim S, Liu C, Essers J, Kugathasan S, Hyams JS; PRO-KIIDS Research Group. Increased effectiveness of early therapy with anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  vs an immunomodulator in children with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2014; 146:383-391.
39. Patel D, Trivedi C, Khan N. Management of Anemia in Patients with Inflammatory Bowel Disease (IBD). *Curr Treat Options Gastroenterol* 2018; 16:112-128
40. Wiskin AE, Fleming BJ, Wootton SA, Beattie RM. Anaemia and iron deficiency in children with inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* 2012; 6:687-691.
41. Wells CW, Lewis S, Barton JR, Corbett S. Effects of changes in haemoglobin level on quality of life and cognitive function in inflammatory bowel disease patients. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12:123-130.
42. Nissenon AR, Wade S, Goodnough T, Knight K, Dubois RW. Economic burden of anemia in an insured population. *J Manag Care Pharm* 2005; 11:565-574.

43. Dignass AU, Gasche C, Bettenworth D, Birgegård G, Danese S, Gisbert JP, Gomollon F, Iqbal T, Katsanos K, Koutroubakis I, Magro F, Savoye G, Stein J, Vavricka S; European Crohn's and Colitis Organisation [ECCO]. European consensus on the diagnosis and management of iron deficiency and anaemia in inflammatory bowel diseases. *J Crohns Colitis* 2015; 9:211-222.
44. Khan N, Patel D, Shah Y, Yang YX. Factors Predicting Testing and Treatment of Iron Deficiency in a Nationwide Cohort of Anemic UC Patients. *Inflamm Bowel Dis* 2016; 22:2894-2901.
45. Dignass A, Farrag K, Stein J. Limitations of Serum Ferritin in Diagnosing Iron Deficiency in Inflammatory Conditions. *Int J Chronic Dis* 2018; 2018:9394060.
46. Auerbach M, Adamson JW. How we diagnose and treat iron deficiency anemia. *Am J Hematol* 2016; 91:31-38.
47. Borel MJ, Smith SM, Derr J, Beard JL. Day-to-day variation in iron-status indices in healthy men and women. *Am J Clin Nutr* 1991; 54:729-735.
48. Ford BA, Coyne DW, Eby CS, Scott MG. Variability of ferritin measurements in chronic kidney disease; implications for iron management. *Kidney Int* 2009; 75:104-110.
49. Kaitha S, Bashir M, Ali T. Iron deficiency anemia in inflammatory bowel disease. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2015; 6:62-72.
50. Infusino I, Braga F, Dolci A, Panteghini M. Soluble transferrin receptor (sTfR) and sTfR/log ferritin index for the diagnosis of iron-deficiency anemia. A meta-analysis. *Am J Clin Pathol*. 2012; 138:642-649.
51. Reifen R, Matas Z, Zeidel L, Berkovitch Z, Bujanover Y. Iron supplementation may aggravate inflammatory status of colitis in a rat model. *Dig Dis Sci* 2000; 45:394-397.

52. Carrier J, Aghdassi E, Platt I, Cullen J, Allard JP. Effect of oral iron supplementation on oxidative stress and colonic inflammation in rats with induced colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15:1989-1999.
53. Camaschella C. New insights into iron deficiency and iron deficiency anemia. *Blood Rev* 2017; 31:225-233.
54. Zimmermann MB, Chassard C, Rohner F, N'goran EK, Nindjin C, Dostal A, Utzinger J, Ghattas H, Lacroix C, Hurrell RF. The effects of iron fortification on the gut microbiota in African children: a randomized controlled trial in Cote d'Ivoire. *Am J Clin Nutr* 2010; 92:1406-1415.
55. Lee T, Clavel T, Smirnov K, Schmidt A, Lagkouvardos I, Walker A, Lucio M, Michalke B, Schmitt-Kopplin P, Fedorak R, Haller D. Oral versus intravenous iron replacement therapy distinctly alters the gut microbiota and metabolome in patients with IBD. *Gut* 2017; 66:863-871.
56. Schröder O, Mickisch O, Seidler U, de Weerth A, Dignass AU, Herfarth H, Reinshagen M, Schreiber S, Junge U, Schrott M, Stein J. Intravenous iron sucrose versus oral iron supplementation for the treatment of iron deficiency anemia in patients with inflammatory bowel disease--a randomized, controlled, open-label, multicenter study. *Am J Gastroenterol* 2005; 100:2503-2509.
57. Lee TW, Kolber MR, Fedorak RN, van Zanten SV. Iron replacement therapy in inflammatory bowel disease patients with iron deficiency anemia: a systematic review and meta-analysis. *J Crohns Colitis* 2012; 6:267-275.
58. Bonovas S, Fiorino G, Allocca M, Lytras T, Tsantes A, Peyrin-Biroulet L, Danese S. Intravenous Versus Oral Iron for the Treatment of Anemia in Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Medicine (Baltimore)* 2016; 95:e2308.

59. Laass MW, Straub S, Chainey S, Virgin G, Cushway T. Effectiveness and safety of ferric carboxymaltose treatment in children and adolescents with inflammatory bowel disease and other gastrointestinal diseases. *BMC Gastroenterol* 2014; 14:184.
60. Moretti D, Goede JS, Zeder C, Jiskra M, Chatzinakou V, Tjalsma H, Melse-Boonstra A, Brittenham G, Swinkels DW, Zimmermann MB. Oral iron supplements increase hepcidin and decrease iron absorption from daily or twice-daily doses in iron-depleted young women. *Blood* 2015; 126:1981-1989.
61. Schaap CC, Hendriks JC, Kortman GA, Klaver SM, Kroot JJ, Laarakkers CM, Wiegerinck ET, Tjalsma H, Janssen MC, Swinkels DW. Diurnal rhythm rather than dietary iron mediates daily hepcidin variations. *Clin Chem* 2013; 59:527-535.
62. Bregman DB, Morris D, Koch TA, He A, Goodnough LT. Hepcidin levels predict nonresponsiveness to oral iron therapy in patients with iron deficiency anemia. *Am J Hematol* 2013; 88:97-101.
63. Daher R, Karim Z. Iron metabolism: State of the art. *Transfus Clin Biol* 2017; 24:115-119.
64. Wallace DF. The Regulation of Iron Absorption and Homeostasis. *Clin Biochem Rev* 2016; 37:51-62.
65. Ganz T. Iron and infection. *Int J Hematol* 2018; 107:7-15.
66. Camaschella C, Schrier SL. Regulation of iron balance.  
<https://www.uptodate.com/contents/regulation-of-iron-balance>
67. Daher R, Manceau H, Karim Z. Iron metabolism and the role of the iron-regulating hormone hepcidin in health and disease. *Presse Med* 2017; 46:e272-e278.
68. Casu C, Nemeth E, Rivella S. Hepcidin agonists as therapeutic tools. *Blood* 2018; 131:1790-1794.

69. Cui Y, Wu Q, Zhou Y. Iron-refractory iron deficiency anemia: new molecular mechanisms. *Kidney Int* 2009; 76:1137-1141.
70. Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Heparin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 2001; 276:7806-7810.
71. Krawiec P, Mroczkowska-Juchkiewicz A, Pac-Kozuchowska E. Serum Heparin in Children with Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis* 2017; 23:2165-2171.
72. Krawiec P, Pac-Kozuchowska E. The role of heparin in iron metabolism in inflammatory bowel diseases. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2014; 68:936-943.
73. Bergamaschi G, Di Sabatino A, Albertini R, Costanzo F, Guerci M, Masotti M, Pasini A, Massari A, Campostrini N, Corbella M, Girelli D, Corazza GR. Serum heparin in inflammatory bowel diseases: biological and clinical significance. *Inflamm Bowel Dis* 2013; 19:2166-2172.
74. Zhang AS, Anderson SA, Wang J, Yang F, DeMaster K, Ahmed R, Nizzi CP, Eisenstein RS, Tsukamoto H, Enns CA. Suppression of hepatic heparin expression in response to acute iron deprivation is associated with an increase of matrilysin-2 protein. *Blood* 2011; 117:1687-1699.
75. Aschemeyer S, Qiao B, Stefanova D, Valore EV, Sek AC, Ruwe TA, Vieth KR, Jung G, Casu C, Rivella S, Jormakka M, Mackenzie B, Ganz T, Nemeth E. Structure-function analysis of ferroportin defines the binding site and an alternative mechanism of action of heparin. *Blood* 2018; 131:899-910.
76. Donker AE, Schaap CC, Novotny VM, Smeets R, Peters TM, van den Heuvel BL, Raphael MF, Rijnveld AW, Appel IM, Vlot AJ, Versluijs AB, van Gelder M, Granzen B, Janssen MC, Rennings AJ, van de Veerdonk FL, Brons PP, Bakkeren DL, Nijziel MR, Vlasveld LT, Swinkels DW. Iron refractory iron deficiency anemia: a heterogeneous disease that is not always iron refractory. *Am J Hematol* 2016; 91:E482-E490.

78. Kroot JJ, Kemna EH, Bansal SS, Busbridge M, Campostrini N, Girelli D, Hider RC, Koliaraki V, Mamalaki A, Olbina G, Tomosugi N, Tselepis C, Ward DG, Ganz T, Hendriks JC, Swinkels DW. Results of the first international round robin for the quantification of urinary and plasma hepcidin assays: need for standardization. *Haematologica* 2009; 94:1748-1752.
79. van der Vorm LN, Hendriks JC, Laarakkers CM, Klaver S, Armitage AE, Bamberg A, Geurts-Moespot AJ, Girelli D, Herkert M, Itkonen O, Konrad RJ, Tomosugi N, Westerman M, Bansal SS, Campostrini N, Drakesmith H, Fillet M, Olbina G, Pasricha SR, Pitts KR, Sloan JH, Tagliaro F, Weykamp CW, Swinkels DW. Toward Worldwide Hepcidin Assay Harmonization: Identification of a Commutable Secondary Reference Material. *Clin Chem* 2016; 62:993-1001.
80. Wolff F, Deleers M, Melot C, Gulbis B, Cotton F. Hepcidin-25: Measurement by LC-MS/MS in serum and urine, reference ranges and urinary fractional excretion. *Clin Chim Acta* 2013; 423:99-104.
81. Galesloot TE, Vermeulen SH, Geurts-Moespot AJ, Klaver SM, Kroot JJ, van Tienoven D, Wetzels JF, Kiemeny LA, Sweep FC, den Heijer M, Swinkels DW. Serum hepcidin: reference ranges and biochemical correlates in the general population. *Blood* 2011; 117:e218-e225.
82. Sdogou T, Tsentidis C, Gourgiotis D, Marmarinos A, Gkourogiani A, Papassotiriou I, Anastasiou T, Kossiva L. Immunoassay-based serum hepcidin reference range measurements in healthy children: differences among age groups. *J Clin Lab Anal* 2015; 29:10-14.
83. Uijterschout L, Swinkels DW, Domellöf M, Lagerqvist C, Hudig C, Tjalsma H, Vos R, van Goudoever JB, Brus F. Serum hepcidin measured by immunochemical and mass-spectrometric methods and their correlation with iron status indicators in healthy children aged 0.5-3 y. *Pediatr Res* 2014; 76:409-414.

84. Cangemi G, Pistorio A, Miano M, Gattorno M, Aquila M, Bicocchi MP, Gastaldi R, Riccardi F, Gatti C, Fioredda F, Calvillo M, Melioli G, Martini A, Dufour C. Diagnostic potential of hepcidin testing in pediatrics. *Eur J Haematol* 2013; 90:323-330.
85. Girelli D, Nemeth E, Swinkels DW. Hepcidin in the diagnosis of iron disorders. *Blood* 2016; 127:2809-2813. 77. Pietrangelo A. Ferroportin disease: pathogenesis, diagnosis and treatment. *Haematologica* 2017; 102:1972-1984.
86. Arezes J, Nemeth E. Hepcidin and iron disorders: new biology and clinical approaches. *Int J Lab Hematol* 2015; 37(Suppl 1):92-98.
87. Hashizume M, Uchiyama Y, Horai N, Tomosugi N, Mihara M. Tocilizumab, a humanized anti-interleukin-6 receptor antibody, improved anemia in monkey arthritis by suppressing IL-6-induced hepcidin production. *Rheumatol Int* 2010; 30:917-923.
88. Suzuki S, Nakano S, Ando S, Matsudaira R, Kanai Y, Yamanaka K, Takasaki Y. Hepcidin-25 gives an indication of the therapeutic effectiveness of tocilizumab in rheumatoid arthritis - Relationship between disease activity of rheumatoid arthritis and anemia. *Rev Bras Reumatol Engl Ed* 2017; 57:637-640.
89. Orkin SH, Fisher DE, Look AT, et al. Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood, 7th edition, Saunders Elsevier, Philadelphia, 2009.
90. Punnonen K, Irjala K, Rajamäki A. Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency. *Blood* 1997; 89:1052-1057.
91. Karaskova E, Volejnikova J, Holub D, Velganova-Veghova M, Sulovska L, Mihal V, Horvathova M, Pospisilova D. Hepcidin in newly diagnosed inflammatory bowel disease in children. *J Paediatr Child Health* 2018; 54:1362-1367.
92. Oustamanolakis P, Koutroubakis IE, Messaritakis I, Malliaraki N, Sfiridaki A, Kouroumalis EA. Serum hepcidin and prohepcidin concentrations in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011; 23:262-268.

93. Mecklenburg I, Reznik D, Fasler-Kan E, Drewe J, Beglinger C, Hruz P; Swiss IBD Cohort Study Group. Serum hepcidin concentrations correlate with ferritin in patients with inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* 2014; 8:1392-1397.
94. Semrin G, Fishman DS, Bousvaros A, Zholudev A, Saunders AC, Correia CE, Nemeth E, Grand RJ, Weinstein DA. Impaired intestinal iron absorption in Crohn's disease correlates with disease activity and markers of inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12:1101-1106.
95. Martinelli M, Strisciuglio C, Alessandrella A, Rossi F, Auricchio R, Campostrini N, Girelli D, Nobili B, Staiano A, Perrotta S, Miele E. Serum hepcidin and iron absorption in paediatric inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* 2016; 10:566-574.
96. Houda J, Džubák P, Karásková E, Holub D, Vydra D, Mlčúchová D, Hajdúch M, Pozler O, Pospíšilová D. The incidence of anaemia and the use of the ELISA method for measuring hepcidin levels in children with inflammatory bowel disease. *Ces-slov Pediat* 2014; 69:137-147.
97. Basseri RJ, Nemeth E, Vassilaki ME, Basseri B, Enayati P, Shaye O, Bourikas LA, Ganz T, Papadakis KA. Hepcidin is a key mediator of anemia of inflammation in Crohn's disease. *J Crohns Colitis* 2013; 7:e286-e291.
98. Ceresa IF, Noris P, Ambaglio C, Pecci A, Balduini CL. Thrombopoietin is not uniquely responsible for thrombocytosis in inflammatory disorders. *Platelets* 2007;18:579-82.
99. Rogler G, Vavricka S. Anemia in inflammatory bowel disease: an under-estimated problem? *Front Med (Lausanne)* 2015; 1:58.
100. Arnold J, Sangwaiya A, Bhatkal B, Geoghegan F, Busbridge M. Hepcidin and inflammatory bowel disease: dual role in host defence and iron homoeostasis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009; 21:425-429.



101. Paköz ZB, Çekiç C, Arabul M, Sarıtaş Yüksel E, İpek S, Vatanserver S, Ünsal B. An evaluation of the correlation between hepcidin serum levels and disease activity in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Res Pract* 2015; 2015:810942.
102. Song SN, Iwahashi M, Tomosugi N, Uno K, Yamana J, Yamana S, Isobe T, Ito H, Kawabata H, Yoshizaki K. Comparative evaluation of the effects of treatment with tocilizumab and TNF- $\alpha$  inhibitors on serum hepcidin, anemia response and disease activity in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther* 2013;15:R141.
103. Bergamaschi G, Di Sabatino A, Albertini R, Ardizzone S, Biancheri P, Bonetti E, Cassinotti A, Cazzola P, Markopoulos K, Massari A, Rosti V, Porro GB, Corazza GR. Prevalence and pathogenesis of anemia in inflammatory bowel disease. Influence of anti-tumor necrosis factor-alpha treatment. *Haematologica* 2010; 95:199-205.
104. Atkinson MA, Leonard MB, Herskovitz R, Baldassano RN, Denburg MR. Changes in Hepcidin and Hemoglobin After Anti-TNF-alpha Therapy in Children and Adolescents With Crohn Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2018; 66:90-94.
105. Oustamanolakis P, Koutroubakis IE, Messaritakis I, Niniraki M, Kouroumalis EA. Soluble transferrin receptor-ferritin index in the evaluation of anemia in inflammatory bowel disease: a case-control study. *Ann Gastroenterol* 2011; 24:108-114.
106. Zimmermann MB, Troesch B, Biebinger R, Egli I, Zeder C, Hurrell RF. Plasma hepcidin is a modest predictor of dietary iron bioavailability in humans, whereas oral iron loading, measured by stable-isotope appearance curves, increases plasma hepcidin. *Am J Clin Nutr* 2009; 90:1280-1287.
107. Levine A, Griffiths A, Markowitz J, Wilson DC, Turner D, Russell RK, Fell J, Ruemmele FM, Walters T, Sherlock M, Dubinsky M, Hyams JS. Pediatric modification of the Montreal classification for inflammatory bowel disease: the Paris classification. *Inflamm Bowel Dis* 2011; 17:1314-1321.

108. Cavallaro F, Duca L, Pisani LF, Rigolini R, Spina L, Tontini GE, Munizio N, Costa E, Cappellini MD, Vecchi M, Pastorelli L. Anti-TNF-Mediated Modulation of Prohepcidin Improves Iron Availability in Inflammatory Bowel Disease, in an IL-6-Mediated Fashion. *Can J Gastroenterol Hepatol* 2017; 2017:6843976.

#### 4. SEZNAM ZKRATEK

<b>ACD</b>	Anaemia of chronic diseases, anémie chronických chorob
<b>ANCA</b>	Anti Neutrophil Cytoplasmic Antibodies
<b>ASCA</b>	Anti <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> Antibodies
<b>ATG16L1</b>	Autophagy-related 16-like 1 gene
<b>BMP-6</b>	Bone Morphogenic Protein-6
<b>Ca</b>	Calcium, vápník
<b>CD</b>	Crohn's disease, Crohnova choroba
<b>CRP</b>	C-reaktivní protein
<b>DCYT-B</b>	Duodenal cytochrome B
<b>DMT1</b>	Divalent metal transporter 1
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina
<b>ECCO</b>	European Crohn's and Colitis Organisation
<b>EEV</b>	exkluzivní enterální výživa
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked immunosorbent assay
<b>ERFE</b>	Erythroferone
<b>ESA</b>	Erythropoetin stimulating agents, erytropoézu stimulující látky
<b>ESPHGAN</b>	The European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition
<b>FC</b>	Faecal calprotectin, kalprotektin ve stolici
<b>Fe</b>	Ferrum, železo
<b>FID</b>	Functional iron deficiency
<b>fl</b>	femtolitr
<b>FW</b>	Farhaeus a Westergren, sedimentace erytrocytů
<b>g/l</b>	gram na litr
<b>H</b>	Hydrogen, vodík
<b>HAMP</b>	Hepcidin antimicrobial peptide
<b>HC</b>	Healthy controls, zdravé kontroly
<b>HCP-1</b>	Heme carrier protein-1
<b>HFE</b>	Hereditary hemochromatotic protein
<b>HH</b>	hereditární hemochromatóza
<b>HJV</b>	hemojuvelin
<b>HLA</b>	Human Leucocyte Antigen

<b>HO</b>	Heme-oxygenase
<b>IBD</b>	Inflammatory bowel disease, nespecifický střevní zánět
<b>IBD-U</b>	Inflammatory bowel disease-unclassified, neklasifikovatelná IBD
<b>IDA</b>	Iron deficiency anaemia, sideropenická anémie
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	interleukin-1 $\beta$
<b>IL-6</b>	interleukin-6
<b>IRE</b>	Iron responsive elements
<b>IRIDA</b>	Iron-refractory iron-deficient anaemia
<b>IRP</b>	Iron regulatory protein
<b>JAK/STAT</b>	Janus kinase / signal transducer and activator of transcription 3
<b>KS</b>	kortikosteroidy
<b>LC-MS/MS</b>	Liquid chromatography- tandem-mass-spectrometry
<b>MALDI TOF-MS</b>	Matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
<b>MCV</b>	Mean cell volume, střední objem erytrocytů
<b>MHC</b>	Major histocompatibility complex
<b>MHs</b>	Minihepcidins, minihepcidiny
<b>mRNA</b>	messenger RNA
<b>MT-2</b>	maltriptáza-2
<b>ng/l</b>	nanogram na litr
<b>NGAL</b>	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
<b>NIDA</b>	Non-iron deficiency anaemia
<b>NOD2</b>	Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2
<b>NSAIDs</b>	Non-steroidal anti-inflammatory drugs
<b>NTBI</b>	Non Transferin Bound Iron, volné železo bez vazby na transferin
<b>O</b>	Oxygen, kyslík
<b>PCDAI</b>	Paediatric Crohn's Disease Activity Index
<b>pg</b>	pikogram
<b>pIBD</b>	Paediatric inflammatory bowel disease, nespecifický střevní zánět u dětí
<b>PUCAI</b>	Paediatric Ulcerative Colitis Activity
<b>RetHb</b>	Index koncentrace hemoglobinu v retikulocytech

<b>RNA</b>	Ribonucleic acid, ribonukleová kyselina
<b>SELDI TOF-MS</b>	Surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
<b>SES-CD</b>	Simple endoscopic score for Crohn's disease
<b>SMAD</b>	Small Mother Against Decapentaplegic
<b>STEAP3</b>	Six-transmembrane epithelial antigen of prostate 3
<b>sTfR</b>	Soluble transferrin receptors, solubilní transferinové receptory
<b>TfR2</b>	Transferinový receptor 2
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming growth faktor- $\beta$
<b>TMPRSS6</b>	Transmembrane protease serin-6
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor necrosis factor- $\alpha$
<b>TSAT</b>	saturace transferinu
<b>UC</b>	Ulcerative colitis, ulcerózní kolitida
<b>ZIP14</b>	Zrt- and Irt-like protein 14
<b><math>\mu\text{g/g}</math></b>	mikrogram na gram
<b><math>\mu\text{g/l}</math></b>	mikrogram na litr
<b><math>\mu\text{mol/l}</math></b>	mikromol na litr
<b>%HYPO</b>	procento hypochromních erytrocytů

## 5. SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ

**Obrázek 1.** Incidence nespecifických střevních zánětů u dětí celosvětově. Se souhlasem autora převzato z [3].

**Obrázek 2.** Příklady endoskopických nálezů při těžké formě Crohnovy choroby.

**Obrázek 3.** Komplikace Crohnovy choroby: stenóza v ileocekální oblasti.

**Obrázek 4.** Příklady endoskopických nálezů při ulcerózní kolitidě.

**Obrázek 5.** Obraz pozánětlivé pseudopolyózy střeva jako forma „hojení“ ulcerózní kolitidy.

**Obrázek 6.** Rozhodovací algoritmus k rozdělení nespecifických střevních zánětů do jednotlivých podtříd (ulcerózní kolitida, kolonická forma Crohnovy choroby, neklasifikovatelný nespecifický střevní zánět). Upraveno podle [29].

**Obrázek 7.** Stav po totální proktokolektomii s modelací ileo-pouch-anální anastomózy při těžké ulcerózní kolitidě. Na obou obrázcích jsou endoskopické nálezy přívodného i slepého raménka rezervoáru (pouche) a septa mezi nimi.

**Obrázek 8.** Mechanismus transportu železa přes feroportinový transmembránový přenašeč železa z enterocyty, hepatocyty a makrofágu a inhibice tohoto přenašeče hepcidinem. Upraveno podle [69].

**Obrázek 9.** Zjednodušené schéma syntézy hepcidinu a jeho působení na feroportin během zánětu a při deficitu železa.

**Obrázek 10.** Schéma regulace syntézy hepcidinu. Upraveno podle [64].

**Obrázek 11.** Hladiny hepcidinu u dětí s Crohnovou chorobou (CD), ulcerózní kolitidou (UC) a zdravými kontrolami (HC). Převzato z [91].

**Obrázek 12.** Výskyt jednotlivých typů anémie u pacientů s Crohnovou chorobou (CD a ulcerózní kolitidou (UC). Převzato z [91].

**Obrázek 13.** Hladiny hepcidinu (ng/ml) v jednotlivých skupinách v době diagnózy (baseline) a na konci sledování (follow-up).

**Tabulka 1.** Incidence nespecifických střevních zánětů u dětí podle kontinentů a regionů. Převzato a upraveno podle [3].

**Tabulka 2.** Systém diferenciální diagnostiky nespecifického střevního zánětu u dětí podle jednotlivých znaků (pIBD classes features). Upraveno podle [29].

**Tabulka 3.** Pediatrický index Crohnovy choroby (PCDAI). [27].

**Tabulka 4.** Pediatrický index ulcerózní kolitidy (PUCAI) [27].

**Tabulka 5.** Příčiny anémie bez deficitu železa (NIDA) podle četnosti výskytu. Převzato z [43].

**Tabulka 6.** Cut-off hladiny hemoglobinu a hematokritu používané k definování anémie. Převzato a upraveno podle [43].

**Tabulka 7.** Diagnostika deficitu železa. Převzato a upraveno podle [45].

**Tabulka 8.** Klinické a laboratorní parametry u dětí s nespecifickým střevním zánětem (IBD) v době diagnózy. Převzato z [91].

**Tabulka 9.** Univariační korelační analýza mezi hepcidinem a klinickými a laboratorními parametry u dětí s nespecifickým střevním zánětem v době diagnózy. Převzato z [91].

**Tabulka 10.** Multivariační regresní analýza vztahu mezi sérovým hepcidinem jako závislou veličinou a korelujícími parametry jako nezávislými prediktory. Převzato z [91].

**Tabulka 11.** Demografické a klinické parametry u dětí s nespecifickým střevním zánětem (IBD) v době diagnózy (baseline) a na konci sledování (follow-up).

**Tabulka 12.** Rozsah postižení trávicího traktu podle Pařížské klasifikace [107] v době diagnózy a spektrum dlouhodobé udržovací protizánětlivé léčby v jednotlivých skupinách.

**Tabulka 13.** Prevalence anémie, indexy aktivity choroby, parametry zánětu a metabolismu železa v době diagnózy (baseline) a na konci sledování (follow-up).

**Tabulka 14.** Korelace rozdílu v hladinách hepcidinu během sledování ( $\Delta$  hepcidin) s rozdíly ostatních parametrů.

**Tabulka 15.** Porovnání jednotlivých parametrů u pacientů s CD, kteří nebyli léčeni biologickou léčbou oproti těm s biologickou léčbou.



## 6. SEZNAM PUBLIKACÍ A PŘEDNÁŠEK AUTORA

### 6.1. Publikace a přednášky související s dizertační prací

#### Původní vědecké publikace in extenso v daném oboru uveřejněné v časopisech s IF

**Karaskova E**, Volejnikova J, Holub D, Velganova-Veghova M, Sulovska L, Mihal V, Horvathova M, Pospisilova D. Hepcidin in newly diagnosed inflammatory bowel disease in children. J Paediatr Child Health 2018; 54:1362-1367. **IF 1,449**

#### Původní vědecké publikace in extenso uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

Houda J, Džubák P, **Karásková E**, Holub D, Vydra D, Mlčúchová D, Hajdúch M, Pozler O, Pospíšilová D. Výskyt anémie a význam měření hladiny hepcidinu metodou ELISA u dětí s nespecifickými střevními záněty. Čes-slov Pediat 2014; 69:137-147.

#### Přehledné/souborné vědecké práce v daném oboru uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

**Karásková E**, Pospíšilová D, Horváthová M, Velgáňová-Véghová M, Špenerová M, Geryk M. Anémie u dětí s nespecifickým střevním zánětem. Čes-slov Pediat 2019, článek přijat k tisku.

#### Publikovaná abstrakta

**Karásková E**, Pospíšilová D, Velgáňová-Véghová M. Hladiny hepcidinu u dětí s nespecifickým střevním zánětem v době diagnózy. Pracovní dny dětské gastroenterologie, hepatologie a výživy. 1.-3.10.2015, Ostravice, Sborník abstrakt, s. 6.

**Karaskova E.** Hepcidin in newly diagnosed inflammatory bowel disease in children. *J Pediatr Gastroent Nutr* 2017; 64 (Suppl.1): 494.

**Karaskova E,** Volejníková J, Velganova-Veghova M, Sulovska L, Pospisilova D, Mihal V, Holub D, Horvathova M. Hepcidin in newly diagnosed inflammatory bowel diseases in children. *Pediatric Care* 2018; 8:15.

Přednášky a postery přednesené na veřejných odborných fórech

**Karásková E,** Pospíšilová D, Velgáňová-Véghová M. Hladiny hepcidinu u dětí s nespecifickým střevním zánětem v době diagnózy. Pracovní dny dětské gastroenterologie, hepatologie a výživy. 1.-3.10.2015, Ostravice. (přednáška).

**Karaskova E.** Hepcidin in newly diagnosed inflammatory bowel disease in children. 50<sup>th</sup> ESPGHAN Annual meeting. 10.-13.5.2017, Prague. (poster).

**Karaskova E,** Volejníková J, Velganova-Veghova M, Sulovska L, Pospisilova D, Mihal V, Holub D, Horvathova M. Hepcidin in newly diagnosed inflammatory bowel diseases in children. 23<sup>rd</sup> Annual Congress on Pediatrics and Neonatology, 5.-6.11.2018, Bangkok, Thajsko. (přednáška).

## 6.2. Publikace a přednášky ostatní

### Původní vědecké publikace in extenso v daném oboru uveřejněné v časopisech s IF

Jelenova D, Ociskova M, Prasko J, Hunkova M, **Karaskova E**, Kolarova J, Vydra D, Mihal V. Heart rate variability in children with inflammatory bowel diseases. *Neuro Endocrinol Lett* 2015; 36:72-79. **IF 0,946**

Jelenova D, Prasko J, Ociskova M, **Karaskova E**, Hunkova M, Kolarova J, Vydra D, Holubova M, Hruby R, Latalova K, Mihal V. Quality of life in adolescents with inflammatory bowel disease and their parents-comparison with healthy controls. *Neuro Endocrinol Lett* 2015; 36:787-792. **IF 0,946**

Jelenova D, Prasko J, Ociskova M, Latalova K, **Karaskova E**, Hruby R, Kamaradova D, Mihal V. Quality of life and parental styles assessed by adolescents suffering from inflammatory bowel diseases and their parents. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2016; 12:665–672. **IF 2,198**

Smolka V, **Karaskova E**, Tkachyk O, Aiglova K, Ehrmann J, Michalkova K, Konecny M, Volejnikova J. Long-term follow-up of children and adolescents with primary sclerosing cholangitis and autoimmune sclerosing cholangitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2016; 15:412-418. **IF 1,649**

Zmeskalova D, Prasko J, Holubova M, **Karaskova E**, Marackova M, Slepecky M, Grambal A, Volejnikova J, Mihal V, Latalova K. Unmet psychosocial needs in adolescents with inflammatory bowel disease. *Neuro Endocrinol Lett* 2016; 37:395-402. **IF 0,918**

Stýblová J, Kalousová J, Adamcová M, Bajerová K, Bronský J, **Karásková E**, Keslová P, Melek J, Pozler O, Sebroň V, Šuláková A, Tejnická J, Tláskal P, Tomášek L, Vlková B, Szitányi P; Czech Home Parenteral Nutrition Group of the Society of Clinical Nutrition and Intensive Metabolic Care. Paediatric Home Parenteral Nutrition in the Czech Republic and Its

Development: Multicentre Retrospective Study 1995-2011. Ann Nutr Metab 2017; 71:99-106.

**IF 3,051**

Přehledné/souborné vědecké práce v daném oboru uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

**Karásková E**, Vydra D, Smolka V, Véghová-Velgáňová M, Tkachyk O, Ťoukálková L, Mihál V. Refeeding syndrom v dětském věku. Čes-slov Pediat 2014; 69:363-369.

**Karásková E**. Výlučná enterální výživa – léčba první volby Crohnovy choroby u dětí. Gastroent Hepatol 2015; 69:531–535.

**Karásková E**, Praško J, Jelenová D, Kolářová J, Hunková M, Ocisková M, Mihál V. Psychosociální aspekty nespecifických střevních zánětů u dětí. Čes-slov Pediat 2016; 71:111–115.

**Karásková E**. Umělá mléčná kojenecká výživa-současná doporučení. Prakt lékáren 2016; 12:186–189.

Jelenova D, Prasko J, Ociskova M, **Karaskova E**, Kolarova J, Hunkova M, Vydra D, Mihál V. Psychoeducation of adolescents with inflammatory bowel diseases and their families. Act Nerv Super Rediviva 2016; 58:33-39.

**Karásková E**. Umělá mléčná kojenecká výživa-současná doporučení. Pediatr praxi 2017; 18:26-30. (převzato z *Prakt lékáren* 2016; 12:186–189.)

**Karásková E**. Role synbiotik v managementu léčby alergie na bílkovinu kravského mléka kojenců: Mohou pre/probatika napomoci v léčbě? Pediatr Praxi 2017; 18:249-251.

Bronský J, Beránková K, Černá Z, Čopová I, Duricová D, Durilová D, Hradský O, **Karásková E**, Mitrová K, Nevoral J, Poš L, Schwarz J, Szitányi P, Skába R, Šuláková A, Tuková J. Doporučení Pracovní skupiny dětské gastroenterologie a výživy ČPS pro

diagnostiku a léčbu nespecifických střevních zánětů u dětí - doplněk k 1. vydání. Gastroent Hepatol 2017; 71:11-18.

#### Kapitoly v monografiích

**Karásková E.** Celiakie in Zadražil J, Horák P, Karásek D a kolektiv: Moderní farmakoterapie autoimunitních chorob. Maxdorf 2015.

**Karásková E.** Komplikace parenterální výživy in Szitanyi P a kol. Parenterální výživa u dětí. Maxdorf 2019 - v tisku.

#### Publikovaná abstrakta

**Karaskova E,** Vydra D Veghova-Velganova M, Smolka V, Klaskova E, Michalkova K. Posterior reversible encephalopathy syndrome (PRES) as a side effect of biological treatment of IBD in children. J Crohns Colitis 2014; 8(Suppl.2):S427-S428.

**Karásková E,** Praško J, Mihál V, Véghová-Velgáňová M, Kolářová J, Jelenová D, Ocisková M, Hunková M. Psychosociální aspekty nespecifických střevních zánětů u dětí. Gastroenterol prax 2016; 15(Suppl.1):11.

**Karaskova E,** Veghova-Velganova M. Giant postinflammatory polyposis as a result of „healing“ of ulcerative colitis in 13-year-old girl. J Pediat Gastroent Nutr 2017; 65(Suppl.1):S64.

**Karaskova E,** Prasko J. Psychosocial aspects of inflammatory bowel disease in children. J Pediat Gastroent Nutr 2018; 66(Suppl.2):544.

#### Přednášky a postery přednesené na veřejných odborných fórech

**Karaskova E,** Vydra D Veghova-Velganova M, Smolka V, Klaskova E, Michalkova K. Posterior reversible encephalopathy syndrome (PRES) as a side effect of biological treatment

of IBD in children, The 3<sup>rd</sup> PIBD symposium, 10. - 13. 9. 2014, Rotterdam, Nizozemsko.  
(poster)

**Karášková E, Velgáňová-Véghová M.** Neobvyklé zhojení ulcerózní kolitidy. Pracovní dny dětské gastroenterologie a výživy, 9. - 11. 10. 2014, Český Krumlov. (přednáška)

**Karášková E.** Průběh Crohnovy choroby, rizikové faktory, terapeutické postupy. Pracovní dny dětské gastroenterologie a výživy, 9. - 11. 10. 2014, Český Krumlov. (přednáška)

**Karášková E, Velgáňová-Véghová M, Vydra D.** Co dál při striktuře sigmatu? Jak jsme na tom po operaci? IV. symposium dětských IBD kazuistik, 13. - 14. 5. 2015, Bořetice. (přednáška)

**Karášková E.** Neobvyklé zhojení ulcerózní kolitidy. III. Symposium pediatriů a dětských sester „kazuistiky napříč pediatrií“, 13. 6. 2015, Olomouc. (přednáška)

**Karášková E, Velgáňová-Véghová M.** Role úplné enterální výživy v léčbě Crohnovy choroby u dětí. IV. Prostějovský pediatrický den, 21.11.2015, Prostějov. (přednáška)

**Karášková E.** Primární sklerozující cholangitida a nespecifický střevní zánět. V. symposium dětských IBD kazuistik, 12. 5. 2016, Bořetice. (přednáška)

**Karášková E.** Celiakie-nový pohled. Kongres pediatriů a dětských sester - XXXIII. Dny praktické a nemocniční pediatrie. 13.-14.5.2016, Olomouc. (přednáška)

**Karášková E, Zapletalová J.** Zástava růstu jako příznak dvou diagnóz. IV. symposium pediatriů a dětských sester „Kazuistiky napříč pediatrií“ 11. 6. 2016, Olomouc. (přednáška)

**Karášková E, Praško J, Mihál V, Véghová-Velgáňová M, Kolářová J, Jelenová D, Ocisková M, Hunková M.** Psychosociální aspekty nespecifických střevních zánětů u dětí. Psychosociální aspekty nespecifických střevních zánětů u dětí. VI. Kongres slovenských a českých pediatrických gastroenterológov, 23.-24.9.2016, Nitra, Slovenská republika. (přednáška)

**Karásková E, Velgáňová-Véghová M.** Co jsme zjistili o našich IBD dětech a jejich rodičích? V. prostějovský pediatrický den, 12.11.2016, Prostějov. (přednáška)

**Karásková E.** Role prebiotik a probiotik v managementu ABKM. III. pediatrický master kurz, 31.3.-1.4.2017, Brno. (přednáška)

**Karásková E.** Akutní průjmová onemocnění pohledem pediatra. Konference ANGIS, 7.-8.4.2017 Olomouc. (přednáška)

**Karásková E, Velgáňová-Véghová M, Špenerová M.** Celiakie v rodině. V. sympozium pediatričů a dětských sester „Kazuistiky napříč pediatrií“ 10. 6. 2017, Olomouc. (přednáška)

**Karaskova E, Veghova-Velganova M.** Giant postinflammatory polyposis as a result of „healing“ of ulcerative colitis in 13-year-old girl. 4<sup>th</sup> International Symposium on Pediatric Inflammatory Bowel Disease, 13.-16.9.2017, Barcelona, Španělsko. (poster)

**Karásková E.** Chronická a recidivující pankreatitida. Pracovní dny dětské gastroenterologie a výživy, 6.-7.10.2017, Třemošnice. (přednáška)

**Karásková E.** Polknutí cizího tělesa u dětí, doporučený postup. VI. Prostějovský pediatrický den, 11.11.2017, Prostějov. (přednáška)

**Karásková E, Velgáňová-Véghová M.** Doporučený postup diagnostiky a léčby infekce *Helicobacter pylori* u dětí. Odborný seminář Dětské kliniky LF UP Olomouc, 15.11.2017, Olomouc. (přednáška)

**Karásková E.** Sondová výživa u dětí. 15. sympozium Aktuality v dětské intenzivní péči, 30.-31.1.2018, Ostrava. (přednáška)

**Karásková E.** Sondová enterální výživa - indikace, vlastnosti a technické aspekty. IV. pediatrický master kurz. 2.-3.2.2018, Martin, Slovenská republika. (přednáška)

**Karásková E.** Praktický přístup k sondové enterální výživě. Pediatrický master kurz 23.-24.2.2018, Praha. (přednáška)

**Karášková E.** Chirurgie IBD u dětí pohledem gastroenterologa. Odborný seminář Dětské kliniky LF UP Olomouc, 21.3.2018, Olomouc. (přednáška)

**Karaskova E,** Prasko J. Psychosocial aspects of inflammatory bowel disease in children. Kongres ESPGHAN 51<sup>th</sup> Annual meeting, 9.-12.5.2018, Ženeva, Švýcarsko. (poster)

**Karášková E.** Ambulantní řešení ulcerózní kolitidy. Dny dětských IBD, 26.-28.5.2018, Kurdějov. (přednáška)

**Karášková E.** *Helicobacter pylori*, nová doporučení, kazuistika. VI. symposium pediatriů a dětských sester „Kazuistiky napříč pediatrií“. 2.6.2018, Olomouc. (přednáška)

**Karášková E,** Velgáňová-Véghová M, Špenerová M. *Helicobacter pylori* a anémie - kazuistika, Pracovní dny dětské gastroenterologie a výživy, 4.-6.10.2018, Telč. (přednáška)

**Karášková E,** Velgáňová-Véghová M. Domácí parenterální výživa – naše zkušenosti, XX. Prešovské pediatrické dni, 6.-7.12.2018, Prešov, Slovenská republika. (přednáška)



## 7. PŘÍLOHY

### Kopie článků se vztahem k dizertační práci

**Karaskova E**, Volejnikova J, Holub D, Velganova-Veghova M, Sulovska L, Mihal V, Horvathova M, Pospisilova D. Hepcidin in newly diagnosed inflammatory bowel disease in children. *J Paediatr Child Health* 2018; 54:1362-1367. **IF 1,449**

Houda J, Džubák P, **Karásková E**, Holub D, Vydra D, Mlčúchová D, Hajdúch M, Pozler O, Pospíšilová D. Výskyt anémie a význam měření hladiny hepcidinu metodou ELISA u dětí s nespecifickými střevními záněty. *Čes-slov Pediat* 2014; 69:137-147.

**Karásková E**, Pospíšilová D, Horváthová M, Velgáňová-Véghová M, Špenerová M, Geryk M. Anémie u dětí s nespecifickým střevním zánětem. *Čes-slov Pediat* 2019, článek přijat k tisku.