

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Ústav klinické biochemie a patobiochemie

β -TALASEMIE. INDIKACE A INTERPRETACE

LABORATORNÍCH VYŠETŘENÍ

Bakalářská práce

Autor: Klára Jindráková

Praha 2007

Školitel: Prof. MUDr. Richard Průša, CSc

PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně. Veškerou použitou literaturu a podkladové materiály uvádím v příloženém seznamu literatury.

V Praze dne 19. 3. 2007



Podpis

PODĚKOVÁNÍ:

Velice děkuji svému vedoucímu práce panu profesorovi Průšovi za čas, který věnoval mým konzultacím a za jeho návrhy a připomínky. Rovněž bych ráda poděkovala paní primářce Hochové z oddělení klinické hematologie FN Motol za oponenturu mé práce. Zvláštní poděkování patří laborantce paní Fořtové z hematologického oddělení a laborantkám z ÚKBP za pomoc při sběru podkladů pro tuto práci.

Obsah:

Úvod	1
1 Přehled současného stavu znalostí (teoretický úvod)	2
1.1 Hemoglobin	2
1.2 β -talasemie	4
1.3 Incidence a prevalence talasemie	6
1.4 Laboratorní diagnostika	7
1.4.1 Krevní obraz	7
1.4.2 Doplnující biochemické vyšetření	11
1.4.3 Elektroforéza	14
1.4.4 HPLC	15
1.4.5 DNA analýza	15
2 Cíl práce	16
3 Metody	17
3.1 Soubor pacientů	17
3.2 Vyšetření HbA ₂ pomocí HPLC	17
3.2.1 Kolona s chromatografickým materiálem	18
3.2.2 Zařízení pro dávkování a nástřik vzorku	18
3.2.3 Čerpadlo a rezervoár na mobilní fázi	19
3.2.4 Gradientový mixér	19

3.2.5	Detektor.....	19
3.2.6	Výstup analyzovaných dat	19
3.2.7	Stanovení HbA ₂ a HbF na automatickém chromatografickém analyzátoru Tosoh HLC-723 G7.....	19
3.3	Statistika.....	22
4	Výsledky	23
5	Diskuze.....	25
6	Závěr	29
7	Souhrn / Summary	32
	SEZNAM LITERATURY.....	i
	Seznam obrázků a tabulek.....	iv
	Příloha 1 – Naměřené hodnoty	P1-1
	Příloha 2 – Posouzení přetížení železem.....	P2-1
	Příloha 3 – Chromatogramy	P3-1

ZKRATKY A SYMBOLY

% - procento

$\mu\text{g/l}$ – mikrogram na litr

$\mu\text{g/L}$ – mikrogram na litr

μl – mikrolitr

μm – mikrometr

$\mu\text{mol/l}$ – mikromol na litr

AMK – aminokyselina

cel. – celkový

cm – centimetr

ČR – Česká Republika

DFO – deferoxamine

DFP – deferiprone

DNA – deoxyribonucleotid acid (deoxyribonukleová kyselina)

EDTA - ethylendiamintetraacetát (ethylendiamintetraoctová kyselina)

ELFO – elektroforéza

ery – erytrocyt

Fe^{2+} - železnatý kation

Fe^{3+} - železitý kation

fl - femtolitr

FN Motol – fakultní nemocnice Motol

g/dl – gram na decilitr

g/l – gram na litr

Hb – hemoglobin

Hb A – hemoglobin dospělých (adult)

Hb F – hemoglobin fetální (fetus)

HbA1C – glykovaný hemoglobin

HbC – varianta hemoglobinu

HbD – varianta hemoglobinu

HbH – varianta hemoglobinu

HbS – varianta hemoglobinu

HCl – kyselina chlorovodíková

HCT – hematokrit

HIV – human immunodeficiency virus

hod – hodina

HPLC – High Performance Liquid Chromatography (vysoce účinná kapalinová chromatografie)

KO – krevní obraz

kon. - konjugovaný

LVEF – Left Ventricular Ejection Fraction (levá komorová ejekční frakce)

MCV – mean cell volume (střední objem erytrocytu)

měs. – měsíc

mg – miligram

mg/kg – miligram na kilogram

mg/kg/den – miligram na kilogram za den

MCH – mean cell hemoglobin (střední množství hemoglobinu v erytrocytu)

MCHC – mean cell hemoglobin concentration (střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytu)

ml – mililitr

mm – milimetr

MPa – mega pascal

MPV – mean platelet volume (střední objem destičky)

MRI – Magnetic Resonance Imaging (magnetická resonance)

např. – například

nm – nanometr

°C – stupeň Celsia

pg – pikogram

PLT – platelets (krevní destičky)

RBC – red blood cell (červená krvinka)

RDW – red cell distribution width (distribuční objem erytrocytu)

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism (polymorfismus délky restrikčních fragmentů)

RNA – ribonucleotid acid (ribonukleová kyselina)

rtg – rentgen

SQUID – Superconducting Quantum Interference Device

SR – Slovenská Republika

týd. – týden

tzn. – to znamená

tzv. – tak zvaně

ÚKBP – Ústav klinické biochemie a patobiochemie

USA – United States of America (spojené státy americké)

WBC – white blood cell (bílá krvinka)

α – alfa

β – beta

γ – gama

δ – delta

ε – epsilon

ζ – zeta

Úvod

Talasemie jsou vrozená anemická onemocnění charakterizovaná poruchou syntézy některého z globinových řetězců hemoglobinu. Charakteristickým znakem je mikrocytóza. Jsou 2 hlavní typy: α -talasemie (vzácná), zde je potlačena tvorba α globinových řetězců, a β -talasemie, u které se tvoří jen nepatrné množství β globinových řetězců, proto takto postižení jedinci mají nepatrné množství HbA₁, ale zvýšené hodnoty HbA₂ a HbF. Existuje však více typů talasemických syndromů (např. δ -talasemie, γ -talasemie a další).

β -talasemie je autozomálně recesivní onemocnění. Homozygoti nebo složení heterozygoti s mutantními β globinovými alelami jsou příčinou klinických forem: talasemie major, intermedia, minor a minima. Pacienti postižení talasemií major jsou obvykle diagnostikováni v prvním roce života a jsou závislí na transfuzích. Talasemie intermedia se diagnostikuje později a transfuze jsou zapotřebí jen občas. U talasemie minor se vyskytuje lehká anémie, talasemie minima má sotva znatelné klinické příznaky a je odhalena náhodně.

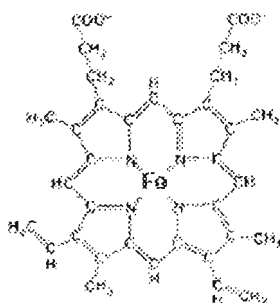
Každý globinový řetězec je řízen jednotlivým genem. Beta, gama a delta geny leží blízko u sebe na krátkém raménku chromozomu 11 (11p15.5), tvorba α globinového řetězce je podmíněna 2 geny ležícími blízko sebe na krátkém raménku chromozomu 16 (16p13.3).

Klinicky je mnohem důležitější β -talasemie. Za poruchu syntézy β globinového řetězce jsou zodpovědné vzácné delece a více než 200 mutací, ty jsou převážně bodové, typu missense (kdy je AMK nahrazena jinou AMK) i typu nonsense (AMK je nahrazena jinou AMK, která způsobí tzv. stop kodon, po kterém nemůže syntéza pokračovat). Molekulární defekty jsou příčinou proměnlivého snižování produkce β řetězce. To se pohybuje v rozmezí od minimálního snižování u velmi mírné β^+ talasemické mutace až po celkový deficit v $\beta\gamma$ mutacích. Avšak syntéza α řetězců pokračuje normálně, takže se hromadí nadbytek α řetězců. Ty urychlují prekurzory erytroidních buněk, což vede k destrukci v kostní dřeni, neúčinné erytropoéze a těžké anemii, která ještě více zvyšuje periferní hemolýzu.

1 Přehled současného stavu znalostí (teoretický úvod)

1.1 Hemoglobin

Hemoglobin (červené krevní barvivo) je tetramerní molekula, skládá se ze 4 globinových řetězců a 4 hemů.



Obrázek 1: Struktura hemoglobinu

Globin se syntetizuje v granulárním endoplazmatickém retikulu zrajících erytroblastů a představuje 96 % molekuly hemoglobinu. Poté co je při rozpadu hemoglobinu uvolněn, rozkládá se na jednotlivé AMK, které jsou organismem dále využívány pro tvorbu bílkovin.

Globinové řetězce jsou bílkoviny složené z AMK, vždy 2 a 2 řetězce jsou po chemické stránce identické. Alfa řetězec je tvořen 141 AMK. Řetězce beta, gama a delta obsahují 146 AMK a jejich sekvence je velmi podobná, liší se pouze na několika místech. Řetězec gama má odlišných 37 AMK od AMK řetězce beta. Řetězec delta má v 16. pozici globinového řetězce arginin, u beta řetězce je glycin.

Hem tvoří 4 % molekuly hemoglobinu, je syntetizován v mitochondriích erytroblastů. Základem je cyklický tetrapyrrol (protoporfyrin), který vzniká odbouráváním některých AMK. Enzymatickým působením ferrochelátázy se do tetrapyrrolu naváže čtyřmi vazbami železo a vzniká hem. Hemoglobin je tedy chromoprotein (bílkovina obsahující kov).

Hlavní funkcí hemoglobinu je přenos kyslíku do tkání. Během vývoje lidského organismu od embryonálního období do dospělosti se požadavky na způsob a množství přenosu kyslíku mění. Organismus se tomu v jednotlivých etapách vývoje přizpůsobuje tvorbou různých hemoglobinů. HbF váže aktivně méně 2,3 bifosfoglycerát než HbA, tudíž

obsahuje více kyslíku a usnadňuje tím přestup kyslíku z krevní cirkulace matky do krevní cirkulace plodu.⁸

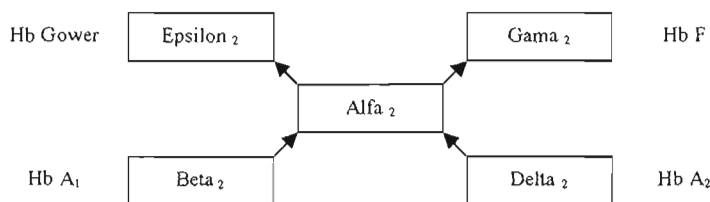
Za fyziologických podmínek má člověk 3 ontogenetická stádia hemoglobinu:

- Embryonální hemoglobin: HbGower
- Fetální hemoglobin: HbF
- Hemoglobin dospělých: HbA

Embryonální hemoglobin je nejčasnější hemoglobin vyvíjejícího se lidského plodu. Během fetálního období jsou syntetizovány embryonální hemoglobiny Hb Gower 1, Hb Gower 2 a Hb Portland. Jejich produkce vymizí po 10. týdnu, kdy jsou nahrazeny fetálním hemoglobinem. HbGower 1 má 2 řetězce zeta a 2 řetězce epsilon (ζ_2, ϵ_2), Hb Gower 2 má 2 řetězce alfa a 2 řetězce epsilon (α_2, ϵ_2), Hb Portland má 2 řetězce zeta a 2 řetězce gama (ζ_2, γ_2).

Fetální hemoglobin se vyskytuje v červených krvinkách plodu během nitroděložního života. Ještě po narození obsahují krvinky 70 – 90 % HbF a pouze 10 – 30 % HbA. Po 5. - 7. měsíci klesá jeho hladina pod 2 %. HbF obsahuje 2 řetězce alfa a 2 řetězce gama (α_2, γ_2).

Hemoglobin dospělých se skládá z nejrozšířenějšího lidského hemoglobinu HbA₁ (98 % Hb), který je tvořen 2 řetězcí alfa a 2 řetězcí beta (α_2, β_2) a z HbA₂ (1,2 - 3,5 % Hb), který je složen ze 2 řetězců alfa a 2 řetězců delta (α_2, δ_2). HbA₃ je produktem stárnutí HbA₁, kdy se na řetězce beta váže glutation.



Obrázek 2: Globinové řetězce lidského hemoglobinu

1.2 β -talasemie

β -talasemie jsou hlavně způsobeny mutacemi, které ovlivňují regulaci nebo expresi β globinového genu (uložen na krátkém raménku chromozomu 11). Méně často je toto onemocnění způsobeno delecemi.

Hlavní problém je nerovnováha v tvorbě globinových řetězců. I když jsou postiženy β řetězce, tak tvorba α řetězců zůstává zachována. To vede k precipitaci přebytečných α řetězců v erytrocytech a k poškození membrány krvinek s následnou hemolýzou.

U β^0 -talasemie (delece β globinového řetězce) je tvorba β řetězců zcela zastavena, u β^+ -talasemie (mutace v promotorové části) je tvorba tohoto řetězce pouze snížena.

β -talasemie minor (heterozygotní) je nejčastější formou a v našich podmínkách není vyjimečná. V naprosté převaze je klinicky nemá a je zachycena spíše náhodně. Pouze jeden β gen je postižen β^0 mutací nebo β^+ mutací. Z krevního obrazu je patrná výrazná mikrocytóza. Počet erytrocytů je normální nebo zvýšený. Hladina hemoglobinu je obvykle okolo 100 – 110 g/l, ale může být i v normě. V nátěrech nacházíme terčovité erytrocyty, bazofilní tečkování, polychromázií. Počet retikulocytů je lehce zvýšen. Přežívání erytrocytů označených radioaktivním chromem je normální nebo lehce zkrácené. Hladina HbA₂ je zvýšená nad 3,5 – 8 %. Hladina HbF může být lehce zvýšená nad 2 – 6 %. Setkáváme se také s lehkou hyperplazií erytropoézy se zvýšenými zásobami železa. Léčba v naprosté většině případů není nutná.¹⁸

β -talasemie intermedia. Jeden β gen má β^0 mutaci, druhý β gen má mírnou formu β^+ mutace nebo oba β geny jsou postiženi β^+ mutací. Zatížení železem není tak závažné jako u β -talasemie major. Z krevního obrazu je patrná středně těžká anémie, ale transfuze je potřebná jen vyjimečně. Hodnoty HbA₂ jsou větší než 30 % oproti normálu. HbF je menší než 70 %.⁸

β -talasemie major (homozygotní nebo dvojitě heterozygotní forma) byla poprvé popsána americkým pediatrem Thomasem Cooleyem v roce 1925. Tato forma má těžký průběh, i když jsou rozdíly podle toho, jaké alely jsou zděděny. Možnosti kombinace alel: β^0 - β^0 , β^0 - β^+ , β^+ - β^+ . Precipitující α řetězce vedou k hemolýze, což vede ke splenomegalii. Jsou-li

erytrocyty schopny syntetizovat γ řetězce, dochází ke vzniku HbF s vysokou afinitou ke kyslíku. Následná tkáňová hypoxie pak dále zvyšuje nároky na krevtvorbu. Přežití těchto jedinců je zkráceno. K úmrtí může dojít již v 1. roce života. Onemocnění je obvykle zjištěno po uplynutí prvních 4. týdnů života, asi v 6. týdnu dochází ke vzniku anémie s přítomností jaderných buněk v periferní krvi. V 8. týdnu pozorujeme splenomegalii. V pozdějším vývoji dochází k retardaci růstu, postižení sexuálního vývoje, ale i jiných endokrinních tkání (diabetes mellitus, hypoparatyroidismus, atd.). Díky vystupňované erytropoéze dochází k typickým změnám na skeletu, rozšiřuje se dřevná dutina a ztenčuje se kompaktní kost (nejčastěji se změny objeví na rukou a chodidlech). Na rtg snímku hlavy je vidět typická „kartáčovitá lebka“ (hair-on-end). Prominence lícních kostí a maxily, s relativně zanikajícím nosem a protruzí zubů horní čelisti, to je typický vzhled talasemiků (facies thalassaemica) se splenomegalii. Postupně dochází k postižení ostatních orgánových systémů. Hepatobiliární trakt, zde nejprve extramedulární hematopoéza, postupně se objevuje cirhóza. Kardiovaskulární komplikace především v souvislosti s přetížením organismu železem vznikají po první dekádě života. Na přítomné splenomegalii s podílí mimo jiné i extramedulární hematopoéza.¹⁸

Diagnostikujeme těžkou mikrocytární hypochromní anémií s hodnotami Hb pod 70 g/l se zřetelnou anizocytózou (RDW nad 15,2 %). V nátěrech je vidět poikilocytóza, četné terčovité erytrocyty, Howellova – Jollyho tělíška, bazofilní tečkování. Normoblasty v periferní krvi mohou být až v počtu 200/100 leukocytů. Retikulocyty jsou snižené v důsledku neefektivní erytropoézy. V nátěrech barvených na železo jsou přítomny četné sideroblasty. Zřetelná erytroidní hyperplazie, nápadné zmnožení sideroblastů (nad 65 %) i zásob železa (zvláště u nemocných po transfuzích). Hladina haptoglobinu v plazmě je snížena díky chronické intravaskulární hemolýze. Hodnota bilirubinu v séru je zvýšena. HbF

je zvýšen na hodnoty přesahující 30 %, HbA₂ je zvýšeno o 1 – 6 %, neboť je zvýšená tvorba γ a δ řetězců při defektní tvorbě β řetězce.

Hodnoty KO a hemoglobinů jsou u dětí odlišné, zejména do jednoho roku. Proto se talasemie definitivně diagnostikuje až po 1 roce života. Velice zkreslující výsledky mohou být patrné i u pacientů po krevní transfuzi, proto je nutné vyšetření provést až po degradaci cizích erytrocytů.

Definitivní diagnostika je molekulárně genetickými metodami, hlavně DNA analýzou, která se využívá v prenatalní diagnostice jako prevence.

Existují zatím 4 hlavní léčebné postupy – substituční léčba, odstraňování nadbytečného železa chelatačními látkami, splenektomie a perspektivní možností je transplantace kostní dřeně. Ve fázi vývoje je farmakologická reaktivnost syntézy γ a δ řetězců a metody genetického inženýrství.¹⁸

Díky různému stupni stability β globinových řetězců se vysvětlují široká škála fenotypových projevů β thalasemických mutací od bezpříznakového nosičství přes neefektivní erythropoézu u β -talasémie intermedia a major, až po hemolytickou anémii.

1.3 Incidence a prevalence talasemie

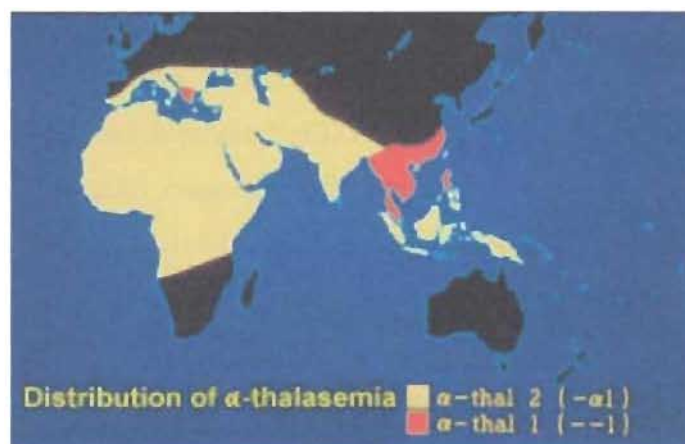
Talasemie se vyskytuje v každé populaci, ovšem nejčastěji v Jihovýchodní Asii ve státech jako jsou Vietnam, Laos, Thajsko, Singapur, Filipíny, Kambodža, Malajsie, Barma, Indonésie. Dále pak v Číně, Africe, Řecku, Itálii a na středním Východě. Incidence talasemie v celkové populaci je 0,16 %, v české populaci to činí 0,02 %. Vyšší procento nově objevených případů je v ČR u cizinců, až 3,5 %.

Prevalence u nejasných českých anemických pacientů je 11 %, u cizinců v ČR je to 30 %.

Předpokládá se, že β thalasemický gen mají 3 % populace na celém světě. Rozšířený je především v tzv. malarických oblastech (oblast Středozemního moře, Afrika a Asie). Jedinci v těchto oblastech s thalasemickým genem jsou selektivně zvýhodněni, působí ochranně proti malárii u thalasemických heterozygotů (β -talasemie minor a dvojitě heterozygotní forma β -talasemie major).

Vzácněji se talasemie objevuje v zemích Západní, Severní a Střední Evropy, zde je nejrozšířenější β -talasemie. Rozšíření do netypických oblastí výskytu je dáno hlavně migrací.

Incidence mutace IVS-I-1 (G – A) je u pacientů v ČR 46,3 %. Společně s dalšími 4 mutacemi, které se vyskytují ve Středomoří (CD 39 (C – T), IVS II-1 (G – A), IVS I-110 (G – A) a IVS II-745 (C – G)) představuje 80 % β talasemických mutací v ČR a SR. Tyto mutace k nám byly pravděpodobně importovány ze Středomoří v době naší společné historie.⁸



Obrázek 3: Výskyt α a β -talasemie ve světě

1.4 Laboratorní diagnostika

1.4.1 Krevní obraz

Patří mezi základní hematologická vyšetření. Vyšetřování krevního obrazu zavedl do praxe německý internista Josef Arnech (1873 – 1955) v roce 1904. Vyšetření mohlo vzniknout díky metodě barvení krevních buněk, kterou v roce 1877 vyvinul německý lékař Paul Ehrlich (1854 – 1915).

Součástí krve jsou krevní elementy, krevní obraz určuje jejich počet a charakter v krvi. Mezi krevní elementy řadíme WBC – bílé krvinky (leukocyty), RBC – červené krvinky (erytrocyty) a PLT – krevní destičky (trombocyty). Jejich správná funkce je nezbytná. Erytrocyty pomocí červeného krevního barviva přenášejí kyslík a oxid uhličitý. Leukocyty se podílejí na obranyschopnosti organismu před infekcí. Trombocyty se účastní zástavy krvácení a podílí se na regeneraci cév. Mezi další základní parametry krevního obrazu patří HB – množství hemoglobinu v erytrocytu, HCT – poměr erytrocytů k objemu krve, MCV – střední objem erytrocytu, RDW – distribuční objem erytrocytu, MPV – střední objem

trombocytu. Hodnocení základních měřených a vypočítaných parametrů usnadňují diagnostiku vnitřních chorob (nádory, záněty), morfologie červených krvinek vypovídá o původu anémie, změny morfologie leukocytů napomáhají při diagnostice hematologických onemocnění, lymfomů a leukémií.

Pro stanovení krevního obrazu potřebujeme tekutou, nesraženou krev. Odebírá se žilní nebo kapilární krev do zkumavky s fialovým uzávěrem (písemný kód K3E nebo K2E), pro standardní odběr je na stěnách pevné K₂EDTA nebo K₃EDTA jako protisrážlivé činidlo, při pediatrickém odběru se jako chemické aditivum používá kapalné K₃EDTA. Odebírané množství krve je podle množství EDTA s dodržением objemu krve dle výrobce. Ihned po odběru je nutné krev s EDTA dobře promíchat, je to prevence proti mikrotrombům. Optimální provedení je do 3 hodin po odběru. Vzorek se transportuje a je uchováván při pokojové teplotě (asi 20 °C), nedává se do chladničky.

1.4.1.1 Erytrocyty

Jsou to bezjaderné buňky bikonkávního tvaru o průměru $7,2 \pm 3,5 \mu\text{m}$. Vnitřek ery je vyplněn Hb.

Tabulka 1: Referenční rozmezí – fyziologické hodnoty ERYTROCYTY

	Jednotka	DĚTI						DOSPĚLÍ	
		0.-1. den	2.-30. den	1.-3. měsíc	3.měsíc -1 rok	1-5 let	5-12 let	muži	ženy
RBC	$\times 10^{12}/l$	4,1-7,0	3,8-5,3	3,5-4,5	3,5-4,5	3,8-5,2	4,2-5,4	4,5-6,3	4,2-5,4

Možné morfologické změny erytrocytů a diagnostický přínos týkající se talasemie:

- mikrocyty – ery o průměru menším než $6,7 \mu\text{m}$ a objemu pod 80 fl, výskyt: porucha syntézy hemu nebo anémie z deficitu železa
- leptocyty = terčovité ery – zřetelná redukce tloušťky ery, centrální tmavá zóna je obklopena projasněním a vlastní Hb tvoří další kruh kolem obvodu buňky, výskyt u hemolytické anémie z poruchy hemoglobinu (talasemie a hemoglobinopatie)
- poikilocyty – u těžkých forem anémií
- Howell – Jollyho tělíska – kulaté, tmavě purpurově se barvící tělíska, jsou to fragmenty jádra, nachází se po splenektomii a u perniciozní anémie

- bazofilní tečkování erytrocytů – jde o tmavě modrá granulka různé velikosti a tvaru, předpokládá se, že vznikají nahromaděním ribozomů, fyziologicky 1 – 3 bazofilně tečkované erytrocyty na 10000 erytrocytů,

1.4.1.2 Hemoglobin

Tabulka 2: Referenční rozmezí – fyziologické hodnoty HEMOGLOBIN

Jednotka	DĚTI						DOSPĚLÍ		
	0.-1. den	2.-30. den	1.-3. měsíc	3.měsíc -1 rok	1-5 let	5-12 let	muži	ženy	
Hb	g/l	140-220	110-170	100-130	100-130	110-150	120-155	140-180	120-160

Snížení hladiny hemoglobinu vede k anémii. Je třeba dát pozor na graviditu s falešně nízkými hodnotami. Vlivem hemodiluce (zředění krve zvýšením objemu tekutiny v cévách, vzniká v důsledku zadržetí většího množství tekutiny v těle) dochází od 8. týdne těhotenství k poklesu hemoglobinu průměrně na 110 g/l. Po porodu se hodnoty navrací do referenčních mezí.

1.4.1.3 Hematokrit

Je to objem červených krvinek v krvi vyjádřený jako procento celkového objemu krve.

Tabulka 3: Referenční rozmezí – fyziologické hodnoty HEMATOKRIT

Jednotka	DĚTI						DOSPĚLÍ		
	0.-1. den	2.-30. den	1.-3. měsíc	3.měsíc -1 rok	1-5 let	5-12 let	muži	ženy	
HCT	%	43-63	1-49	29-41	33-39	33-41	35-45	38-52	37-46

Je třeba dát pozor na graviditu s falešně nízkými hodnotami. Vlivem hemodiluce dochází od 8. týdne těhotenství k poklesu hematokritu průměrně na 33 %. Po porodu se hodnoty navrací k normálu do referenčních intervalů.

1.4.1.4 MCV

Zprůměrovaná hodnota objemu jednotlivých erytrocytů (vyjádřená hematokritem) proti počtu erytrocytů ve vyšetřovaném vzorku krve.

Výpočet MCV: $MCV = HCT / RBC$

Tabulka 4: Referenční rozmezí – fyziologické hodnoty MCV

	Jednotka	DĚTI						DOSPĚLÍ	
		0.-1. den	2.-30. den	1.-3. měsíc	3.měsíc -1 rok	1-5 let	5-12 let	muži	ženy
MCV	fl	90-121	80-110	75-95	70-86	71-88	75-90	82-92	82-92

MCV < 84 fl → mikrocytární anémie

MCV 84 – 98 fl → normocytární anémie

MCV > 98 (100) fl → makrocytární anémie

1.4.1.5 MCH

Zprůměrnovaná hodnota hemoglobinu v jednotlivých erythrocytech proti počtu erythrocytů ve vyšetřovaném vzorku krve.

Výpočet MCH: $MCH = Hb / RBC$

Tabulka 5: Referenční rozmezí – fyziologické hodnoty MCH

	Jednotka	DĚTI						DOSPĚLÍ	
		0.-1. den	2.-30. den	1.-3. měsíc	3.měsíc -1 rok	1-5 let	5-12let	muži	ženy
MCH	pg	31-37	28-34	25-31	24-29	25-31	25-31	27-33	27-33

1.4.1.6 MCHC

Zprůměrnovaná hodnota hemoglobinu v jednotlivých erythrocytech proti objemu erythrocytů, který zaujímají v plazmě, tj. proti hematokritu.

Výpočet MCHC: $MCHC = Hb / HCT$

Tabulka 6: Referenční rozmezí – fyziologické hodnoty MCHC

	Jednotka	DĚTI						DOSPĚLÍ	
		0.-1. den	2.-30. den	1.-3. měsíc	3.měsíc -1 rok	1-5 let	5-12 let	muži	ženy
MCHC	g/dl	30-36	29-37	30-36	30-36	30-36	32-36	32-36	32-36

MCHC = 32 – 37 g/dl → normochromní anémie

MCHC < 32 g/dl → hypochromní anémie

MCHC je relativně pozdní ukazatel hypochromie, dříve se objeví pokles MCH.

Tabulka 7: Komplexní posouzení anémie podle kvantitativních kritérií

anémie	mikrocytární hypochromní	normocytární normochromní	makrocytární normochromní
MCV (fl)	< 84	84-98	> 98 (100)
MCH (pg)	26	27-34	> 34
MCHC (g/l)	< 32	32-36	32-36

1.4.1.7 Retikulocyty

Retikulocyty se počítají v obarveném (brilant krezolová nebo methylenová modř) krevním nátěru pod mikroskopem.

Jsou to velmi mladé, nezralé erythrocyty, které obsahují ještě zbytky ribozomální RNA z cytoplazmy méně zralých buněk červené řady. Neobsahují jádro.

Určují proliferaci buněk v kostní dřeni. Snížená tvorba nebo jejich nedostatek vede ke snížení erythropoézy (útlum krvetvorby). Naopak zvýšená tvorba vede ke zvýšení erythropoézy (krvácení, hemolýza).

Tabulka 8: Referenční rozmezí – fyziologické hodnoty RETIKULOCYTY

VĚK	OBĚ POHLAVÍ									
	0-1 den	1-3 den	3-7 den	7-30den	30-45den	45-60den	60-75den	75den-3 měs.	3més.-10 let	10-99 let
RET %	3,0-7,0	1,0-3,0	0-1,0	0,2-2,0	0,3-3,5	0,4-4,8	0,3-4,2	0,3-3,6	0,2-2,8	0,5-1,5

1.4.1.8 RDW

Podle distribučního objemu ery dělíme morfologicky anémie s anizocytózou a s homogenní populací.

Fyziologická hodnota pro všechny věkové kategorie a obě pohlaví: 11,6 – 13,7 %

1.4.2 Doplnující biochemické vyšetření

1.4.2.1 Železo

Vyšetřovaným materiálem je sérum nebo plazma. Odebírá se srážlivá venózní krev do skleněné nebo plastové zkumavky bez úpravy nebo se separačním gelem (sérum). Pokud k vyšetření použijeme plazmu, tak odebíráme do skleněné nebo plastové zkumavky s heparinátem sodným jako protisrážlivým činidlem. Odběr lze provést i do speciální zkumavky (metal free plastic) nebo do skleněných speciálně umytých zkumavek. Je třeba oddělit krevní elementy a zabránit hemolýze, jinak získáme falešně pozitivní (vyšší) výsledky.

Vzhledem k cirkadiánnímu rytmu železa je vhodné provést odběr vždy ráno, kdy je hodnota o 10 – 30 % vyšší než večer (maximum 6 – 9 hod, minimum 22 – 24 hod). Odebraný materiál musí být zpracován nejpozději do 8 hodin po odběru a skladován při teplotě odběrové místnosti, což je zhruba 25 °C. Pro delší uchování je možné vzorek zmrazit (-20 °C), po rozmrazení již nemrazit.

Vyšetření ruší lipémie, oxaláty, citráty, hemolýza.

Tabulka 9: Referenční rozmezí – fyziologické hodnoty ŽELEZO

	Obě pohlaví			Muži		Ženy		
	Jednotka	0-6 týd.	6 týd.-1 rok	1-15 let	15-60 let	nad 90 let	15-60 let	nad 90 let
Fe	μmol/l	11 - 36	6 - 28	4 - 24	7,2 - 29	7 - 23	7,2 - 29	6 - 24

Hodnoty mezi 60 – 90 lety nehodnotit ani u mužů ani u žen.

Zvýšené hodnoty jsou u talasemie.

Železo se vyskytuje vždy v chelátované formě, čili vázané na bílkovinu. Průměrná denní strava obsahuje 10 – 15 mg elementárního železa, vstřebá se ovšem pouze 10 %, takže z potravy do organismu se dostane 1 – 1,5 mg železa. V žaludku se pomocí HCl redukuje na železnatý kationt (Fe^{2+}). Přestupuje do střevní sliznice velmi aktivně a rychle, pak do plazmy, kde za 2 – 4 hodiny je většina vstřebeného železa. Zásoba železa se vytváří přímo ve sliznici ve formě ferritinu, 17 – 23 % jeho hmotnosti tvoří železo. Existuje určitá rovnováha mezi erytroidními elementy v kostní dřeni, zásobami železa a jeho resorpcí přes sliznici střeva. Vše je regulováno zpětnou vazbou. Železo je transportováno bílkovinou transferinem, který se tvoří v játrech. Zásoby železa jsou ve formě ferritinu a hemosiderinu.

1.4.2.2 Bilirubin – celkový

Vyšetřovaným materiálem je sérum nebo plazma. Odebírá se srážlivá venózní krev do skleněné nebo plastové zkumavky bez úpravy nebo se separačním gelem (sérum). Pokud k vyšetření použijeme plazmu, tak odebíráme do skleněné nebo plastové zkumavky s protisrážlivým činidlem. Je nutné zabránit hemolýze a chránit vzorek před přímým světlem, jinak získáme falešně negativní výsledky. Hodnota bilirubinu na světle klesá až o 50 % za hodinu. Odebraný materiál musí být zpracován nejpozději do 8 hodin po odběru

a skladován při teplotě odběrové místnosti, což je zhruba 25 °C. Pro delší uchování je možné vzorek zmrazit (-20 °C), po rozmražení již nemrazit.

Tabulka 10: Referenční rozmezí – fyziologické hodnoty CELKOVÝ BILIRUBIN

		Obě pohlaví						
	Jednotka	0-1 den	1-2 dny	2-20 dní	20dní-1 rok	1-60 let	60-90 let	90 a více let
Bilirubin celkový	μmol/l	0 - 38	0 - 85	0 - 171	0 - 29	2 - 17	3 - 19	3 - 15

Zvýšené hodnoty bilirubinu nacházíme u hemolytických anémií, což je dáno zvýšeným rozpadem erytrocytů.

1.4.2.3 Bilirubin – přímý (konjugovaný)

Odběr stejný jako u celkového bilirubinu.

Tabulka 11: Referenční rozmezí – fyziologické hodnoty PŘÍMÝ BILIRUBIN

		Obě pohlaví			
	Jednotka	do 15 let	15-60 let	60-90 let	90 a více let
Bilirubin přímý	μmol/l	nehodnotit	0 - 5,1	0 - 2	0 - 3

1.4.2.4 Ferritin

Vyšetřovaným materiálem je sérum nebo plazma. Odebírá se srážlivá venózní krev do skleněné nebo plastové zkumavky bez úpravy nebo se separačním gelem (sérum). Pokud k vyšetření použijeme plazmu, tak odebíráme do skleněné nebo plastové zkumavky s heparinátem lithným nebo K₂EDTA jako protisrážlivým činidlem. Silné protřepání zkumavky může způsobit jeho denaturaci. Ferritin je stabilní 7 dní při teplotě 4 – 8 °C. Je to makromolekulární bílkovina, která obsahuje 20 – 25 % železa, skládá se z buněčného železa v netoxické formě. Pro delší uchování je možné vzorek zmrazit (-20 °C), po rozmražení již nemrazit.

Tabulka 12: Referenční rozmezí – fyziologické hodnoty FERRITIN

		OBĚ POHLAVÍ			MUŽI	ŽENY
	Jednotka	0-6 týd.	6 týd.-1 rok	1-15 let	nad 15 let	nad 15 let
Ferritin	μg/l	145 - 458	52 - 200	7 - 142	17 - 304	8 - 95

U dospělých hodnoty nad 400 μg/l jsou již známkou přebytku železa v organismu. Takto vysoké hodnoty můžeme očekávat u talasemie a u jedinců po transfuzi.

1.4.3 Elektroforéza

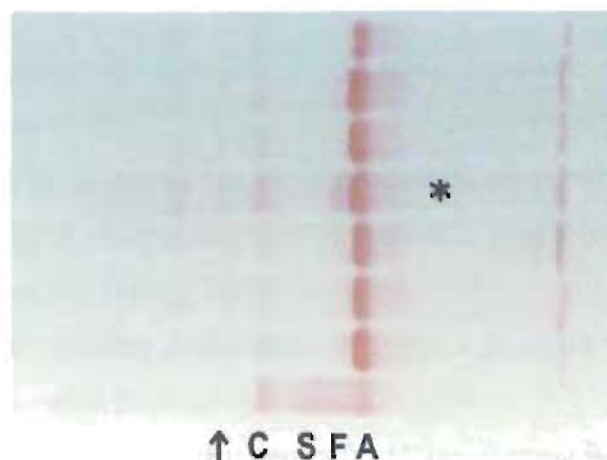
Společně s izoelektrickou fokusací a isotachoforézou patří mezi elektroforetické metody. Pomocí těchto metod se dělí látky, které nesou elektrický náboj (bílkoviny, AMK, ionty).

Dělení se děje podle rozdílné pohyblivosti ve stejnosměrném elektrickém poli. Pohyblivost látky hlavně závisí na velikosti elektrického náboje, velikosti molekuly, pH prostředí, méně na tvaru dělených částic, iontové síle pufru a na vlastnostech nosiče. Tudíž se různě velké a různě nabitě molekuly budou pohybovat rozdílnou rychlostí. pH je velice důležité, neboť bílkoviny, AMK, peptidy jsou látky amfoterní povahy, tudíž nesou různý elektrický náboj podle pH prostředí. V kyselém prostředí se chovají jako zásady, tzn. mají kladný náboj a v elektrickém poli se budou pohybovat k záporné elektrodě, ke katodě. V alkalickém prostředí se chovají naopak jako kyseliny, tudíž mají záporný náboj a pohybují se ke kladné elektrodě, k anodě. Při určité pH se molekula jeví jako elektroneutrální, ionizuje se stejný počet zásaditých i kyselých skupin, takže výsledný náboj je nulový, v tomto případě hovoříme o izoelektrickém bodě pI, který je pro každou amfolytickou látku charakteristický. Pokud je pH prostředí stejné jako pI, tak se látka ve stejnosměrném elektrickém poli pohybovat nebude. HbF má nižší elektroforetickou vodivost než HbA, protože obsahuje jiné AMK.

Zakladatelem elektroforézy byl švédský chemik A. W. K. Tiselius (1902 – 1971), který v roce 1948 získal za její výzkum Nobelovu cenu.

Kit HYDRAGEL 7 HEMOGLOBINE(E) je určen k separaci HbA, HbA₂, HbF a pro detekci hlavních variant hemoglobinu: S nebo D, C nebo E. Využívá se elektroforézy na agarózových gelech o pH 8,5, které se používají ve spojení s poloautomatickým systémem HYDRASYS. Gel je nosné médium pro elektroforézu hemoglobinů, obsahuje agarózu 0,8 g/dl, TRIS-Barbital pufr o pH 8,5 a aditiva nezbytná pro optimální provedení. Kontakt mezi gelem a elektrodami zajišťují pufrovací stripky, které obsahují TRIS-Barbital pufr o pH 8,5, azid sodný a aditiva nezbytná pro optimální provedení. K barvení gelů s rozdělenými hemoglobiny po elektroforéze se používá amidočerně, k hemolýze erytrocytů hemolyzační

roztok, což je alkalický pufr s aditivou. Výsledné elektroforeogramy jsou vyhodnocovány vizuálně nebo denzitometricky.



Obrázek 4: Elektroforéza: β -talasemie minor (HbA_2 5,5 %, HbF 2,5 %)

1.4.4 HPLC

Pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie se stanovuje HbA_2 a HbF pro posouzení, zda jde o talasemii. Podrobně je HPLC popsána v kapitole 4.2..

1.4.5 DNA analýza

β -talasemie (delece nebo inserce DNA v restrikčním fragmentu) lze diagnostikovat pomocí nepřímé diagnostiky např. prostřednictvím RFLP (polymorfismus délek restrikčních fragmentů). Lze stanovit i konkrétní mutaci, která je přímo zodpovědná za onemocnění, a to pomocí přímé diagnostiky. K analýze se používají restrikční endonukleázy.

Moderní přístup je detekce mutací pomocí real-time PCR a sekvenování.

2 Cíl práce

1. Získat soubor pacientů se suspektní β -talasemií, soustředit se na včasný záchyt v pediatrické oblasti.
2. Stanovit u pacientů se suspektní klinickou β -talasemií parametry hematologické (Hb, ery, ret, MCV, RDW, hematokrit, MCH, MCHC), biochemické (železo, ferritin, bilirubin) a diagnostické (HbA₂, HbF).
3. Vyhodnotit získané výsledky statistickou analýzou a posoudit význam laboratorních vyšetření pro diagnostiku β -talasemie minor a minima.
4. Diskutovat význam zatížení železa u pacientů s těžkou formou β -talasemie.

3 Metody

3.1 Soubor pacientů

Do této bakalářské práce jsme zahrnuli 35 pacientů, u kterých byla diagnostikována β -talasemie. Jednalo se o pacienty ÚKBP a Oddělení klinické hematologie FN Motol. 15 dětí od 1 roku do 17 let, 12 žen ve věku 21 – 49 let a 8 mužů od 22 let do 53 let. Jejich věk byl zaznamenán v době vyšetření. Pacienti č. 11, 12 a 13 jsou v příbuzenském vztahu, stejně tak jako pacienti č. 16 a 17, 18 a 19, 20 a 21, 24 a 25, 26 a 27. Na Oddělení klinické hematologie jsme jim stanovili parametry krevního obrazu: Hb, Ery, MCV, RDW, Ret, Htc, MCH, MCHC. Na ÚKBP jsme zanalyzovali celkový i konjugovaný bilirubin, Fe, Ferritin, HbA₂, HbF.

3.2 Vyšetření HbA₂ pomocí HPLC

HPLC = High Performance Liquid Chromatography = vysoce účinná kapalinová chromatografie

Někdy se tato metoda nazývá také High Pressure Liquid Chromatography, ovšem toto označení je méně vhodné. Skutečnost, že separace je vykonávána za vysokého tlaku je méně důležitá, než skutečnost, že oddělení jednotlivých složek je vysoce účinné. Byla objevena M. S. Cvetem (1872 – 1919) v roce 1903 v uspořádání kapalina – adsorbent, který první rozdělil na sloupci sorbetu listová barviva. Dříve byl průtok mobilní fáze zajišťován pouze gravitační silou. Bylo nutné v koloně urychlit separaci, což se docílilo tím, že zmenšily rozměry částic náplně. Proto jsou nyní nutná čerpadla, která překonávají vysoké tlaky.

Chromatografie je separační metoda, při které se ze vzorku oddělují jednotlivé složky. Poskytuje nám kvalitativní i kvantitativní informace o vzorku. Vzorek se nanáší mezi dvě fáze, ty jsou mezi sebou nemísitelné. Fáze stacionární (sorbet) je nepohyblivá, fáze mobilní (eluent) je pohyblivá. Mobilní fáze (v případě kapalinové chromatografie se jedná o kapalinu) se pohybuje přes stacionární fázi, na jejíž začátek byl nanesen vzorek, který je kapalinou unášen. Jednotlivé složky vzorku mohou být na stacionární fázi zadržovány a tudíž se nepohybují tak rychle. Složky se postupně od sebe separují a na konec stacionární fáze se dříve dostanou ty složky, které jsou méně zadržovány stacionární fází. Na separaci vzorku

má velký vliv stacionární fáze a její interakce s jednotlivými složkami, ale i mobilní fáze. Podle uspořádání nepohyblivé fáze dělíme kapalinovou chromatografií na tenkovrstvou a kolonovou, která je nejstarší ze všech chromatografických metod vůbec. Základem HPLC je kolonové uspořádání stacionární fáze.

Základní části kapalinového chromatografu pro HPLC:

- kolona s chromatografickým materiálem
- zařízení pro dávkování a nástřik vzorku
- čerpadlo a rezervoár na mobilní fázi
- gradientový mixér
- detektor
- výstup analyzovaných dat

3.2.1 Kolona s chromatografickým materiálem

Používá se kolona kapilárního typu. Ta je naplněna malými zrníčky sorbetu (3 – 10 μm , čím kratší kolona, tím jemnější náplň), ty kladou prostupující kapalině značný odpor, proto je nutné pracovat při vysokém tlaku. Kolony mohou být skleněné, ale pro většinu rutinních analýz jsou vyrobeny z nerezové oceli a jsou poměrně krátké (10, 15 nebo 25 cm). Vnitřní průměr je 4,6 nebo 5 mm, vnitřní průtok eluentu je 1 – 2 ml za minutu a je regulován čerpadlem. Používají se i různé ochranné kolony, které zachycují nečistoty a chrání tím analytickou kolonu. Často to jsou tzv. předkolony, které většinou bývají umístěny mezi čerpadlem a dávkovacím zařízením, nebo tzv. saturační kolona, která obsahuje velké množství stacionární fáze a zajišťuje tak rovnováhu mezi fázemi.

3.2.2 Zařízení pro dávkování a nástřik vzorku

Dříve se dávkovalo injekční stříkačkou, což způsobovalo určité nevýhody z hlediska těsnosti, udržení tlaku a zejména docházelo ke vnášení stop materiálu injekční stříkačky. Nyní se u HPLC používá tzv. obtokový dávkovací kohout nebo automatické dávkovače.

3.2.3 Čerpadlo a rezervoár na mobilní fázi

Do kolny je kapalina čerpána pístovými nebo membránovými čerpadly, která jsou vyrobena z nerezové oceli, keramiky či plastu. Do mobilní fáze nesmí být uvolňovány žádné látky, nesmí být nijak kontaminována. Čerpadla zajišťují konstantní tlak (7 – 20 MPa) i průtok (od mikrolitrů do desítek mililitrů za minutu), díky systému zpětné vazby. Jsou zde ventily z pryže nebo safíru, které řídí tok eluentu.

Složení mobilní fáze může zůstat stejné, potom hovoříme o izokratické eluci nebo se během separace mění a pak se jedná o gradientovou eluci (častější využití).

3.2.4 Gradientový mixér

Zajišťuje vhodný gradient eluentu (propojené nádoby nebo speciální nádoby, které na podkladě fotometrie a refraktometrie řídí složení eluentu pomocí počítače).

3.2.5 Detektor

Měl by být selektivní pro analyty a málo citlivý na mobilní fázi. Nejčastěji se používají detektory fotometrické, refraktometrické a fluorescenční. Nejběžnější jsou fotometrické, kdy se měří absorbance eluátu, který vychází z kolony. Refraktometrický detektor měří rozdíly indexu lomu fluátu a čisté mobilní fáze. Není příliš citlivý, ale je univerzální. Fluorescenční detektor využívá schopnosti látek absorbovat ultrafialové záření a pak vysílat záření o vyšší vlnové délce, které je měřeno fotonásobičem.

3.2.6 Výstup analyzovaných dat

Výsledkem HPLC analýzy je graf, chromatogram, který je nejčastěji zaznamenáván přímo do počítače, který je napojen na analyzátor.

3.2.7 Stanovení HbA₂ a HbF na automatickém chromatografickém analyzátoru Tosoh HLC-723 G7

Tento analyzátor separuje hemoglobinové komponenty na základě rozdílného náboje jednotlivých molekul (na principu HPLC). Přístroj pracuje ve dvou nezávislých modech

(tzv. glykovaný a talasemický). Liší se kalibrací, mobilní fází, kdy pro talasemický mod se používají speciální pufry, kolona je o něco delší. Glykovaný mod je specificky navržen k oddělení a kvantifikaci glykovaného hemoglobinu HbA_{1C}, separace trvá přibližně 3 minuty. Talasemický mod je přizpůsoben k separaci (po dobu přibližně 8 minut) a kvantifikaci HbA₂ a HbF. V tomto modu je možné identifikovat i další hemoglobinové varianty jako HbS, HbC, a HbD na základě jejich retenčních časů.



Obrázek 5: Analyzátor Tosoh HLC-723 G7

3.2.7.1 Analyzátor Tosoh HLC-723 G7, talasemický mod

K analýze je potřeba nesrážlivá krev s EDTA nebo heparinem. Ke zpracování vzorku by mělo dojít do 2 hodin po odběru při jeho uchování při teplotě asi 20 °C. Vzorek lze uchovávat i déle, při 4 – 8 °C po dobu 48 hodin. Vhodné je si hned po přijetí vzorku připravit hemolyzát, který navodí hypertonické prostředí, erytrocyty prasknou a vylije se hemoglobin potřebný pro stanovení. Tento hemolyzát může být i zmrazen. Ke stanovení stačí 3 μ l krve, společně s mrtvým objemem je nutno pro samotnou analýzu počítat alespoň s 50 μ l krve.

Analyzátor pracuje s katexovou dělicí kolonou TSKgel G7 β -Thal. HSi, kterou vyrábí japonská firma Tosoh. Uchovává se při teplotě 4 – 15 °C na temném místě, nejlépe v ledničce. Uvnitř kolony dochází k separaci hemoglobinových komponentů na několik subfrakcí na základě rozdílného náboje jednotlivých molekul. Pracovní tlak je 6 – 9 MPa.

Pro separaci subfrakcí a eluci z kolony je používána mobilní fáze s měnícím se gradientem β -Thalasemia Elution Buffer Kit, která obsahuje 3 citrátové pufrы o různých koncentracích solí a s odlišným pH. Tyto pufrы jsou barevně rozlišené (zelený, žlutý, růžový). Výrobce, firma Tosoh, z pochopitelných důvodů neudává složení jednotlivých pufrů. Před vlastním chromatografickým rozdělení přidá analyzátor ke vzorku hemolyzační pufr, způsobí prasknutí červených krvinek a vylije se hemoglobin.

K detekci se využívá fotometrický detektor, který měří absorbance eluovaných hemoglobinových subfrakcí v průtokové kyvetě při 2 vlnových délkách (415 a 510 nm). Výsledkem je chromatogram, ze kterého přístrojový software na základě retenčních časů určí, jaký pík odpovídá jakému typu hemoglobinu. Množství stanoveného hemoglobinu se vyhodnotí v procentech z celkového množství eluovaných frakcí hemoglobinu.

Pro stanovení HbA₂ a HbF je zavedena jednobodová kalibrace, používá se Hemoglobin F&A2 Calibrator, po otevření se skladuje při 2 – 8 °C. 4 lahvičky lyofilizovaných kalibrátorů se rozpustí v 0,2 ml redestilované vody. Kalibraci je nutno provést vždy po každé manipulaci s kolonou, nebo pokud jsou výsledky kontrolních vzorků opakovaně mimo nastavené rozmezí. Před každým měřením se provádí interní kontrola kvality (kontrolní materiál Lyphochek Hemoglobin A2 Control Bilevel od firmy Biorad).

Není známá žádná interference nebo křížová reakce. Výsledek je udáván v procentech zaokrouhlen na jedno desetinné místo.

Zvýšení HbA₂ na úkor snížení HbA₁ vede k podezření na onemocnění β – talasemie minor. HbA₂ může být zvýšen i při megaloblastické anemii, přibližně u 1/3 HIV pozitivních pacientů užívajících zidovudin je hladina HbA₂ zvýšena. Naopak nižší hladiny jsou u sideroblastické anémie, Hb H nemoci a erytroleukemii.

Stanovení HbA₂ a HbF pomocí HPLC společně se stanovením krevního obrazu je velice důležité pro správnou diagnostiku β – talasemie.

Tabulka 13: Fyziologické hodnoty HbA_{1c}, HbA₂ a HbF

Věk	HbA _{1c} %	HbA ₂ %	HbF %
0 – 1 měsíc	17,7 – 54,0	0,0 – 1,3	46,0 – 81,0
2 měsíce	37,1 – 70,6	0,4 – 1,9	29,0 – 61,0
3 měsíce	41,0 – 84,0	1,0 – 3,0	15,0 – 56,0
4 měsíce	68,2 – 88,6	2,0 – 2,8	9,4 – 29,0
5 měsíců	74,9 – 95,6	2,1 – 3,1	2,3 – 22,0
6 – 8 měsíců	83,5 – 95,8	1,9 – 3,5	2,3 – 13,0
9 – 12 měsíců	91,7 – 96,7	2,0 – 3,3	1,3 – 5,0
13 – 24 měsíců	94,5 – 98,2	1,6 – 3,5	0,2 – 2,0
25 měsíců – dospělí	94,3 – 98,5	1,5 – 3,7	0,0 – 2,0

3.3 Statistika

Výsledky jednotlivých parametrů (aritmetický průměr, směrodatná odchylka a medián) jsme vypočítali pomocí počítačového programu Excel 2003. Zpracované hodnoty jsou prezentovány v následující kapitole.

4 Výsledky

Naměřené hodnoty Hb, ery, MCV, RDW, ret, bilirubinu, železa, ferritinu, HbA₂, HbF, hematokritu, MCH, MCHC u 35 pacientů jsou uvedeny v příloze 1. Zvýšené hodnoty HbA₂ nad 3,5 % jsou zřejmé pro β -talasemii a podle hodnot HbF rozlišujeme formy minima, minor, intermedia a major. Z naměřených hodnot lze vytvořit závěr, že u dvou pacientů (č. 22 a 23) byla zjištěna β -talasemie intermedia. U ostatních pacientů se jedná o lehčí formy, β -talasemii minima nebo minor.

35 pacientů bylo rozděleno do 3 skupin na děti, ženy a muže. V jednotlivých skupinách byl spočítán aritmetický průměr, směrodatná odchylka a medián u všech parametrů.

Tabulka 14: HbA₂, HbF – 15 dětí ve věku 1-17 let

Děti	HbA ₂	HbF
	%	%
Průměr	5,22	1,56
SD	1,40	1,06
Medián	5,00	1,40

Tabulka 15: Biochemické parametry - 15 dětí ve věku 1-17 let

Děti	Bilirubin cel.	Bilirubin kon.	Fe	Ferritin
	$\mu\text{mol/l}$	$\mu\text{mol/l}$	$\mu\text{mol/l}$	$\mu\text{g/l}$
Průměr	9,47	4,14	14,07	44,15
SD	3,79	2,02	6,61	50,76
Medián	8,75	3,70	13,80	30,80

Tabulka 16: Hematologické parametry - 15 dětí ve věku 1-17 let

Děti	Hb	Ery	MCV	RDW	Ret	Htc	MCH	MCHC
	g/l	$\times 10^{12}/\text{l}$	fl	%	%	%	pg	g/l
Průměr	119,4	5,56	66,52	15,23	1,31	36,71	21,69	32,43
SD	22,08	0,74	10,75	1,64	0,51	6,04	4,16	1,00
Medián	113,00	5,60	62,20	15,50	1,24	33,80	20,00	32,20

Tabulka 17: HbA₂, HbF – 8 mužů ve věku 22-53 let

Muži	HbA ₂	HbF
	%	%
Průměr	4,56	8,46
SD	0,53	11,50
Medián	4,55	1,10

Tabulka 18: Biochemické parametry - 8 mužů ve věku 22-53 let

Muži	Bilirubin cel.	Bilirubin kon.	Fe	Ferritin
	μmol/l	μmol/l	μmol/l	μg/l
Průměr	40,27	32,62	17,28	156,75
SD	36,88	60,67	4,79	81,51
Medián	30,50	12,10	17,70	135,85

Tabulka 19: Hematologické parametry - 8 mužů ve věku 22-53 let

Muži	Hb	Ery	MCV	RDW	Ret	Htc	MCH	MCHC
	g/l	$\times 10^{12}/l$	fl	%	%	%	pg	g/l
Průměr	114,50	5,61	65,72	19,16	2,75	36,33	20,76	31,52
SD	16,35	1,25	6,05	4,48	0,99	5,31	2,24	0,65
Medián	114,5	5,68	68,85	18,10	2,67	36,90	21,80	31,50

Tabulka 20: HbA₂, HbF – 12 žen ve věku 21-49 let

Ženy	HbA ₂	HbF
	%	%
Průměr	4,54	1,07
SD	0,40	1,00
Medián	4,55	0,70

Tabulka 21: Biochemické parametry - 12 žen ve věku 21-49 let

Ženy	Bilirubin cel.	Bilirubin kon.	Fe	Ferritin
	μmol/l	μmol/l	μmol/l	μg/l
Průměr	18,35	7,62	21,45	53,95
SD	12,11	7,35	11,82	39,76
Medián	16,20	4,75	18,65	48,95

Tabulka 22: Hematologické parametry - 12 žen ve věku 21-49 let

Ženy	Hb	Ery	MCV	RDW	Ret	Htc	MCH	MCHC
	g/l	$\times 10^{12}/l$	fl	%	%	%	pg	g/l
Průměr	107,08	5,21	64,98	16,05	2,14	33,80	20,63	31,71
SD	12,79	0,72	3,86	2,11	1,30	4,19	1,34	0,57
Medián	111,00	5,32	65,10	15,15	1,62	34,70	20,40	31,75

5 Diskuze

Klinický průběh a stav pacientů s různými formami β -talasemie se výrazně liší. Závažné komplikace léčby se objevují u β -talasemie major a intermedia.

Důsledkem opakovaných nutných transfuzí u pacientů s talasemií je zatížení železem. Jedná se o největší příčinu nemocnosti a úmrtnosti u těchto pacientů a vyžaduje pečlivé sledování. Všechny chronické transfuzní léčby jsou spojeny se zatížením železem. Jedna jednotka transfuzní krve obsahuje okolo 200 – 250 mg železa, takže chronicky transfundovaní pacienti mají nadbytek železa, přibližně o 0,4 - 0,5 mg/kg/den. To znamená, že pacienti mohou být přetížení železem už po 10 - 20 transfuzích. Protože u člověka nejsou mechanismy pro vylučování nadbytečného množství železa, musí být toto množství odstraněno chelátovou terapií, o které se obvykle uvažuje po 1 roce krevních transfuzí. U pacientů s talasemií intermedia je nahromadění železa hlavně důsledkem zvýšené absorpce železa gastrointestinálním traktem a neúčinnou erythropoézou. U transfundovaných talasemických pacientů se začíná objevovat toxický efekt železa, když kapacita transferinu v plazmě, který váže železo, není dostačující (železo nenavázané na transferin), což způsobuje tvorbu volných hydroxylových radikálů, nebo když se ukládají nerozpustné železné komplexy v tkáních a orgánech. Železo se ukládá intracelulárně ve viscerálních orgánech jako je srdce, játra a endokrinní žlázy, a tím postupně škodí tkáním a konečnému orgánu, který je potom nefunkční nebo je jeho funkce nedostatečná. Nejběžnější klinické projevy přetížení železem jsou: zpomalený růst, hypogonadismus, poruchy metabolismu glukózy, cukrovka, kardiomyopatie, srdeční selhání a arytmie, jaterní fibróza a cirhóza. U netransfundovaných pacientů s talasemií intermedia je nahromadění železa pomalejší. Výskyt a závažnost komplikací spojených s přetížením železa u pacientů s talasemií se postupně snižuje od té doby, kdy byla zavedena chelátová terapie.

Správné a výhodnější neinvazivní měření zásob železa je rozhodující pro hodnocení závažnosti přetížení železem a pro správné zavedení chelátové terapie. Hladina ferritinu v séru je nejběžnější ukazatel zásob železa a může být snadno měřitelná komerčně dostupnými kity. Nicméně, rozmanitost stavů jako jsou zánět, příjem askorbátu a žloutenka pozměňuje zdánlivě jednoduchý vztah hladiny u v séru se zásobou železa v těle. Každodenní změny jsou obzvláště patrné u pacientů s vysokou hodnotou železa, inter a intra individuální

variabilita pacienta. Sériová měření, nejméně každé 3 měsíce, jsou nutné k řádnému hodnocení důležitosti železa u talasemických pacientů. Hladina ferritinu trvale pod 2500 $\mu\text{g/l}$ ukazuje na menší riziko srdečních komplikací, ale cílová hodnota se doporučuje přibližně 1000 $\mu\text{g/l}$ nebo menší. U pacientů s talasemií major je v současné praxi chelátová terapie zahájena po 10 - 20 transfuzích nebo když hladina ferritinu stoupne nad 1000 $\mu\text{g/l}$. Je uznávané, že játra obsahují železo (měří se obsah železa v játrech) a poskytují tak přesné měření koncentrace železa v tkáních vyjádřené v mg/kg . Referenční metoda pro stanovení železa je biopsie jater a měření v jaterní tkáni atomovou absorpcí.

Problém invazivní biopsie jater může být překonán pomocí SQUID technikou (Superconducting Quantum Interference Device), která je přesnou neinvazivní metodou pro odhadnutí obsahu železa, je založená na paramagnetických vlastnostech zásob železa v lidském těle jako ferritin a hemosiderin. Velikost paramagnetické odezvy je přímo úměrná množství železa v určitém objemu tkáně. Tato technika je drahá a je dostupná pouze v několika centrech (celkem pouze 5 center v Evropě a v Severní Americe).

Další metodou pro měření množství železa v játrech je Magnetic Resonance Imaging (MRI). Množství železa v játrech určené MRI prokazuje dobrou korelaci s vyhodnocenou jaterní biopsií. MRI může zhodnotit celý orgán a může také nalézt fibrozy. Tato metoda je neinvazivní a dobře dostupná, je také vhodná pro základní hodnocení přetížení železem a sledování účinnosti chelátové terapie. Přes významnost měření uloženého železa v játrech při hodnocení zatížení železem, MRI neměří železo vylučované v jiných životně důležitých orgánech, jako je srdce. Srdeční problémy jsou stále hlavní příčinou úmrtí u talasemických pacientů. Proto je nezbytné měřit myokardiální siderozu jak nejrychleji je to možné. Rovněž zlepšením terapeutických postupů je potřeba předejít srdečním komplikacím. Studie v Evropě a USA prokazují nevýznamný vztah mezi železem v játrech nebo ferritinu v séru a levou komorovou ejekční frakcí (LVEF), navrhuje, že klinické posouzení kardiovaskulárních rizik nemůže být založeno pouze na zhodnocení železa v játrech nebo hladiny ferritinu. Úplně nové kardiovaskulární magnetické rezonanční techniky mají mít schopnost přesného stanovení kardiálního přetížení železem.

Optimální železo-chelátová látka musí mít velkou afinitu a specificitu pro železité kationy Fe^{3+} , nízkou toxicitu, prodloužené vylučování poločasu rozpadu, nízkou afinitu

k ostatním kovům, lépe rozpustný v tucích (lipofilní) a s nízkou molekulární hmotností. Ale potřeba snižovat úmrtnost, která je spojena s přetížením železa, musí vést k vývoji nových léků.

Deferoxamine (DFO) byl zaveden v roce 1960 jako první železo-chelátový lék, který byl široce používán. Je to hexadentát chelátor a účinkuje železnou chelací – jedna molekula DFO se váže k jednomu atomu železa – vytváří ferrioxamin, který je vylučován stolicí a močí. Lék snižuje toxicitu železa eliminací volných radikálů. Je podáván v dávce po 10 - 20 transfuzích v dávce 30 – 50 mg/kg denně a když je hladina ferritinu nad 1000 $\mu\text{g/L}$. Způsob podání je obvykle injekčně subkutánně nejméně po dobu osmi hodin, 5-7 nocí za týden. Použití DFO hodně snižuje nemocnost a úmrtnost talasemických pacientů, ale jsou zde některé nevýhody. Ty zahrnují nevhodnost parenterálního podání, lokální kožní reakcí, vedlejší účinky (sluchová a sítnicová toxicita) a cena (nedostupný v rozvojových, málo rozvinutých zemích). Z těchto důvodů se mnoho úsilí soustřeďuje na rozvoj nových perorálních chelátorů.

Deferiprone (DFP) je perorální chelátor (tři molekuly obklopují jeden ion železa). Klinické pokusy ukazují, že dávka 75 mg/kg/denně ve třech dávkách je efektivní ve snižování přetížení železem v těle. Zdá se, že pacienti s velmi vysokou hladinou ferritinu (nad 2500 $\mu\text{g/L}$), dosahují velkých léčebných pokroků při použití tohoto léčiva. Výhoda této sloučeniny je ta, že je to chelátové železo bez zbytkové dávky a je rozpustný v tucích. Může tedy proniknout snadněji membránami a tak vyjmout potencionálně toxické železo z tkáně. Nedávno bylo ukázáno, že DFP poskytuje větší kardiální ochranný efekt proti přetížení železem. Vedlejší účinky deferipronové terapie zahrnují malou neutropenii a agranulocytózu, zvýšené transaminázy v séru, gastrointestinální distorbanci, postižení kloubů (artropatii). Dočasné přerušení léčby je doporučováno při výskytu agranulocytózy.

Kombinace použití deferoxaminu a deferipronu je popsáno v literatuře. To ukazuje, že při kombinované terapii může klesat přetížení železem, největší dopad byl nalezen u pacientů, kteří nebyli schopni reagovat samostatně na deferiprone nebo na deferoxamin. Pacienti podstupují podkožní terapii s deferoxaminu a kdo měl zhoršenou ejekční frakci, tak ukazuje zlepšení ve funkci kontrakce srdce po zavedení deferipronu v kombinované terapii.

Nová látka deferasirox, podávaná jednou denně, byla zkoumána u dospělých i u dvouletých pediatrických talasemických pacientů. Lék je dobře snášen a je účinný. U často transfundovaných pacientů (2 - 4 jednotky červených krvinek za měsíc) vede jedna dávka 20 mg/kg denně k udržení obsahu železa v játrech, neutrálnímu stavu železa a stabilní hladině ferritinu v séru, když je dávka 30 mg/kg denně, vede to k významnému poklesu množství železa v játrech, negativní bilanci železa a klesá hladina ferritinu v séru. Lék vylučuje železo téměř v plném rozsahu přes žlučové cesty a stolicí. Nejběžnější vedlejší účinky jsou bolest břicha, nevolnost, zvracení, průjem, zácpa a vyrážka na kůži, tyto symptomy jsou mírné až střední závažnosti a mohou být často dobře snášeny. Žádná sluchová ani sítnicová toxicita ani toxicita v kostní dřeni nebyla zjištěna. Studie nyní posuzují efekt léku na myokardiální siderozu.

6 Závěr

1. Ve spolupráci s oddělením klinické hematologie v Motole jsme získali 35 pacientů, u kterých se předpokládala diagnóza β -talasemie na základě laboratorních vyšetření.
2. U pacientů se suspektní β -talasemií jsme stanovili následující parametry: Hb, ery, MCV, RDW, ret, bilirubin, železo, ferritin, HbA₂, HbF, hematokrit, MCH, MCHC.
3. Vyhodnocené získané výsledky:

Tabulka 23: Aritmetický průměr \pm SD, Ženy

Parametr, jednotka	Průměrná hodnota \pm SD
Hemoglobin, g/l	107,08 \pm 12,79
Erytrocyty, $\times 10^{12}/l$	5,21 \pm 0,71
MCV, fl	64,98 \pm 3,86
RDW, %	16,05 \pm 2,11
Retikulocyty, %	2,14 \pm 1,30
Bilirubin cel., $\mu\text{mol}/l$	18,35 \pm 12,11
Bilirubin kon., $\mu\text{mol}/l$	7,62 \pm 7,35
Železo, $\mu\text{mol}/l$	21,45 \pm 11,82
Ferritin, $\mu\text{g}/l$	53,95 \pm 39,76
HbA ₂ , %	4,54 \pm 0,40
HbF, %	1,07 \pm 1,00
Hematokrit, %	33,80 \pm 4,19
MCH, pg	20,63 \pm 1,34
MCHC, g/l	31,71 \pm 0,57

Tabulka 24: Aritmetický průměr \pm SD, Děti

Parametr, jednotka	Průměrná hodnota \pm SD
Hemoglobin, g/l	119,40 \pm 22,08
Erytrocyty, $\times 10^{12}/l$	5,56 \pm 0,74
MCV, fl	66,52 \pm 10,75
RDW, %	15,23 \pm 1,64
Retikulocyty, %	1,31 \pm 0,51
Bilirubin cel., $\mu\text{mol}/l$	9,47 \pm 3,79
Bilirubin kon., $\mu\text{mol}/l$	4,14 \pm 2,02
Železo, $\mu\text{mol}/l$	14,07 \pm 6,61
Ferritin, $\mu\text{g}/l$	44,15 \pm 50,76
HbA ₂ , %	5,22 \pm 1,40
HbF, %	1,56 \pm 1,06
Hematokrit, %	36,71 \pm 6,04
MCH, pg	21,69 \pm 4,16
MCHC, g/l	32,43 \pm 1,00

Tabulka 25: Aritmetický průměr \pm SD, Muži

Parametr, jednotka	Průměrná hodnota \pm SD
Hemoglobin, g/l	114,50 \pm 16,35
Erytrocyty, $\times 10^{12}/l$	5,61 \pm 1,25
MCV, fl	65,72 \pm 6,05
RDW, %	19,16 \pm 4,48
Retikulocyty, %	2,75 \pm 0,99
Bilirubin cel., $\mu\text{mol}/l$	40,27 \pm 36,88
Bilirubin kon., $\mu\text{mol}/l$	32,62 \pm 60,67
Železo, $\mu\text{mol}/l$	17,28 \pm 4,79
Ferritin, $\mu\text{g}/l$	156,75 \pm 81,51
HbA ₂ , %	4,56 \pm 0,53
HbF, %	8,46 \pm 11,50
Hematokrit, %	36,33 \pm 5,31
MCH, pg	20,76 \pm 2,24
MCHC, g/l	31,52 \pm 0,65

4. V diskuzi jsme se věnovali problematice přetížení železem u pacientů s těžkými formami β -talasemie.

7 Souhrn / Summary

U β -talasemie je potlačena tvorba β řetězce. β -talasemie je nejčastěji způsobena bodovými mutacemi β globinového genu na 11 chromozomu. Existují různě závažné formy: β -talasemie minima, minor, intermedia, major. Vodicím znakem je mikrocytoza, HbA₂ vyšší než 3,5 % a zvýšené hodnoty HbF. Z laboratorního vyšetření je důležitý červený krevní obraz, hladina železa, ferritinu, bilirubinu a pomocí HPLC nebo elektroforézy stanovení HbA₂ a HbF. U pacientů, kteří potřebují transfuzi, se setkáváme se zatížením železem, které se odstraňuje např. chelatačními přípravky.

There is lower production of the β globin chain in β -thalassaemia disease. β -thalassaemia is mainly caused by site mutations of globin gene located on the 11 chromosom. There are some β -thalassaemia variants, differing by scope of affliction: β -thalassaemia minima, minor, intermedia, major. Regular symptoms for this disease are microcytosis, value of HbA₂ is higher than 3,5 % and increased value of HbF. Other indicators needed to be claimed from laboratory work-up, esp. red blood count, value of iron, ferritin, bilirubin and using methods of HPLC or electrophoresis receiving values of HbA₂ and HbF. Patients which are dependent on blood transfusion have iron overload. This overload is eliminating by the chelate drugs.

SEZNAM LITERATURY

1. Dobrý E., Kvasnička, J.: *Hematologie a transfúzní služba*. Avicenum Praha, 1987
2. Doležalová, V. a kolektiv autorů.: *Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii*. Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně, Brno 1995
3. Donner, L.: *Klinická hematologie*. Avicenum Praha, 1985
4. Douša, M.: *Základy separačních metod se zaměřením na HPLC*. Vydal ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno 2002
5. Duchoň, J.: *Biochemie*. Avicenum Praha, 1982, s. 305-307.
6. Galuska, P., Luhová, L.: *Laboratorní technika pro biochemiky*. Univerzita Palackého v Olomouci Přírodovědecká fakulta, Olomouc 2003
7. Churáček, J., Jandera, P.: *Separace látek – kapalinová vysokoúčinná kolonová chromatografie*. Nakladatelství technické literatury Praha, 1986
8. Indrák, K.: *Hemoglobinopatie v české a slovenské populaci se zaměřením na problematiku β -talasemií a jejich molekulárně genetickou identifikaci*. Olomouc, 1993
9. Jandera, P., Churáček, J.: *Kapalinová chromatografie s programovaných složením mobilní fáze*. Academia Praha, 1984
10. Klouda, P.: *Moderní analytické metody*. Nakladatelství Pavel Klouda Ostrava, 2003, s. 25-26, 33-34.
11. Králová, B., Rauch, P.: *Bioanalytické metody*. VŠCHT Praha, 1993, s. 199-212, 260-265.
12. Lexová, S.: *Hematologie pro zdravotní laboranty I. díl*. IDOPZ Brno, 2000
13. Murray, R. K., Granner, D. K., Mayers, P. A., Rodwell, V. W.: *Harperova biochemie*. Vydavatelství H&H, 1998, s. 53-64, 74, 470-486.
14. Navrátil, L. Kolektiv autorů: *Vnitřní lékařství pro nelékařské fakulty*. MANUS Praha, 2003, s. 141-152.
15. Pacáková, V., Štulík, K.: *High Performance Liquid Chromatography*. Státní pedagogické nakladatelství Praha, 1990
16. Pecka, M.: *Laboratorní hematologie v přehledu - Buňka a krvetvorba*. FINIDR s.r.o., Český Těšín, 2002, s. 114-131.
17. Pecka, M., Malý, J.: *Laboratorní hematologie*. HK Credit, Hradec Králové, 2004

18. Penka, M., Bulíková, A., Matýšková M., Zavřelová, J.: *Hematologie I – Neonkologická hematologie*. Grada, Praha 2001, s. 204.
19. Vokurka, M.: *Praktický slovník medicíny*. MAXDORF Praha, 1994
20. Zima, T.: *Laboratorní diagnostika*. Galén, 2002

Internetové zdroje a časopisy:

21. Pospíšilová, D. Anémie chronických nemocí v dětském věku. *Pediatric pro praxi* 6/2002, dostupný z www.solen.cz
22. Pospíšilová, D. Sideropenická anémie v dětském věku. *Pediatric pro praxi* 6/2001, dostupný z www.solen.cz
23. Cappellini, M. D., Castelli, R., Cassinero E. Iron overload and thalassaemia. *Clinical Laboratory International* 5/2006, s. 18-19
24. Melichárková, R. a kol.. Haplotypy β -globinového lokusu Čechů a Slováků s β -talasemiemi a strukturními variantami hemoglobinu. *Vnitřní lékařství*, 44, 1998, č. 9, s. 518-523.
25. Hoblová, J. Krevní obraz – minulost a současnost vyšetření. *Florence* 9/2006, dostupný z www.florence.cz
26. časopis *Medicína* 2000/11, dostupný z www.zdrava-rodina.cz , Veřejné zdravotnictví, článek Uplatnění lidského geonomu bude složité
27. On line Mendelian inheritance in Man – OMIM, dostupný na <http://ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>
28. Internetové stránky Dokkyo Medical University v Japonsku, www.dokkyomed.ac.jp
www.dokkyomed.ac.jp/dep-k/cli-path/a-super/super.html
29. Laboratorní příručka pro lékaře, Centrum laboratorní medicíny BioLab s.r.o. Klatovy, dostupná z www.biolab-kt.cz
30. Laboratorní příručka ÚKBP dostupná z internetových stránek ústavu klinické biochemie a patobiochemie UK 2. LF a FN Motol: <http://lf2.cuni.cz/Ustavy/ukbp/laboratorni-prirucka.pdf>
31. Orientační rozmezí hodnot biochemických a hematologických vyšetření podle skupin dostupné z internetových stránek ústavu klinické biochemie a patobiochemie UK 2. LF a FN Motol: <http://lf2.cuni.cz/Ustavy/ukbp/refer/index.html>
32. www.thalassemia.com

33. www.zdravcentra.cz
34. <http://sweb.cz/biochemie/x/metody/elektroforeza.html>
35. http://fch.upol.cz/skripta/zfcm/elfa/elfa_teorie.html
36. SOP FN Motol, Automatický chromatografický analyzátor hemoglobinů HLC-723 (TOSOH G7)
37. Kukačka, J., Klapková, E., Průša, R.: Presumptivní kombinované HPLC stanovení fetálního hemoglobinu využitím modu pro glykovaný hemoglobin, ÚKBP UK 2. LF a FN motol

Seznam obrázků a tabulek

Obrázek 1: Struktura hemoglobinu	2
Obrázek 2: Globinové řetězce lidského hemoglobinu	3
Obrázek 3: Výskyt α a β -talasemie ve světě	7
Obrázek 4: Elektroforéza: β -talasemie minor (HbA ₂ 5,5 %, HbF 2,5 %)	15
Obrázek 5: Analyzátor Tosoh HLC-723 G7	20
Tabulka 1: Referenční rozmezí – fyziologické hodnoty ERYTROCITY	8
Tabulka 2: Referenční rozmezí – fyziologické hodnoty HEMOGLOBIN	9
Tabulka 3: Referenční rozmezí – fyziologické hodnoty HEMATOKRIT	9
Tabulka 4: Referenční rozmezí – fyziologické hodnoty MCV	10
Tabulka 5: Referenční rozmezí – fyziologické hodnoty MCH	10
Tabulka 6: Referenční rozmezí – fyziologické hodnoty MCHC	10
Tabulka 7: Komplexní posouzení anémie podle kvantitativních kritérií	11
Tabulka 8: Referenční rozmezí – fyziologické hodnoty RETIKULOCYTY	11
Tabulka 9: Referenční rozmezí – fyziologické hodnoty ŽELEZO	12
Tabulka 10: Referenční rozmezí – fyziologické hodnoty CELKOVÝ BILIRUBIN	13
Tabulka 11: Referenční rozmezí – fyziologické hodnoty PŘÍMÝ BILIRUBIN	13
Tabulka 12: Referenční rozmezí – fyziologické hodnoty FERRITIN	13

Tabulka 13: Fyziologické hodnoty HbA ₁ , HbA ₂ a HbF	22
Tabulka 14: HbA ₂ , HbF – 15 dětí ve věku 1-17 let	23
Tabulka 15: Biochemické parametry - 15 dětí ve věku 1-17 let	23
Tabulka 16: Hematologické parametry - 15 dětí ve věku 1-17 let	23
Tabulka 17: HbA ₂ , HbF – 8 mužů ve věku 22-53 let	23
Tabulka 18: Biochemické parametry - 8 mužů ve věku 22-53 let	24
Tabulka 19: Hematologické parametry - 8 mužů ve věku 22-53 let	24
Tabulka 20: HbA ₂ , HbF – 12 žen ve věku 21-49 let	24
Tabulka 21: Biochemické parametry - 12 žen ve věku 21-49 let	24
Tabulka 22: Hematologické parametry - 12 žen ve věku 21-49 let	24
Tabulka 24: Aritmetický průměr \pm SD, Ženy	29
Tabulka 25: Aritmetický průměr \pm SD, Děti	30
Tabulka 26: Aritmetický průměr \pm SD, Muži	31

Příloha 1 – Naměřené hodnoty

Naměřené hodnoty Hb, Ery, MCV, RDW, Ret, bilirubinu, železa, ferritinu, HbA₂, HbF, hematokritu, MCH, MCHC u 35 pacientů. Zvýšené hodnoty HbA₂ nad 3,5 % jsou zřejmé pro β -talasemii a podle hodnot HbF rozlišujeme formy minima, minor, intermedia a major. Z naměřených hodnot lze vytvořit závěr, že u dvou pacientů (č. 22 a 23) byla zjištěna β -talasemie intermedia. U ostatních pacientů se jedná o lehčí formy, β -talasemii minima nebo minor.

Pacient	Hb g/l	Ery x10 ¹² /l	MCV fl	RDW %	Ret %	Bilirubin cel./kon. μmol/l	Fe μmol/l	Ferritin μg/l	HbA2 %	HbF %	Htc %	MCH pg	MCHC g/l
č. 1 21 let, Ž	94	4,19	68,5	18,1	1,38	8,2/0,5	6,8	9,9	5,0	0,8	28,7	22,4	32,8
č. 2 3 roky, M	102	5,46	58,7	16,1	1,23	6,2/3,1	13,0	30,8	5,5	1,7	32,1	18,7	31,8
č. 3 29 let, M	114	6,22	59,9	15,6	1,85	37,5/12,8	16,7	178,1	4,1	1,0	37,2	18,3	30,6
č. 4 28 let, M	134	8,04	54,1	20,6	-	-	23,1	223,8	5,0	0,8	43,6	16,7	30,7
č. 5 36 let, Ž	121	6,15	63,2	15,7	2,30	18,3/4,6	18,2	45,9	4,6	0,3	38,9	19,7	31,1
č. 6 4 roky, M	104	5,72	57,5	15,8	-	11,9/2,8	14,7	19,7	5,9	1,4	33,0	18,2	31,5
č. 7 4 roky, M	176	6,26	82,7	12,5	1,18	11,1/4,7	13,8	-	3,5	1,7	51,8	28,1	34,0
č. 8 8 let, M	113	4,19	78,7	13,2	-	-	8,1	33,3	4,2	0,9	33,0	27,0	34,2
č. 9 14 let, Ž	131	4,4	89,1	13,1	0,38	20,7/8,8	9,9	20,1	4,1	0,8	39,2	29,8	33,4
č. 10 9 let, M	143	5,2	80,7	13,7	-	8,3/-	9,2	26,5	4,0	0,7	42,0	27,5	34,0

Pacient	Hb g/l	Ery $\times 10^{12}/l$	MCV fl	RDW %	Ret %	Bilirubin cel./kon. $\mu\text{mol}/l$	Fe $\mu\text{mol}/l$	Ferritin $\mu\text{g}/l$	HbA2 %	HbF %	Htc %	MCH pg	MCHC g/l
č. 11 9 let, M	125	6,21	62,2	15,5	0,83	7,1/3,1	12,1	53,2	7,2	1,4	38,6	20,1	32,4
č. 12 17 let, M	142	6,51	66,9	15,0	1,72	11,2/4,9	31,6	211,5	5,8	1,5	43,5	21,8	32,6
č. 13 43let, M	128	5,58	70,7	15,6	3,05	6,8/3,3	20,7	259,7	5,5	1,2	39,4	22,9	32,5
č. 14 4 roky, Ž	109	5,78	58,5	17,0	1,26	8,9/3,8	14,6	15,4	6,4	3,1	33,8	18,9	32,2
č. 15 1 rok, M	95	4,81	61,3	18,8	1,59	5,2/-	3,0	9,8	8,7	2,4	29,5	19,8	32,3
č. 16 32 let, Ž	105	5,84	56,5	16,4	2,48	16,0/9,4	20,6	73,3	5,2	0,5	33,1	18,0	31,7
č. 17 9 let, Ž	118	6,52	57,1	16,3	1,13	10,4/6,1	23,8	30,8	5,1	4,4	37,2	18,1	31,7
č. 18 49 let, Ž	111	5,33	65,3	15,1	1,49	8,3/3,2	9,0	9,9	4,1	0,7	34,8	20,8	31,9
č. 19 23 let, Ž	118	6,00	62,4	17,0	2,25	8,0/2,2	10,4	62,4	4,5	0,8	37,5	19,7	31,5
č. 20 32 let, Ž	119	5,23	70,6	13,9	1,16	9,7/-	17,2	40,0	3,7	0,7	37,0	22,8	32,2

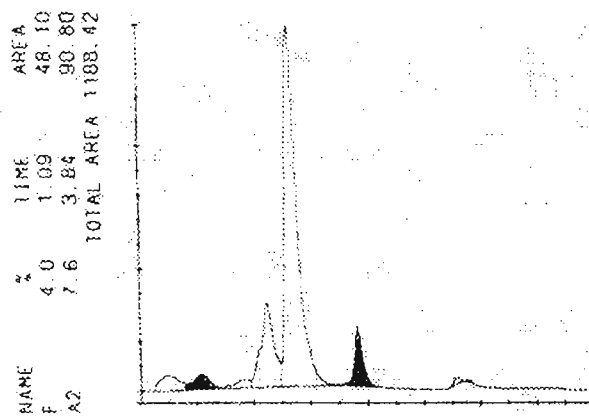
Pacient	Hb g/l	Ery $\times 10^{12}/l$	MCV fl	RDW %	Ret %	Bilirubin cel./kon. $\mu\text{mol}/l$	Fe $\mu\text{mol}/l$	Ferritin $\mu\text{g}/l$	HbA2 %	HbF %	Htc %	MCH pg	MCHC g/l
č.21 7 let, M	129	6,45	63,8	14,8	1,00	6,9/1,5	13,4	34,0	3,9	1,6	41,2	20,0	31,3
č. 22 29 let, M	112	5,22	68,4	22,0	2,67	30,5/12,1	16,1	62,0	4,0	30,2	35,7	21,5	31,4
č. 23 31 let, M	90	4,06	70,1	23,1	4,33	109,1/170	21,3	92,3	4,0	20,8	28,5	22,2	31,6
č. 24 33 let, Ž	93	4,30	68,8	14,4	2,81	17,2/4,9	40,8	32,0	4,7	0,6	29,6	21,6	31,4
č. 25 9 let, Ž	98	5,20	59,5	16,1	2,38	8,7/1,8	13,8	51,3	5,0	0,7	31,0	18,8	31,6
č. 26 27 let, Ž	108	5,23	64,9	15,0	1,61	16,4/-	15,3	54,3	4,7	0,7	34,0	20,7	31,8
č. 27 6 let, Ž	100	5,60	56,7	15,7	1,86	8,8/5,5	13,8	66,0	4,5	0,6	31,8	17,9	31,4
č. 28 53 let, M	130	5,87	69,3	14,5	1,35	12,7/7,2	8,3	254,0	4,7	0,7	40,7	22,1	31,9
č. 29 22 let, M	115	5,78	63,3	15,4	2,53	15,9/10,0	13,4	93,6	4,8	0,7	36,6	19,9	31,4
č. 30 12 let, M	106	5,13	64,4	14,9	1,26	7,3/3,6	16,3	15,7	4,6	0,5	33,0	20,7	32,1

Pacient	Hb g/l	Ery $\times 10^{12}/l$	MCV fl	RDW %	Ret %	Bilirubin cel./kon. $\mu\text{mol/l}$	Fe $\mu\text{mol/l}$	Ferritin $\mu\text{g/l}$	HbA2 %	HbF %	Htc %	MCH pg	MCHC g/l
č. 31 24 let, Ž	116	5,31	68,5	15,1	1,59	11,0/3,2	19,1	41,7	4,9	0,7	36,4	21,8	31,9
č. 32 31 let, M	93	4,14	70,0	26,5	3,49	69,4/13,0	18,7	90,5	4,4	12,3	29,0	22,5	32,1
č. 33 24 let, Ž	111	5,54	65,5	15,2	1,15	24,4/7,7	41,3	62,0	4,4	3,2	63,4	20,0	30,5
č. 34 24 let, Ž	78	3,88	63,4	21,7	5,93	35,7/24,1	35,7	164,0	4,4	0,7	24,6	20,1	31,7
č. 35 25 let, Ž	111	5,56	62,1	15,1	1,64	47,1/16,4	23,1	52,0	4,3	3,2	34,6	20,0	32,1

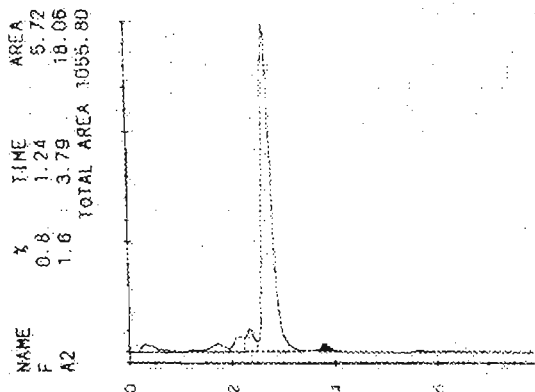
Příloha 2 – Posouzení přetížení železem

Metoda: Měření ferritinu	
KLADY	ZÁPORY
<ul style="list-style-type: none"> • Neinvazivní metoda • měření může být prováděno často a dovoluje pravidelné sledování • levné 	<ul style="list-style-type: none"> • hodnoty jsou ovlivněny infekcí, zánětem • série měření nebo kombinace s ostatními jsou žádané • nepřímé měření zátěže železa
Metoda: Jaterní biopsie	
KLADY	ZÁPORY
<ul style="list-style-type: none"> • ověřený srovnávací standard • přímé měření • připouští doprovodný histologický posudek • přípustná pro měření ukládání železa v hemu 	<ul style="list-style-type: none"> • invazivní: spojené s nebezpečím vykrvácení, infekcí a bolestí • vyžaduje vyškolený personál a standardizované laboratorní techniky • nemůže představovat rozložení železa v játrech • může mít vliv na průvodní jaterní onemocnění
Metoda: Technika SQUID	
KLADY	ZÁPORY
<ul style="list-style-type: none"> • neinvazivní metoda • přímý vztah s obsahem železa v játrech hodnocenou biopsií • měření může být běžně opakováno 	<ul style="list-style-type: none"> • nepřímé měření obsahu železa v játrech • omezená dostupnost • vysoká cena • souhrnný postup
Metoda: Magnetická resonance	
KLADY	ZÁPORY
<ul style="list-style-type: none"> • neinvazivní metoda • snadná dostupnost • schopna analyzovat celá játra • dovoluje zhodnotit patologický stav jater 	<ul style="list-style-type: none"> • nepřímé měření obsahu železa v játrech • metodologie zbytků je standardizována a potvrzena

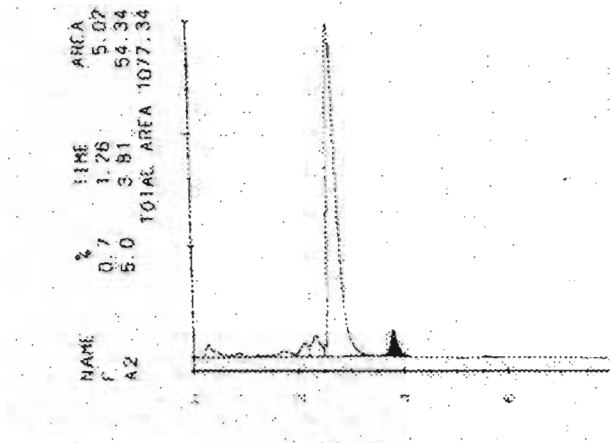
Příloha 3 – Chromatogramy



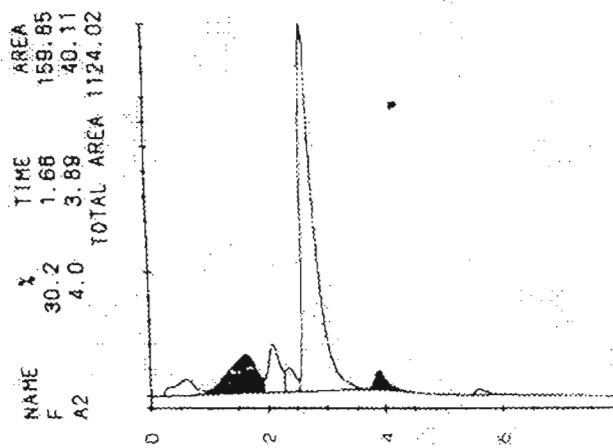
Kalibrace: HbF 4,0 %, HbA₂ 7,6 %



Normální nález: HbF 0,8 %, HbA₂ 1,6 %



β-talasemie minor: HbF 0,7 %, HbA₂ 5,0 %



β-talasemie intermedia: HbF 30,2 %, HbA₂ 4,0 %