

**UNIVERZITA KARLOVA**

Lékařská fakulta v Hradci Králové

# **DISERTAČNÍ PRÁCE**

Doktorský studijní program

**Vnitřní nemoci**

**VYUŽITÍ ERYTHROCYTAFERÉZY K LÉČBĚ PACIENTŮ  
S HEREDITÁRNÍ HEMOCHROMATÓZOU**

ERYTHROCYTAPHERESIS IN THE TREATMENT OF PATIENTS  
WITH HEREDITARY HAEMOCHROMATOSIS

**MUDr. Vít Řeháček**

Školitel: prof. MUDr. Milan Bláha, CSc.

Hradec Králové, 2021

## Prohlášení autora

---

### Prohlášení:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy, Praha.

Hradec Králové, 2021

.....

MUDr. Vít Řeháček

## **Poděkování**

Děkuji svému školiteli prof. Milanu Bláhovi, CSc. za odborné vedení, cenné rady a připomínky v průběhu i při dokončování práce.

Děkuji všem spolupracovníkům Transfuzního oddělení FN Hradec Králové, kteří se podíleli na léčbě nemocných erythrocytaferézami. Děkuji RNDr. Evě Čermákové za pomoc při statistickém zpracování dat a pracovnícím Lékařské knihovny LF UK HK, Mgr. Radce Pavlové a paní Olze Bukačové za podklady pro literaturu a výkaz publikační činnosti.

Dík patří i rodině, bez jejíž podpory bych práci nedokončil.

## OBSAH

<b>POUŽITÉ ZKRATKY</b> .....	10
<b>SOUHRN</b> .....	13
<b>SUMMARY</b> .....	15
<b>1. ÚVOD</b> .....	17
<b>2. ŽELEZO A JEHO METABOLISMUS</b> .....	17
<b>2.1. RESORPCE ŽELEZA</b> .....	18
2.1.1. Vstřebávání nehemového železa .....	18
2.1.2. Vstřebávání hemového železa .....	18
2.1.3. Železo v enterocyty.....	18
<b>2.2. TRANSPORT ŽELEZA</b> .....	19
2.2.1. Transport železa přes bazolaterální membránu enterocyty .....	19
2.2.2. Transport železa plazmou .....	20
2.2.3. Transport železa do buněk .....	21
<b>2.3. REGULACE METABOLISMU ŽELEZA</b> .....	22
2.3.1. Regulace hladiny železa v buňce .....	22
2.3.2. Hepcidin .....	22
2.3.2.1. Vliv zásoby železa na produkci hepcidinu .....	23
2.3.2.2. Vliv hypoxie na produkci hepcidinu .....	23
2.3.2.3. Vliv zánětu na produkci hepcidinu.....	24
<b>3. PORUCHY METABOLISMU ŽELEZA</b> .....	25
<b>3.1. NEDOSTATEK ŽELEZA</b> .....	25
<b>3.2. NADBYTEK ŽELEZA</b> .....	25
<b>4. DĚDIČNÉ CHOROBY S AKUMULACÍ ŽELEZA</b> .....	26
<b>4.1. HEREDITÁRNÍ HEMOCHROMATÓZA – TYP 1 (HFE 1)</b> .....	26
<b>4.1.1. Mutace HFE genu</b> .....	28
4.1.1.1. Mutace C282Y .....	28
4.1.1.2. Mutace H63D .....	29
4.1.1.3. Mutace S65C .....	29
4.1.1.4. Další mutace HFE genu.....	29
<b>4.1.2. Výskyt mutací HFE genu</b> .....	29
<b>4.1.3. Výskyt mutací HFE v České republice</b> .....	31
<b>4.1.4. Vztah mezi mutacemi HFE a chorobou</b> .....	31
<b>4.2. JUVENILNÍ HEMOCHROMATÓZA, TYP 2 (HFE 2)</b> .....	32

4.2.1. Juvenilní hemochromatóza, typ 2A s defektem genu HJV.....	33
4.2.2. Juvenilní hemochromatóza, typ 2B s mutací genu HAMP.....	33
4.3. HEMOCHROMATÓZA TYP 3 S DEFEKTEM GENU PRO TFR2 (HFE 3)	33
4.4. HEMOCHROMATÓZA TYP 4, MUTACE GENU PRO FPN (HFE 4).....	34
4.4.1. HFE 4A – nefunkční ferroportin .....	34
4.4.2. HFE 4B – částečně funkční ferroportin .....	35
4.5. DALŠÍ DĚDIČNÉ CHOROBY Z PŘETÍŽENÍ ŽELEZEM .....	35
4.5.1. Aceruloplazminémie.....	35
4.5.2. Atransferinémie a hypotransferinémie .....	35
4.5.3. Mutace genu pro feritin v H oblasti.....	36
4.5.4. Strukturální změny haptoglobinu.....	36
4.5.5. Friedreichova ataxie.....	36
<b>5. KLINICKÉ ASPEKTY HFE HEMOCHROMATÓZY (TYP 1) .....</b>	<b>36</b>
5.1. FENOTYPOVÁ KRITÉRIA HEREDITÁRNÍ HEMOCHROMATÓZY .....	36
5.2. DIAGNOSTIKA HEREDITÁRNÍ HEMOCHROMATÓZY.....	40
5.2.1. Hladina železa .....	40
5.2.2. Vazebná kapacita transferinu pro železo .....	40
5.2.3. Saturace transferinu .....	40
5.2.4. Feritin .....	41
5.2.5 Hepcidin .....	41
5.2.6. Genetické testování .....	41
5.2.7. Zobrazovací metody .....	41
5.2.7.1. Vyšetření ultrazvukem .....	41
5.2.7.2. Magnetická rezonance.....	42
5.2.8. Jaterní biopsie.....	42
5.2.9. Další vyšetření.....	42
5.3. SCREENING HH .....	42
5.3.1. Genetický screening .....	43
5.3.2. Fenotypový screening.....	43
5.3.3. Rodinný screening .....	43
5.3.4. Cílený screening.....	44
5.4. LÉČBA HH.....	44
5.4.1. Venepunkce.....	44
5.4.2. Erytrocytaferéza .....	45
5.4.3. Chelatační léčba.....	45

5.4.3.1. Deferoxamin (Desferal®).....	45
5.4.3.2. Deferipron (Ferriprox®).....	45
5.4.3.3. Deferasirox (Exjade®) .....	45
<b>5.4.4. Nové možnosti léčby HH.....</b>	<b>46</b>
5.4.4.1 Agonisté hepcidinu.....	46
5.4.4.2 Antagonisté hepcidinu.....	46
<b>5.4.5. Dieta a preventivní opatření při HH .....</b>	<b>46</b>
<b>5.5. ÚČINEK LÉČBY NA KLINICKÉ PROJEVY .....</b>	<b>47</b>
<b>5.6. HH A DÁRCOVSTVÍ KRVE A KREVNÍCH SLOŽEK .....</b>	<b>48</b>
<b>6. LÉČEBNÉ AFERÉZY, ERYTROCYTAFERÉZA .....</b>	<b>49</b>
<b>6.1. HISTORIE .....</b>	<b>49</b>
<b>6.2. PŘÍSTROJE PRO AFERÉZU .....</b>	<b>50</b>
<b>6.3. PRINCIP SEPARAČNÍ METODY .....</b>	<b>50</b>
<b>6.4. ODBĚR ERYTROCYTŮ SEPARÁTOREM - ERYTROCYTAFERÉZA .....</b>	<b>51</b>
<b>6.5. NEŽÁDOUCÍ REAKCE NA ODBĚR .....</b>	<b>52</b>
<b>6.5.1. Rozdělení nežádoucích reakcí .....</b>	<b>52</b>
6.5.1.1. Časné, akutní nežádoucí reakce a komplikace .....	52
6.5.1.2. Pozdní nežádoucí reakce a komplikace.....	53
<b>6.5.2. Citronanová toxicita.....</b>	<b>53</b>
<b>6.5.3. Vazovagální reakce .....</b>	<b>54</b>
<b>6.5.4. Pozdní reakce.....</b>	<b>54</b>
<b>7. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE .....</b>	<b>55</b>
<b>7.1. PRIMÁRNÍ CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>55</b>
7.1.1. Vytvoření souboru nemocných .....	55
7.1.2. Léčebná metoda.....	55
<b>7.2. SEKUNDÁRNÍ CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>55</b>
7.2.1. Bezpečnost erythrocytaferézy.....	55
7.2.2. Efektivita procedur .....	55
7.2.3. Ukazatelé úspěšnosti léčby.....	55
7.2.4. Udržovací léčba .....	55
<b>7.3. PRACOVNÍ HYPOTÉZY .....</b>	<b>56</b>
<b>8. METODIKA.....</b>	<b>56</b>
<b>8.1. VYTVOŘENÍ SOUBORU NEMOCNÝCH.....</b>	<b>56</b>
8.1.1. Vyhledání nemocných mezi dárci krve - screening HH u dárců krve...	56
8.1.2. Spolupráce s hepatologickými ambulancemi.....	56

8.1.3. Pacienti z rodinných studií .....	57
<b>8.2. STRATEGIE LÉČBY .....</b>	<b>57</b>
8.2.1. Indukční léčba .....	57
8.2.2. Udržovací léčba .....	58
<b>8.3. PŘÍSTROJ PRO ERYTROCYTAFERÉZU .....</b>	<b>58</b>
<b>8.4. PŘÍPRAVA PŘED LÉČEBNÝM ODBĚREM .....</b>	<b>62</b>
8.4.1. Poučení pacienta .....	62
8.4.2. Vyšetření pacienta .....	62
8.4.3. Příjem tekutin .....	62
8.4.4. Příprava separátoru .....	62
<b>8.5. LÉČEBNÝ ODBĚR .....</b>	<b>63</b>
8.5.1. Zahájení odběru .....	63
8.5.2. Odběr .....	64
8.5.3. Ukončení odběru .....	65
<b>8.6. LABORATORNÍ VYŠETŘENÍ .....</b>	<b>65</b>
<b>8.7. STATISTICKÉ METODY .....</b>	<b>66</b>
<b>9. VÝSLEDKY .....</b>	<b>67</b>
<b>9.1. SOUBOR NEMOCNÝCH .....</b>	<b>67</b>
9.1.1. Vyhledání nemocných mezi dárci krve - screening HH u dárců krve... 67	
9.1.2. Pacienti s HH předání k léčbě z ambulancí .....	68
9.1.3. Pacienti z rodinných studií .....	68
<b>9.2. CHARAKTERISTIKA SOUBORU .....</b>	<b>68</b>
9.2.1. Zastoupení mutací HFE v souboru .....	68
9.2.2. Demografická data souboru .....	69
<b>9.3. LABORATORNÍ HODNOTY PŘED ZAHÁJENÍM LÉČBY .....</b>	<b>71</b>
<b>9.4. INDUKČNÍ LÉČBA .....</b>	<b>73</b>
9.4.1. Množství odebraných erytrocytů při jedné erythrocytaferéze..... 73	
9.4.2. Změna hodnot krevního obrazu..... 74	
9.4.3. Doba léčby, množství odebraných erytrocytů během indukční léčby ... 76	
<b>9.5. LABORATORNÍ HODNOTY PO UKONČENÍ INDUKČNÍ LÉČBY .....</b>	<b>76</b>
<b>9.6. NEŽÁDOUCÍ REAKCE NA ODBĚR .....</b>	<b>81</b>
<b>9.7. UDRŽOVACÍ LÉČBA .....</b>	<b>81</b>
9.7.1. Soubor pacientů a jejich léčba .....	81
9.7.2. Dárcovství krve u pacientů v průběhu udržovací léčby .....	82
9.7.3. Aktuálně sledovaní pacienti..... 82	



<b>10. DISKUZE</b> .....	82
10.1. LÉČEBNÁ METODA.....	82
10.2. SOUBOR PACIENTŮ PRO ERYTROCYTAFERÉZU .....	84
10.3. MNOŽSTVÍ ODEBÍRANÝCH ERYTROCYTŮ .....	86
10.4. ŘÍZENÍ A INDIVIDUALIZACE ODBĚRU .....	89
10.5. NÁHRADA ODEBÍRANÝCH ERYTROCYTŮ.....	90
10.6. SLEDOVÁNÍ MCV JAKO MARKERU POKLESU ZÁSOB ŽELEZA ..	91
10.7. NÁKLADY NA LÉČBU .....	91
10.8. NEŽÁDOUCÍ REAKCE .....	92
10.9. DLOUHODOBĚ SLEDOVÁNÍ PACIENTI PŘI UDRŽOVACÍ LÉČBĚ ..	94
10.10. PERSPEKTIVY DALŠÍ LÉČBY .....	95
<b>11. PLNĚNÍ CÍLŮ VÝZKUMU A ZÁVĚRY</b> .....	96
11.1. PRIMÁRNÍ CÍLE .....	96
11.1.1. Vytvoření souboru nemocných .....	96
11.1.2. Léčebná metoda.....	96
11.2. SEKUNDÁRNÍ CÍLE .....	96
11.2.1. Bezpečnost erythrocytaferézy.....	96
11.2.2. Efektivita procedur .....	96
11.2.3. Ukazatelé úspěšnosti léčby.....	97
11.2.4. Udržovací léčba .....	97
11.3. POZNATKY MIMO PŮVODNÍ ZÁMĚR .....	97
11.4. HODNOCENÍ PRACOVNÍCH HYPOTÉZ.....	97
<b>12. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	98
<b>13. SEZNAM ILUSTRACÍ</b> .....	109
13.1. SEZNAM TABULEK .....	109
13.2. SEZNAM OBRÁZKŮ.....	109
13.3. SEZNAM GRAFŮ.....	110

## POUŽITÉ ZKRATKY

AABB	American Association of Blood Bank
AK	Aminokyselina
AV	Průměrná hodnota, average
BMI	Body Mass Index, index vypočtený z výšky a váhy osoby
buffy-coat	Vrstva krve obsahující převážnou část trombocytů a leukocytů, vyskytuje se na rozhraní mezi plazmou a erytrocyty po centrifugaci plné krve
CT	Computer tomography, počítačová tomografie
Dcytb	Duodenální cytochrom b
DMT1	Divalent metal transporter 1
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EAF	Erythrocytaferéza, erythrocytapheresis
FDA	Food and Drug Administration, USA
Fe	železo
fl	Femtolitr ... $10^{-15}$ litru
FN HK	Fakultní nemocnice Hradec Králové
FPN	Ferroportin
HAMP	Gen kódující syntézu hepcidinu, hepcidin antimicrobial peptide
Hb	Hemoglobin (g/l)
HCP1	Heme carrier protein 1
HEPH	Hefestin
HFE gen	Gen pro hemochromatózu (High Fe)
HFE 1,2,3,4	Podtypy hereditární hemochromatózy způsobené mutací různých genů
HH	Hereditární hemochromatóza
HII	Hepatic iron index
HJV	Hemojuvelin

HO-1	Heme oxygenáza 1
HT	Hematokrit
IL-6	Interleukin 6
Ireg1	Starší název pro feroportin,
IRE	Iron regulatory elements
IRP1, IRP2	Iron regulatory proteins
kap.	Kapitola
MCS+	Separátor krevních částic Haemonetics MCS+ (multicomponent system)
MCV	Střední objem erytrocytů, mean corpuscular volume (fl)
MR	Magnetická rezonance
MTP1	Gen kódující tvorbu feroportinu, metal-tolerance protein 1
Nramp2	Synonymum pro divalent methyl transporter (DMT1), natural resistance-associated macrophage protein 2
PCBP1	Poly-chaperon binding protein 1
PCR	Polymerázová řetězová reakce, polymerase chain reaction
RES	Retikuloendotelový systém
RNA	Ribonukleová kyselina
SD	Směrodatná odchylka, standard deviation
SMAD	Signal Mothers Against Decapentaplegic Homologue 1, 4, 5, 8
STEAP3	Ferireduktáza, Six-Transmembrane Epithelial Antigen of Prostate 3
SW	Software
TAE 944	Jednorázová odběrová souprava pro léčebnou erythrocytaferézu pro MCS+
TBV	Objem krve pacienta, total blood volume
TEV	Celkový objem erytrocytů určený z TBV a HT, total erythrocyte volume
TfS	Saturace transferinu
TIBC	Celková vazebná kapacita železa, total iron-binding capacity

TfR1	Transferinový receptor 1
TfR2	Transferinový receptor 2
TMPRSS6	Transmembrane protease serine 6 (synonymum matriptase-2)
TU	Transfuzní jednotka, transfusion unit
UIBC	Nenasycená vazebná kapacita železa, unsaturated iron-binding capacity
UZ	Ultrazvuk, vyšetření ultrazvukem

## SOUHRN

**ÚVOD:** Hereditární hemochromatóza (HH), jedno z nejčastějších dědičných onemocnění euroamerické populace, je onemocnění způsobené zvýšenou absorpcí železa ze střeva bez ohledu na výši jeho aktuální zásoby v organismu, nadbytečné železo se ukládá v tkáních a orgánech a je příčinou jejich významného poškození. Léčba HH spočívá v pravidelných odběrech krve, aktivace erythropoézy vede k utilizaci nadbytečného železa a k normalizaci jeho zásob. Standardním způsobem odběru krve jsou venepunkce, alternativní metodou s možností odběru násobného množství erytrocytů při jednom výkonu je erythrocytaferéza. Cílem výzkumu bylo vytvořit soubor nemocných s nově diagnostikovanou HH, aplikovat erythrocytaferézy, ověřit jejich účinnost, optimalizovat a standardizovat léčbu s cílem snížit u pacientů hladinu feritinu v indukční fázi léčby pod 50 µg/l a následně udržovat hladinu feritinu pod 100 µg/l v udržovací fázi.

**SOUBOR NEMOCNÝCH A METODIKA:** Soubor nemocných byl vytvořen ve spolupráci s hepatologickými pracovišti hradeckého regionu, testováním příbuzných pacientů s HH a screeningem dárců krve. Pro erythrocytaferézu byl použit přístroj Haemonetics MCS+ (Haemonetics Corp., Braintree, MA, USA), jehož SW dokáže přizpůsobit odběr erythrocytů na míru každému pacientovi. Odběry v indukční fázi byly prováděny s plánovaným intervalem 10–14 dnů mezi dvěma odběry s cílem odebrat při každém výkonu 25–35 % z celkového množství erythrocytů pacienta (TEV, total erythrocyte volume). V udržovací fázi byly EAF prováděny individuálně v závislosti na rychlosti vzestupu hladiny feritinu.

**VÝSLEDKY:** Erythrocytaferézou bylo léčeno celkem 47 nemocných (37 mužů a 10 žen), průměrný věk v době zahájení léčby byl 52 let. 33 pacientů bylo nositeli homozygotní mutace C282Y, 4 pacienti byli homozygoti H63D, 3× heterozygot C282Y/H63D. Průměrná hladina feritinu před zahájením léčby byla 1429 µg/l, 51 % pacientů mělo hladinu feritinu nad 1000 µg/l. Celkem bylo hodnoceno 1086 erythrocytaferéz, 501 v indukční fázi a 585 v udržovací fázi. V indukční fázi bylo při jedné EAF odebráno průměrně 532 ml erythrocytů (550 ml u mužů a 464 ml u žen), což představuje odběr 26,5 % TEV u mužů a 31,6 % TEV u žen. Léčbu v indukční fázi dokončilo 42 pacientů, u 5 pacientů nebyla léčba dokončena (zdravotní důvody, odstěhování, úmrtí). U pacientů s dokončenou léčbou klesla průměrná hladina feritinu na 26 µg/l, u všech bylo dosaženo poklesu hladiny feritinu pod 50 µg/l. U 10,4 % výkonů v indukční fázi a u 6,8 % výkonů v udržovací fázi byly zaznamenány nežádoucí reakce: lehké vazovagální reakce nebo lehké projevy citrananové toxicity. Pouze 2 reakce byly klasifikovány jako středně

těžké (1× hypotenze a 1× citronanová toxicita). Udržovací léčbu podstupovalo celkem 33 pacientů, podle rychlosti vzestupu hladiny feritinu se prováděly 1–3 erythrocytaferézy ročně.

**ZÁVĚR:** Erythrocytaferéza je účinnou, bezpečnou a dobře tolerovanou metodou léčby pacientů s HH, což plyne z analýzy zkoumaného souboru, který je jedním z největších publikovaných souborů o léčbě HH. Cíle výzkumu byly beze zbytku splněny, byly získány další poznatky mimo původní záměr: významnost sledování feritinu jako jednoduchého parametru v prevenci významného snížení zásob železa u prvdárců ještě před jejich vstupem do dárcovství krve a krevních složek.

## SUMMARY

**INTRODUCTION:** Hereditary hemochromatosis (HH) is one of the most common hereditary diseases of the Euro-American population. The disease is caused by increased absorption of iron from the intestine, regardless of its current stores in the body. Excess iron is stored in tissues and organs and causes their significant damage. HH treatment consists of regular blood withdrawal, activation of erythropoiesis causes the utilization of excess iron and normalization of its reserves. The standard method of blood withdrawal is venipuncture, an alternative method with the possibility of collecting larger red cell volume in one procedure is erythrocytapheresis. The aim of the research was to create a group of patients with newly diagnosed HH, apply erythrocytapheresis, verify their effectiveness, optimize and standardize treatment to reduce ferritin levels in the induction phase of treatment below 50 µg/l and subsequently keep ferritin levels below 100 µg / l in the maintenance phase of treatment.

**METHODS:** The group of patient was created in cooperation with hepatology departments of the Hradec Králové region, by testing related patients with HH and by screening blood donors. For erythrocytapheresis, a Haemonetics MCS+ separator (Haemonetics Corp., Braintree, MA, USA) was used. The SW of MCS+ can modify red cell collection to each patient. Erythrocytaphereses in the induction phase were performed with a planned interval of 10–14 days between two procedures in order to collect 25–35 % of the patient's total erythrocyte volume (TEV) in each of procedures. In the maintenance phase, erythrocytapheresis was performed individually depending on the rate of increase of the ferritin level.

**RESULTS:** A total of 47 patients (37 men and 10 women) were treated with erythrocytapheresis, the average age at the start of treatment was 52 years. 33 patients carried the homozygous C282Y mutation, 4 patients were H63D homozygous, 3× C282Y/H63D heterozygous. The average ferritin level before treatment was 1429 µg/l, 51 % of patients had ferritin level above 1000 µg/l. A total of 1086 erythrocytapheresis, 501 in the induction phase and 585 in the maintenance phase were evaluated. In the induction phase, an average of 532 ml of red cells were collected in one apheresis (550 ml in men and 464 ml in women), which represents a collection of 26.5 % TEV in men and 31.6 % TEV in women. Treatment in the induction phase was completed by 42 patients, in 5 patients the treatment was not completed (medical reasons, moving, death). In patients with completed treatment, the average ferritin level dropped to 26 µg/l, and in all of them a decrease in ferritin levels below 50 µg/l was achieved. Adverse reactions were observed in 10.4 % of induction and in 6,8 % of maintenance

procedures: mild vasovagal reactions or mild manifestations citrate toxicity. Only 2 reactions were classified as moderate (1× hypotension and 1× citrate toxicity). A total of 33 patients underwent maintenance treatment, and 1 – 3 erythrocytaphereses were performed annually.

**CONCLUSION:** Erythrocyteapheresis is an effective, safe and well-tolerated treatment procedure for patients with HH. The effectiveness, safety and tolerability of this method is proven by the analysis of the test group. This analysis is one of the largest published files on the treatment of HH. The aims of the research were fully met, other findings were processed outside the original intention: the importance of monitoring ferritin as a simple prevention parameter of significant reduction of iron stores in first-time donors before entering the donation of blood and blood components.



## 1. ÚVOD

Hereditární hemochromatóza (HH) je jedním z nejčastějších autozomálně recesivně dědičným onemocněním euroamerické populace [1-6]. Jedná se o onemocnění způsobené zvýšenou absorpcí železa ze střeva bez ohledu na výši jeho aktuální zásoby v organismu; nadbytečné železo se ukládá v tkáních a orgánech a je příčinou jejich poškození [2, 7]. Onemocnění se nejčastěji projevuje až po 40. roce věku, především u mužů [5]. Pokud je HH diagnostikována a léčena včas, neovlivňuje pravděpodobnost dožití [2, 8].

## 2. ŽELEZO A JEHO METABOLISMUS

Železo je esenciálním biogenním prvkem, který je součástí všech živých buněk, od jednobuněčných organismů až po savce, účastní se mnoha biologických procesů. Železo je nezbytné k syntéze DNA, RNA a proteinů, k transportu elektronů, respiraci, proliferaci, diferenciaci a k regulaci genové exprese [9-11]. Je nezbytné k přechodu buněk z G1 do S fáze buněčného cyklu a také ovlivňuje expresi molekul, které kontrolují průběh buněčného cyklu [11]. Železo je součástí enzymů, např. oxidázy, katalázy, peroxidázy, ribonukleotidreduktázy a cytochromů [12, 13]. Vázané je součástí hemoglobinu (hemu) a dalších bílkovin.

Naproti tomu volné železo je silně reaktivní a toxické pro svoji schopnost tvorby volných radikálů při reakci s kyslíkem. Katalyzuje Fentonovu reakci,



při níž vznikají volné kyslíkové radikály (zejména hydroxylový radikál), které oxidací bílkovin, tuků a DNA způsobují poškození buněčných membrán, buněk, tkání a orgánů [10, 11].

Obsah železa v organismu dospělého muže je 35 – 45 mg na kg tělesné váhy, tj. přibližně 3 – 5 g [14, 15]. Obsah železa v organismu žen je nižší z důvodu pravidelné menstruace a těhotenství. Dvě třetiny železa (60 – 70 %) jsou obsaženy v hemu, 25 % je součástí hemosiderinu a feritinu (zásobní železo), 400 mg se nachází v proteinech obsahujících železo (myoglobin, cytochrom, kataláza atd.) a 3 – 7 mg v transferinu [15, 16]. Denní potřeba železa pro krvetvorbu je cca 20 mg, z toho 90 – 95 % (18 – 19 mg) pochází z retikuloendotelového systému (RES) recyklací z odbouraných erytrocytů [17]. Denní potřeba železa získaného absorpcí ze střeva je 1 – 2 mg. Denní ztráty železa se skládají ze ztráty 0,6 mg stolicí a 0,2 –

0,6 mg potem, močí a odloupanými buňkami pokožky [9]. Menstruační krvácení zvyšuje průměrnou denní ztrátu železa u žen o 0,8 – 1,8 mg [15].

## 2.1. RESORPCE ŽELEZA

Železo přijímané potravou se vstřebává z lumen zažívacího traktu do enterocytů v duodenu a v proximální části jejunu. Pro vstřebávání hemového a nehemového železa jsou popsány dva rozdílné mechanismy.

### 2.1.1. Vstřebávání nehemového železa

Železo z potravy je disociováno pomocí nízké hodnoty pH žaludeční šťávy. Trojmocné železo potravy ( $\text{Fe}^{3+}$ ) se při kontaktu se střevní sliznicí redukuje prostřednictvím duodenální reduktázy (DCytB) na dvojmocnou formu ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Reduktáza železa obsažená v kartáčovém lemu enterocytů společně s přenašečem DMT1 (divalent metyl transporter, Nramp2) transportuje ionty železa s využitím protonové pumpy přes apikální membránu do buňky (obr. 1). Transportní protein DMT1 není specifický jen pro železo, ale jeho prostřednictvím se vstřebávají i jiné dvojmocné ionty ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ) [18, 19].

### 2.1.2. Vstřebávání hemového železa

Absorpci hemového železa pravděpodobně zprostředkovává HCP1 (heme carrier protein 1). Hem se naváže na HCP1 na apikální membráně enterocytu, komplex je endocytózou transportován do buňky. Vzniklé endozomální váčky se dostávají k endoplazmatickému retikulu, kde je železo působením hem-oxygenázy (HO-1) uvolněno z hemu a stává se součástí nitrobuněčného poolu (obr. 1) [10, 17, 20, 21].

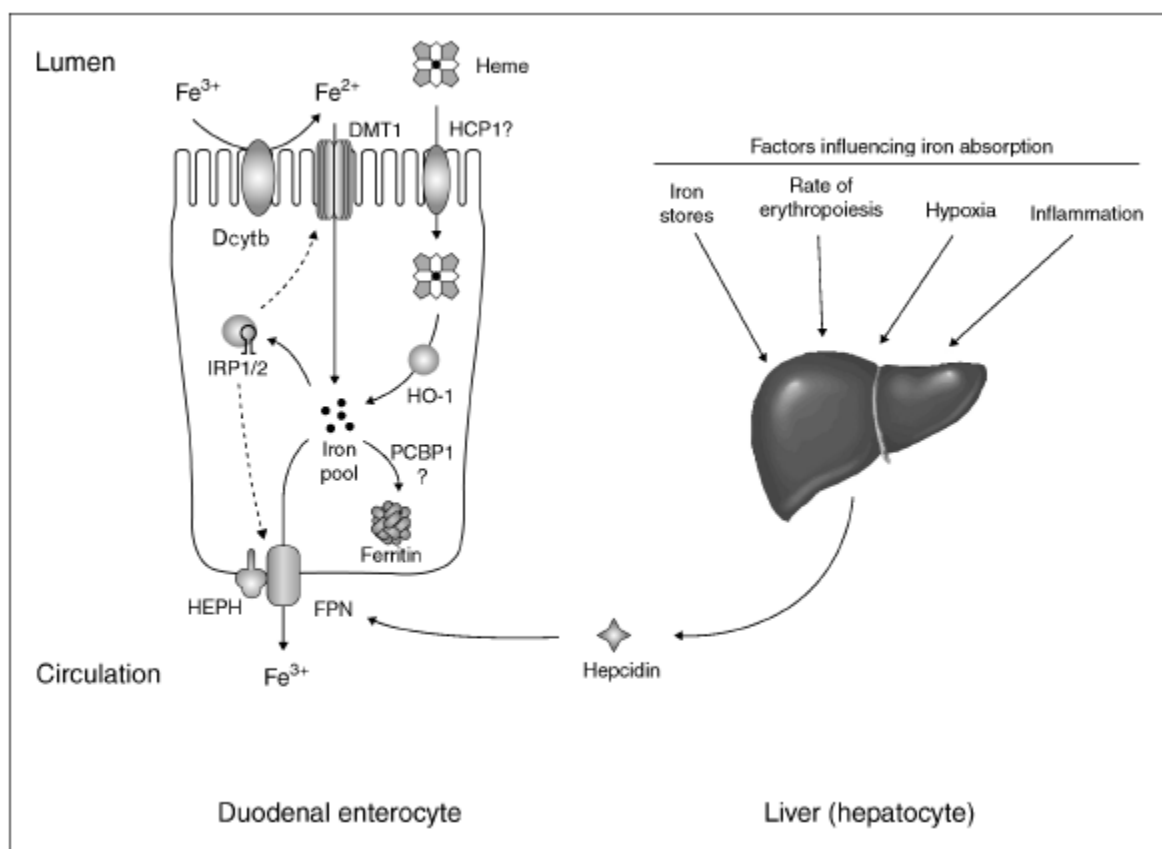
### 2.1.3. Železo v enterocytu

Vstřebažené železo se uvnitř buňky stává součástí labilního poolu, z něhož může být

- dále transportováno přes bazolaterální membránu do plazmy,
- navázáno do molekuly feritinu a takto uchováváno v enterocytu.

Nevyužité železo, které zůstalo ve formě feritinu v enterocytu, se následně vyloučí stolicí při fyziologické obměně epitelu [11, 17].

**Obr. 1 Vstřebávání železa a jeho regulace (Anderson, 2009)[20]**



*Legenda: Nehemové železo potravy je redukováno z  $Fe^{3+}$  na  $Fe^{2+}$  reduktázou DCytB.  $Fe^{2+}$  je transportováno z lumen střeva do buňky pomocí DMT1 (divalent metal transporter 1). Hemové železo je transportováno do enterocytu ne zcela objasněným mechanismem, pravděpodobně HCP1 (heme carrier protein 1). Z hemu je železo uvolněno hem-oxygenázou (HO-1). Železo absorbované oběma mechanismy se stává součástí nitrobuňčného poolu železa, ze kterého se železo vstřebává do plazmy přes bazolaterální membránu pomocí feroportinu (FPN) za účasti hefestinu (HEPH). Zbylé železo v enterocytu se váže do feritinu, pravděpodobně pomocí PCBP1 (poly-chaperon binding protein 1). K zajištění dostatečného množství železa při jeho kolísajícím příjmu potravou ovlivňují IRP1 a IRP2 (iron regulatory proteins) aktivitu DMT1 a FPN. Systémově řídí množství Fe hepcidin. Hepcidin se váže na FPN, který degraduje a tím se snižuje resorpce železa.*

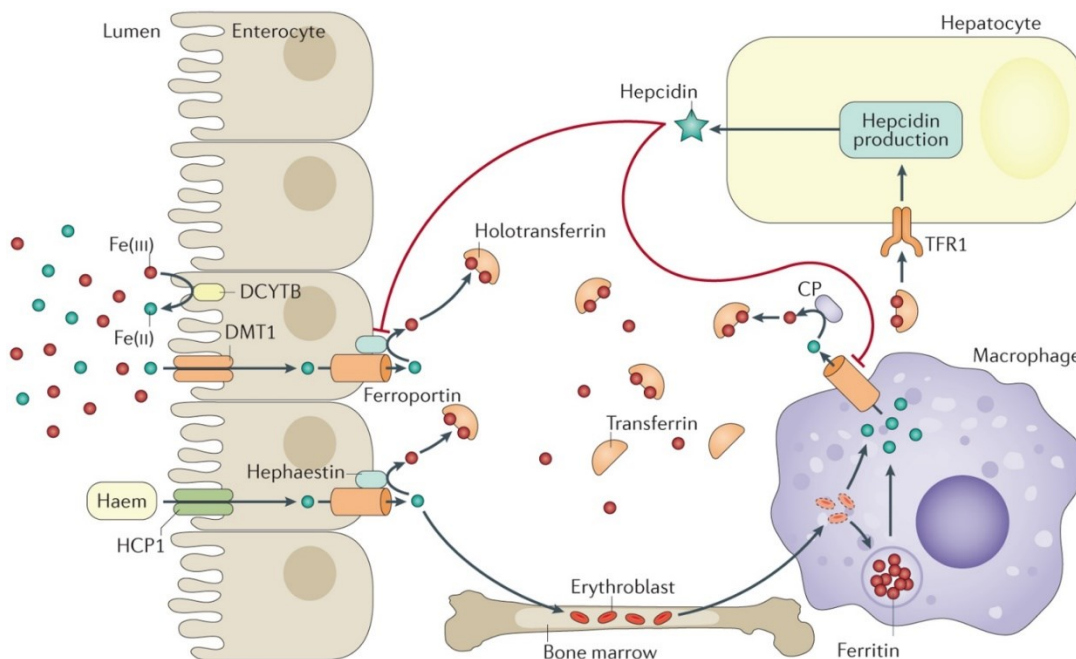
## 2.2. TRANSPORT ŽELEZA

### 2.2.1. Transport železa přes bazolaterální membránu enterocytu

Transport železa přes bazolaterální membránu enterocytu do cirkulace je zajišťován membránovým proteinem feroportinem (FPN, IREG1, MTP1). Feroportin je hlavním transportérem železa z buňky, mimo enterocytů se vyskytuje také v makrofázích, Kupfferových buňkách, hepatocytech, buňkách placentárního trofoblastu a dalších buňkách [17-19]. Před

vazbou přeneseného železa ( $\text{Fe}^{2+}$ ) na transferin je nutná jeho oxidace na trojmocnou formu ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Za tento proces je zodpovědný hefestin, membránový homolog plazmatického ceruloplazminu, plnící funkci feroxidázy (obr. 1 a 2) [20, 22].

**Obr. 2 Vstřebávání, oběh a distribuce železa, regulace hladiny železa (Brissot, 2018)[19]**



*Legenda: viz text*

### 2.2.2. Transport železa plazmou

Hlavním přenašečem železa v plazmě je transferin, bílkovina, která má 2 vazebná místa pro  $\text{Fe}^{3+}$  (obr. 2) [9, 17]. Transferin je syntetizován v játrech, v plazmě se vyskytuje v koncentraci 2 – 3 g/l. Afinita vazby železa na transferin závisí na pH. Při normálním pH plazmy (pH 7,4) se železo na transferin snadno váže, při poklesu pH pod 5,5 se železo z vazby uvolňuje. Absolutní množství železa vázaného na transferinu vzhledem k obsahu Fe v organismu je malé, typický je však velký denní obrát železa na transferinu (30 mg/den) [11, 20]. Za normálních okolností je přibližně 30% transferinu saturováno železem, převažuje monofेरická forma saturace [9].

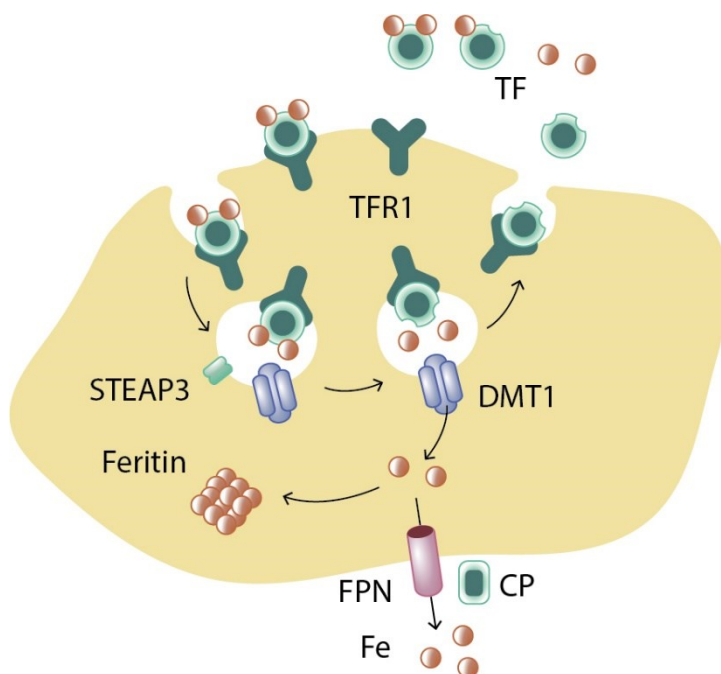
Malá část železa v plazmě je transportována nebo skladována nezávisle na transferinu, železo může tvořit nízkomolekulární komplexy vázané na citrát nebo se váže na jiné transportní bílkoviny, např. albumin, laktoferin, extracelulární feritin, haptoglobin (hemoglobin) a

hemopexin (hem). Netransferinové vazby nabývají na významu při plném nasycení kapacity transferinu (např. při heditární hemochromatóze) [11].

### 2.2.3. Transport železa do buněk

Transferin s navázaným železem se váže na transferinové receptory TfR1 cílových buněk. Při normálním pH plazmy je upřednostňována vazba transferinu se dvěma atomy železa před vazbou transferinu s jedním atomem železa. Komplex TfR1 s transferinem se zanoří do cytoplazmy ve formě endozomu (obr. 3). Protonová pumpa v endozomech sníží pH, čímž se změní konformace bílkovin, následkem této změny se uvolní železo z transferinu. Současně dojde působením ferireduktázy (STEAP3, Six-Transmembrane Epithelial Antigen of Prostate 3) k redukci  $\text{Fe}^{3+}$  na  $\text{Fe}^{2+}$  [10]. Přenašeč železa DMT1 transportuje železo ( $\text{Fe}^{2+}$ ) přes membránu endozomu do cytoplazmy. Prázdný endozom se následně přiblíží k membráně buňky a „otevře se“ do plazmy, membrána buňky se spojí s membránou endozomu, transferin (bez železa) se uvolní do plazmy a transferinový receptor TfR1 se ocitá na povrchu membrány připravený k navázání dalšího transferinu. (obr. 3) [19, 20, 22].

**Obr. 3** Transport železa do buňky (upraveno z Guo, 2016 [22] )



*Legenda: viz text*

V erytroidních prekurzorech železo vstupuje do mitochondrií, kde je zabudováno do protoporphyrinu za vzniku hemu. V ne-erytroidních buňkách je železo uchováváno ve formě feritinu nebo hemosiderinu [11, 22]. Většina nevyužitého železa je uchovávána v hepatocytech a v makrofázích. Druhý známý typ transferinového receptoru (TfR2) se nachází pouze na hepatocytech, prekurzorových buňkách enterocytů a červené krevní řady, má nižší afinitu k transferinu a má spíše funkci signální než transportní (viz kap. 2.3.2.) [17].

## 2.3. REGULACE METABOLISMU ŽELEZA

Hladina železa a jeho zásoby jsou regulovány několika zpětněvazebnými mechanismy, jejichž cílem je udržet optimální množství železa

- v každé buňce,
- v celém organismu.

### 2.3.1. Regulace hladiny železa v buňce

Homeostáza železa v buňkách je zajišťována systémem IRP/IRE (iron regulatory proteins, iron responsive elements). IRP1 a IRP2 monitorují hladinu Fe v buňce. V případě poklesu hladiny Fe v buňce dojde k vazbě IRP na IRE s následným zvýšením aktivity proteinů zodpovědných za transport Fe do buňky (TfR1 a DMT1) a naopak k útlumu proteinů zodpovědných za odsun Fe z buňky (feroportin, ukládání Fe do feritinu) [20, 22].

### 2.3.2. Hepcidin

Hlavním regulátorem Fe v organismu je hepcidin, který byl objeven v roce 2000 jako nový antimikrobiální protein s úzkým vztahem k imunitě [9, 12, 22]. Tvorbu hepcidinu kóduje gen HAMP (Hepcidin Antimicrobial Peptide), lokalizovaný na 19. chromozomu (19q13). Hepcidin je produkován především v hepatocytech, jako další možné zdroje hepcidinu byly popsány tukové buňky, makrofágy, lymfocyty, neutrofilny, beta buňky pankreatu a buňky ledvin. Význam produkce hepcidinu mimo hepatocyty nebyl dosud objasněn [12]. V současnosti jsou známy 3 izoformy hepcidinu (20, 22 a 24 aminokyselin), které vznikají proteolýzou biologicky neaktivního prohepcidinu (84 aminokyselin) [12, 13].

Hlavním účinkem hepcidinu je degradace feroportinu. Hepcidin se váže na feroportin, při vazbě dojde k fosforylaci tyrosinu cytoplazmatické domény feroportinu. Komplex feroportin–hepcidin je poté internalizován, defosforylován a degradován [9, 20]. Vzhledem k tomu, že

hlavní funkcí feroportinu je transport železa z buněk do plazmy (především z hepatocytů, enterocytů a makrofágů), je hepcidin zodpovědný za snižování hladiny železa v cirkulaci.

Exprese hepcidinu je ovlivňována několika faktory [9, 20, 22, 23]

- zásobou železa,
- hypoxií,
- zánětem.

#### 2.3.2.1. Vliv zásoby železa na produkci hepcidinu

Zvýšené zásoby železa vedou ke zvýšené produkci BMP (bone morphogenic factors) v jaterních buňkách. BMP se váže na BMP receptor (BMPR), který je na membráně hepatocytu vázaný na hemojuvelin (HJV). Vazba BMP-BMPR aktivuje přes fosforylaci signálních proteinů SMAD 1, 5 a 8 vznik komplexu SMAD 4. Tento komplex vstupuje do jádra hepatocytu, kde vyvolá transkripci HAMP s následnou produkcí hepcidinu (obr. 4).

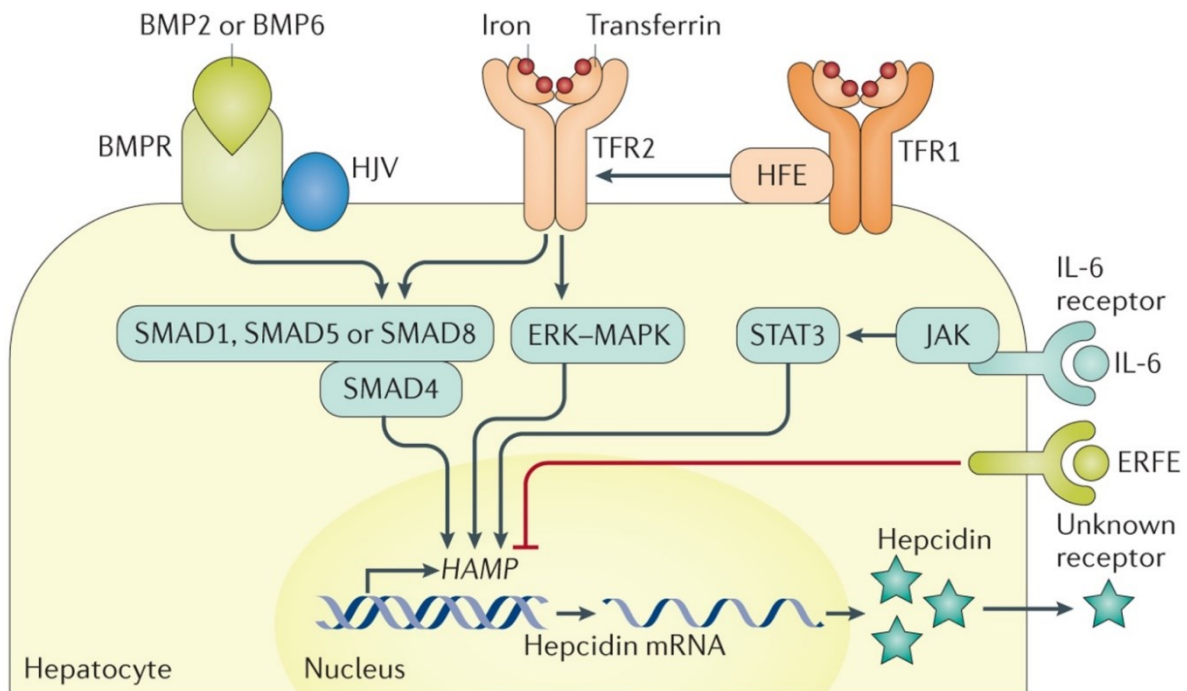
Produkce hepcidinu je při zvýšené hladině železa stimulována i dalšími mechanismy. Na hepatocytu se nacházejí transferinové receptory 1 a 2 (TfR1 a TfR2) a HFE, které při zvýšené hladině Fe reagují s hemojuvelinem, výsledkem reakce je aktivace SMAD/HAMP dráhy a produkce hepcidinu (obr. 4). Také samotná zvýšená saturace transferinu aktivuje HAMP a produkci hepcidinu přes ERK (extracellular signal regulated kinase) (obr. 4) [9, 19].

Pokud je železa nedostatek, výše uvedené mechanismy jsou utlumeny, tvorba hepcidinu je snižována. Navíc jsou při nedostatku železa aktivovány další geny, např. TMPRSS6 (transmembrane protease serine 6), jehož produktem jsou proteiny štěpící hemojuvelin na membráně hepatocytu. To vede k útlumu dráhy SMAD/HAMP a k snížené produkci hepcidinu [9, 14, 19].

#### 2.3.2.2. Vliv hypoxie na produkci hepcidinu

Hypoxie vede k poklesu produkce hepcidinu, pravděpodobně cestou stimulace juxtaglomerulárního aparátu ledvin → stimulace erytropoézy (erythropoetin) → zvýšení spotřeby železa → snížení saturace transferinu → útlum produkce hepcidinu cestou BMP-BMPR-SMAD4 [9, 11, 21]. Funkčnost této osy podporují nálezy snížených hladin hepcidinu u osob, jimž je podáván erythropoetin [24]. Navíc erytroblasty produkují erytoferrone (ERFE), který zatím neznámým mechanismem tlumí produkci hepcidinu (obr. 4) [9, 19].

**Obr. 4** *Produkce hepcidinu v hepatocytu a jeho regulace (Brissot, 2018) [19]*



*Legenda: viz text*

### 2.3.2.3. Vliv zánětu na produkci hepcidinu

Zánětlivé stavy vedou ke zvýšené tvorbě IL-6, který se váže na receptor membrány hepatocytu, což vede k aktivaci Jak-kinázy a STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) a indukci tvorby hepcidinu (obr. 4) [19]. Následné snížení dostupného železa pro patogeny, které zánětlivou reakci vyvolaly, je obranným mechanismem organismu před infekcí. Vedlejším účinkem této obranné reakce je ale snížení dostupnosti železa pro erythropoezu, což vede k vzniku anémie chronických chorob [9, 10, 23]. Naopak mutace genu pro IL-6 může vést k akumulaci železa v organismu [25].



### 3. PORUCHY METABOLISMU ŽELEZA

Poruchy metabolismu železa patří mezi nejčastější patologické stavy, se kterými se lékaři setkávají v klinické praxi. Lze je rozdělit na onemocnění způsobená

- nedostatkem železa,
- přetížením organismu železem.

#### 3.1. NEDOSTATEK ŽELEZA

Absolutní nebo relativní nedostatek železa vede k sideropenii, jejímž nejčastějším projevem je sideropenická anémie. Existuje celá řada stavů vedoucí k negativní bilanci železa. Nejčastějšími příčinami jsou [9, 16, 26]:

- nedostatek železa v potravě typický pro oblasti s nedostatečnými zdroji potravy, při podvýživě a u vegetariánů,
- poruchy vstřebávání železa, např. stavy po resekcii žaludku, malabsorpce, záněty střeva, nadbytek fyátů v potravě atd.,
- zvýšená spotřeba železa typická pro období růstu, pro pubertu, těhotenství, laktaci, léčbu anémií erythropoetinem atd.,
- zvýšené ztráty železa způsobené krvácením, např. meno a metrorrhagie, vředová choroba, nádory GIT, opakované epistaxe, hematurie, dárcovství krve a krevních složek atd.

#### 3.2. NADBYTEK ŽELEZA

K přetížení organismu železem vede celá řada mechanismů nebo patologických stavů [3, 9, 27], např.

- zvýšené vstřebávání železa při zvýšené (inefektivní) erythropoéze,
- chronická léčba transfuzemi,
- zvýšený příjem železa potravou,
- jaterní choroby, např. jaterní cirhóza, chronická hepatitida C, alkoholické hepatopatie atd.,
- anémie chronických chorob a sideroblastické anémie,
- dědičné poruchy metabolismu železa, např. hereditární hemochromatóza, atransferinémie, aceruloplazminémie atd.

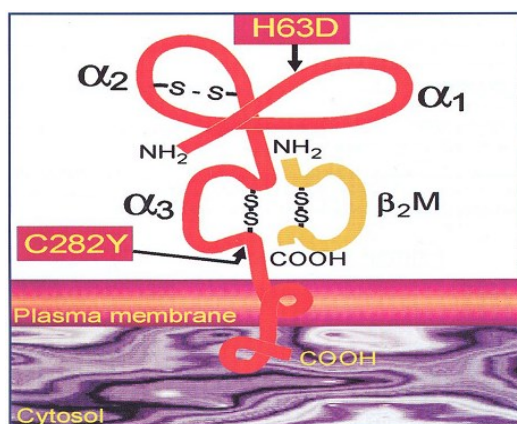
## 4. DĚDIČNÉ CHOROBY S AKUMULACÍ ŽELEZA

Nejznámějším zástupcem dědičných chorob, jejichž následkem je akumulace železa v organismu pacienta, je hereditární hemochromatóza (HH). Již v 19. století popsali Rousseau (1865) a Troisier (1871) klinickou jednotku kombinující diabetes mellitus, bronzovou pigmentaci kůže a jaterní cirhózu (cit. dle [11]). Název choroby hemochromatóza použil von Recklinghausen v roce 1889 díky záchytu těchto symptomů u zemřelých osob s typickým nálezem na játrech (cit. dle [11]). V roce 1935 Sheldon označil hemochromatózu za geneticky podmíněné onemocnění, jehož příčinou jsou depozita železa ve tkáních [28]. V 70. a 80. letech 20. století bylo vysloveno podezření na asociaci hemochromatózy s HLA-A antigeny, které se nacházejí na krátkém raménku 6. chromozomu [29, 30]. V roce 1996 byl na krátkém raménku 6. chromozomu v blízkosti oblasti kódující HLA-A antigeny identifikován gen hereditární hemochromatózy, byl označen jako HFE [31]. Tento objev vyvolal explozi zájmu o výzkum železa a jeho metabolismu, stejně jako o výzkum HH. Na základě postupně objevovaných genetických poruch zasahujících do metabolismu železa se HH rozdělila do 4 podtypů (HFE 1 – HFE 4) [3-6]. Často je názvem hereditární (někdy též klasická) hemochromatóza myšleno pouze onemocnění způsobené mutacemi v HFE genu (HFE 1), které je ze všech podtypů HH nejčastější.

### 4.1. HEREDITÁRNÍ HEMOCHROMATÓZA – TYP 1 (HFE 1)

Základní poruchou u hemochromatózy typu 1 je mutace HFE genu. HFE gen má 7 exonů, je umístěn na krátkém raménku 6. chromozomu (6p22.2) v úzké vazbě k HLA genům I. třídy [4]. Produktem HFE genu je HFE protein (obr. 5), který má významný podíl na regulaci zásob železa v organismu. HFE protein má 3 extracelulární domény ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ), transmembránovou a cytoplazmatickou část. S transferinovým receptorem TfR1 interaguje pomocí místa mezi  $\alpha 1$  a  $\alpha 2$  smyčkou. Cysteinové můstky v  $\alpha 2$  a  $\alpha 3$  doméně způsobují takovou prostorovou strukturu proteinu, která je nutná pro udržení vazby s dalšími molekulami.  $\beta 2$ -mikroglobulin se váže kovalentní vazbou k doméně  $\alpha 3$ , čímž vzniká heterodimer schopný vázat se na TfR1 [11].

**Obr. 5** *Struktura HFE proteinu (Parkkila, 2001)[32]*

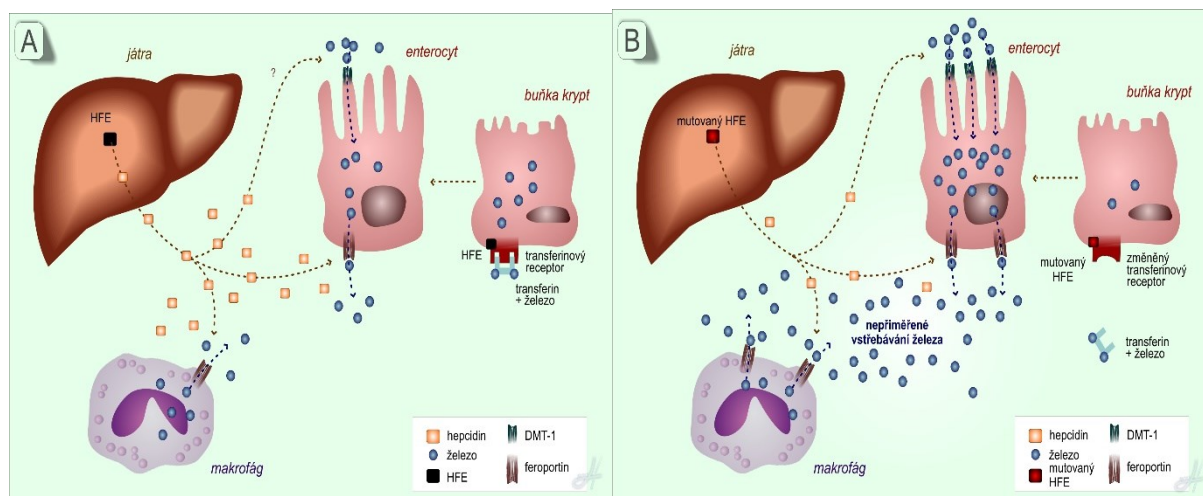


*Legenda: viz text*

HFE protein je vázaný spolu s  $\beta$ 2-mikroglobulinem na membrány buněk, především na epitelové buňky krypt duodena a hepatocyty. Vazba HFE s transferinovým receptorem 1 ovlivňuje afinitu TfR1 k transferinu s navázaným železem a podporuje vychytávání železa vázaného na transferin (obr. 4) [19]. Cirkulující transferin s železem se váže na komplex HFE/ $\beta$ 2-mikroglobulin/TfR1. Celý komplex je internalizován [11, 21, 33]. V buňce je pak železo uvolněno z transferinu. Podle množství uvolněného železa tak buňka dostává informaci o množství cirkulujícího železa. Železo v cytosolu determinuje aktivitu regulačních proteinů, které monitorují hladinu železa (IRP 1 a IRP 2, iron regulatory protein). Kombinací transkripčních a posttranskripčních mechanismů se nastaví úroveň exprese proteinů uplatňujících se při absorpci železa [11, 21]. V případě dostatku železa v organismu, při správné funkci HFE proteinu, buňky krypt následně vyzrávají v enterocyty lokalizované na vrcholcích klků s informací, že je železa dostatek. V průběhu maturace tak dochází k inhibici syntézy proteinů, které podporují vstřebávání železa (DCytB, DMT1, ferroportin, hefeštin). Výsledkem je snížená absorpce železa v duodenu (obr. 6A). Jestliže však funkční HFE protein chybí (při HH), přenos železa do buněk krypt pomocí systému transferin/TfR1 je narušen a buňka ztrácí schopnost správně rozpoznat vysokou hladinu cirkulujícího železa vázaného na transferin [10, 34, 35]. Buňka reaguje na „falešný“ nedostatek Fe zvýšením syntézy proteinů podporujících vstřebávání železa, i když jsou hladiny železa nepřiměřeně vysoké (obr. 6B) [11, 12, 34].

U pacientů s hemochromatózou jsou hladiny hepcidinu významně sníženy. Nefunkční HFE protein snižuje produkci hepcidinu v játrech a snižuje jeho vazbu na ferroportin. Ferroportin není následně internalizován a degradován, ale naopak se podílí na zvýšeném uvolňování železa z enterocytů a makrofágů [4, 9-11, 21, 36, 37].

**Obr. 6** Regulace metabolismu Fe: (A) při funkčním HFE genu a (B) při mutaci HFE genu (upraveno z Yen, 2006) [34]



*Legenda: viz text*

Výše popsaný patofyziologický mechanismus regulace železa vysvětluje nálezy zjišťované u HH. U hereditární hemochromatózy je denní absorpce železa zvýšená, stoupá až na 8 až 10 mg denně a zůstává takto zvýšená dlouhé roky [3, 38]. Neregulovaný přechod železa z lumen střeva do plazmy má za následek, že v enterocytech je relativní nedostatek železa, enterocyty obsahují i méně feritinu než jiné buňky (včetně hepatocytů) v lidském těle, proto je odpad železa stolicí minimální [39, 40].

Mimo zvýšené resorpce železa ze střeva jsou zdrojem vysoké koncentrace plazmatického železa makrofágy [10, 14, 41]. Makrofágy uvolňují více železa [42] a obsahují u HH méně železa vázaného na transferin než makrofágy zdravých jedinců [43]. Příčinou této poruchy makrofágů je nefunkční HFE protein [44], což bylo experimentálně prokázáno pokusem, kdy po vpravení normálního genu HFE do makrofágu došlo k úpravě jejich defektu [43].

#### 4.1.1. Mutace HFE genu

##### 4.1.1.1. Mutace C282Y

Nejčastější příčinou hereditární hemochromatózy v kavkazské populaci je mutace genu HFE C282Y [3, 4]. Ta je způsobena záměnou cysteinu za tyrosin HFE genu v poloze 282, lokalizovaná ve 4. exonu [31]. Důsledkem mutace je změna struktury proteinu HFE, který nemůže vytvořit cysteinový můstek ve své struktuře –  $\alpha 3$  doméně. Současně je porušena schopnost vazby  $\beta 2$ -mikroglobulinu, oba mechanismy jsou příčinou porušené funkce HFE proteinu [45].

#### 4.1.1.2. Mutace H63D

Méně častou příčinou HH je mutace H63D, při níž je histidin nahrazen kys. aspartamovou v poloze 63 exonu 2. Mutace vede k poruše  $\alpha 1$  domény HFE proteinu, nevede k poruše tvorby disulfidických vazeb a vazby  $\beta 2$ -mikroglobulinu [45].

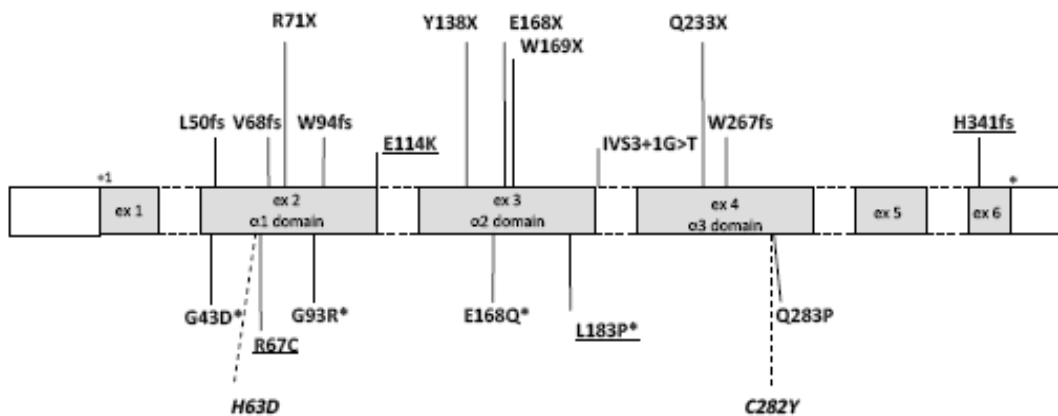
#### 4.1.1.3. Mutace S65C

Mutace S65C byla zjištěna u části nemocných HH, především v kombinaci s heterozygotní mutací C282Y. Je způsobena mutací exonu 2 genu HFE, důsledkem je náhrada serinu cysteinem v pozici 65 [46].

#### 4.1.1.4. Další mutace HFE genu

Intenzivním výzkumem u osob trpících HH byly zjištěny další mutace HFE genu. Jedná se o vzácné mutace doposud popsané u několika málo jedinců (obr. 7) [6, 47, 48].

**Obr. 7** *Vzácné mutace HFE genu (Aquilar-Martinez, 2011)[47]*



*Legenda: viz text*

#### 4.1.2. **Výskyt mutací HFE genu**

Frekvence mutace C282Y v Evropě je nehomogenní. Prevalence mutace C282Y v Evropě je od 0.4 % do 14.2 % v homozygotním nebo heterozygotním stavu [4, 6, 49-51], frekvence alely klesá v Evropě od severu k jihu a od západu k východu, což nasvědčuje keltskému či vikingskému původu mutace [50]. Její nejvyšší výskyt byl zjištěn v Irsku (14.2 %) [51], západní

Francii (9,4 %) [52], Walesu (8,3 %) [53], Faerských ostrovech (8,1 %) [54], Švédsku (6,2 %) [55] a Dánsku (5,7 %) [54]. Ve střední Evropě je prokazován výskyt mutace v rozmezí 3 – 5 %, např. v Polsku 3,1 % [56], v Maďarsku (3,4 %) [57], v Rakousku (3,7 %) a Německu 3,8 %) [58]. Nejnižší výskyt mutace je v jižní Evropě - v Itálii (1,6 %) [58] a Řecku (1,3 %) [58]. Vzhledem k rozšíření v Evropě a odhadu stáří mutace byla vyslovena domněnka o vzniku mutace C282Y ve vikingské populaci před 1100 – 1300 lety, která byla při výbojích Vikingů šířena populační migrací na další obyvatele Evropy (obr. 8) [59, 60].

**Obr. 8 Rozšíření mutace C282Y genu HFE v Evropě [59]**



*Legenda: viz text*

To vysvětluje dnešní nerovnoměrné rozšíření mutace v Evropě s maximem v severozápadní Evropě a klesajícím výskytem směrem na jih a na východ. Genetický defekt mohl být pozitivně selektován vzhledem k tomu, že v minulosti neohrožoval na životě, nezkracoval dožití (při průměrné odhadované střední délce života do 40 let) a mohl znamenat výhodu při rychlejší reparaci následků krvácení u mužů (poranění) i u žen (menstruačním krvácením a četná těhotenství) při současném nedostatečném obsahu železa v potravě [61]. Podobně se migrační vlnou před 400 lety dostala mutace genu do Severní Ameriky [62], později na Nový Zéland [63] a do Austrálie [64]. Mutace není přítomna nebo jen ve velmi nízké frekvenci u

nekavkazské populace, tj. u Afričanů, Asiatů nebo původních obyvatel Austrálie [59, 65] a zřídka vzniká spontánně se objevící mutací [61].

Mutace H63D je starší mutací než C282Y a přináší větší diverzitu haplotypů. Tato mutace je široce rozšířena a zdá se, že se objevila spontánně. Alela je v Evropě přítomna u 5 - 20 % populace (nejvyšší výskyt je zaznamenán kolem Středozemního moře a v baskické populaci) dále se vyskytuje na Středním a Dálném Východě a na Indickém subkontinentu [59, 61, 66]. Mutace H63D je heterozygotní až u 28% severoevropského obyvatelstva [4, 67].

Mutace S65C se vyskytuje v evropské populaci ve frekvenci do 0,5 – 2,0 % [68], vyšší frekvence (3 %) byla zachycena ojediněle pouze v severní Skandinávii v populaci Saami [69].

#### **4.1.3. Výskyt mutací HFE v České republice**

Přítomnost mutací HFE u nepříbuzenské zdravé populace byla zjišťována u 257, resp. 481 novorozenců z celé ČR [68, 70] a u 139 klientů fertilizačního centra (pouze mutace C282Y) [71]. V souborech vyšetřovaných nebyl nalezen žádný homozygot C282Y ani S65C. V největším souboru 481 vyšetřených vzorků bylo zachyceno 33 heterozygotů C282Y, 8 homozygotů H63D, 128 heterozygotů H63D a 12 heterozygotů S65C [68]. U celkem 9 novorozenců byla zachycena smíšená heterozygocie mutací C282Y/H63D a u dvou heterozygocie C282Y/S65C. Vypočtené frekvence mutantních alel C282Y (3,43 %), H63D (14,97 %) a S65C (1,25 %) odpovídají výskytu mutací v ostatních středoevropských populacích [70].

#### **4.1.4. Vztah mezi mutacemi HFE a chorobou**

Pozitivní nález mutace HFE genu neznamena, že skutečně dojde k rozvinutí klinických příznaků hereditární hemochromatózy [3]. Pozitivní závislost je nejvíce vyjádřena u homozygotů C282Y [1]. Mutace C282Y je majoritní mutací zodpovědnou za rozvoj klinických známek hereditární hemochromatózy. V západní, severní a střední Evropě je 70 – 90 % pacientů s klinicky vyjádřenou HH nositelem právě této mutace v homozygotní formě [2]. Ve Velké Británii více než 90 % a v Irsku více než 95 % pacientů s hemochromatózou jsou C282Y homozygoti [53]. Počty klinicky nemocných osob neodpovídají výskytu mutací. Nejčastěji udávaná prevalence choroby diagnostikovaná na základě vyšetření parametrů železa v kavkazské populaci je 1 na 200 – 400 obyvatel (USA, Velká Británie, Francie), v některých zemích je výrazně vyšší (Irsko 1/100 obyvatel), na jihu Evropy je významně nižší (Itálie 1/3900 obyvatel) [27]. Při porovnání podstatně vyššího výskytu mutací v populaci s počty klinicky



nemocných se předpokládá, že klinická penetrance není vysoká ani u homozygotních nositelů HFE mutace C282Y, je udávána mezi 1 – 50 %. [2, 3, 11, 18, 72-75]. Ve srovnání s klinickou penetrací je biochemická penetrance (zvýšení hladiny feritinu a saturace transferinu) udávána ve vyšším procentu, 75 % u mužů a 50 % u žen [2].

Vzhledem k rozdílné klinické penetraci choroby existuje značná variabilita klinických nálezů ve vztahu k věku a pohlaví [76]. U neléčených C282Y homozygotních osob postupně narůstají hodnoty saturace transferinu. Hodnota saturace transferinu může být vyšší než 0,45 již v mládí, ale jak prokázal Waalen, u 60 % C282Y homozygotů nemusí být nalezeny zvýšené hodnoty ani v dospělosti po 40. roce věku [77]. Naproti tomu populační studie z Austrálie [74], Evropy [78], Spojeného království [73] a Severní Ameriky [72] popisují, že až 75% homozygotů C282Y mají zvýšenou saturaci transferinu a koncentraci železa v séru. Obdobné rozdíly v biochemických výsledcích byly nalezeny při studiu v souboru C282Y homozygotních žen [79, 80]. Rozdílnou penetrací lze vysvětlit i rozdílný výskyt postižení jater [81]. Hepatopatii s fibrózou nebo s cirhózou našel Bulaj [82] u 15 % pacientů (z 210 homozygotů C282Y), ale Asberg [78] pouze u 3 % (ze 400 homozygotů C282Y). Naproti tomu Beutler [72] našel až u 26 % pacientů zvýšené koncentrace kolagenu IV v séru jako markeru jaterní fibrózy.

Homozygotní genotyp H63D má nízkou klinickou penetranci [67], vzácně vede tato mutace ke strádání železa v organismu [63, 74]. Klinický význam této mutace se zdá být omezený [67].

Nositelé smíšené heterozygotní mutace C282Y/H63D jsou predisponováni k akumulaci železa, i když je penetrance onemocnění nízká (1 – 2 %) [3, 61], vyšší je u žen než u mužů [83]. Podle jiných zdrojů je tato mutace zodpovědná za 3 – 5 % klinicky významných hereditárních hemochromatóz [2, 51].

Klinický význam dalších vzácných forem kombinovaných heterozygotů, jako je heterozygotie pro C282Y/S65C a heterozygotie pro H63D/S65C, je zatím sporný, přestože byli zaznamenáni nemocní s mírnými známkami akumulace železa [48, 84, 85]. Pokud jsou nalezeni jedinci s klinickými projevy HH a současně mají pouze heterozygotní mutaci C282Y nebo H63D, předpokládá se, že daný jedinec má nějakou další, nepoznanou nebo zatím neznámou mutaci způsobující akumulaci železa v organismu [6, 47].

## **4.2. JUVENILNÍ HEMOCHROMATÓZA, TYP 2 (HFE 2)**

Podle postiženého genu se rozděluje do dvou podtypů, typ A je způsoben poruchou genu pro hemojuvelin, postižení genu HAMP je příčinou typu B [4].



#### **4.2.1. Juvenilní hemochromatóza, typ 2A s defektem genu HJV**

Jedná se o onemocnění s autozomální recesivní dědičností [86]. U tohoto typu juvenilní hereditární hemochromatózy byla jako příčina určena mutace na chromozomu 1q21 [3, 87], kde je uložen gen pro produkci hemojuvelinu (HJV) [88]. Obdobně byla mutace HJV zjištěna v rodinách s 1q- vázanou juvenilní hemochromatózou.

Hemojuvelin je součástí signálních a regulačních mechanismů železa (viz kap. 2.3.2.), moduluje expresi hepcidinu. U osob s mutací HJV jsou hladiny hepcidinu sníženy [3, 88], což vede k zvýšenému neregulovanému vstřebávání železa. Klinicky významným faktem je, že choroba se projevuje již v mládí a má těžší průběh [4]. Akumulace železa v organismu u těchto mladých nemocných markantně převyšuje hodnoty nalézané u HFE 1 formy u dospělých [89]. Skladování železa v plazmě a jeho nadbytek v orgánech (což má odraz ve zvýšených saturacích transferinu a vyšších koncentracích feritinu v séru) jsou prokazovány již v mládí bez rozdílu u obou pohlaví. Jaterní biopsie prokazují depozita železa v parenchymu podobně uspořádaná jak u HFE 1 tak i u HFE 3 formy hereditární hemochromatózy [90]. Symptomatické projevy poškození orgánů se objevují již v druhé dekádě života. Ačkoliv jaterní poškození má konstantní charakter, jsou diabetes mellitus, hypogonadismus, kardiomyopatie, arytmie a srdeční poškození daleko častější než u HFE1 [91, 92]. Naopak karcinom jater je vzácný, pravděpodobně z důvodu krátkého života těchto pacientů [93]. Smrt před 30. rokem věku, nejčastěji způsobená neřešitelným srdečním poškozením, není vzácná [4].

#### **4.2.2. Juvenilní hemochromatóza, typ 2B s mutací genu HAMP**

Jde o vzácné autozomálně dominantní onemocnění, jehož příčinou je mutace HAMP genu lokalizovaného na chromozomu 19q13, který kóduje tvorbu hepcidinu [94]. Nedostatek hepcidinu způsobuje neregulovanou akumulaci železa. Choroba postihuje, obdobně jako u typu 2A, jedince v mladém věku bez rozdílu pohlaví. Klinické projevy u typu 2B bývají těžší než u typu 2A, což je způsobeno úplným chyběním hepcidinu (na rozdíl od typu 2A, kde je hladina hepcidinu snížena). Mimo postižení jater je časté postižení myokardu, které je nejčastější příčinou smrti v mladém věku [95].

### **4.3. HEMOCHROMATÓZA TYP 3 S DEFEKTEM GENU PRO TFR2 (HFE 3)**

HFE 3 je autozomální onemocnění poprvé popsané v jižní Itálii, je způsobené mutací receptoru 2 pro transferin (TfR2) na chromozomu 7q22 [11, 96-98]. TfR2 byl objeven v roce

1999, jeho struktura je podobná TfR1, byla prokázána 66% shoda s TfR1 [99]. TfR2 in vitro navozuje vychytávání železa vázaného na transferinu [100] mechanismem podobným jako je popsán u TfR1. Oba receptory se liší svojí afinitou k transferinu in vitro [101]. Jejich vyšší koncentrace jsou exprimovány na hepatocytech a se stoupající koncentrací železa v játrech je jejich exprese snižována [102, 103]. TfR2 je nedílnou součástí regulace systézy hepcidinu (viz kap. 2.3.2.) [9, 19]. Onemocnění HFE 3 je vzácné, klinicky je velmi podobné klasické HFE 1 hereditární hemochromatóze s časnějším nástupem klinických příznaků, především artropatie, pigmentace kůže, poškození jater, pankreatu a srdce [3, 11, 104, 105].

#### **4.4. HEMOCHROMATÓZA TYP 4, MUTACE GENU PRO FERROPORTIN (HFE 4)**

Dědičný typ hemochromatózy 4 byl klinicky rozpoznán v roce 1999 a identifikován v roce 2001 [106]. Jedná se o autozomálně dominantně vázané onemocnění, přetížení organismu železem bylo popsáno u 3 rodin [107-109], u kterých byla prokázána mutace genu pro ferroportin [45, 110]. Genetická mutace ferroportinu byla také popsána u sub-saharské populace, u které byl za příčinu akumulace železa dříve považován výhradně vysoký příjem železa potravou [111]. Jeden nálezy mutace byl zaznamenán v Melanézii [112].

Gen, který kóduje ferroportin, je známý jako IREG1 [113] a MTP1 [114]. Ferroportin je bílkovina zajišťující buněčný export železa ve střevu a buňkách (viz kap. 2.2.1.) [108, 109]. Podle typu mutace genu pro ferroportin se HFE 4 rozděluje do dvou podtypů, HFE 4A a HFE 4B.

##### **4.4.1. HFE 4A – nefunkční ferroportin**

Jde o autozomálně dominantní onemocnění, mutace ferroportinu vede k neschopnosti transportu železa, protože je ferroportin zadržován v endoplazmatickém retikulu [11]. U tohoto typu hemochromatózy je selektivní nadbytek železa v Kupferových buňkách spojen s normální saturací transferinu. Tyto nálezy svědčí o tom, že gen je nezbytný pro uvolňování železa z makrofágů (pocházejícího z rozpadlých erytrocytů) do cirkulace vazbou na transferin [107, 108]. Absence aktivity ferroportinu vede k hromadění železa, především v makrofázích v játrech a ve slezině, méně v hepatocytech a enterocytech. Snižuje se dostupnost železa pro vazbu na transferin a tím i pro dodávku do kostní dřeně [3]. Hodnoty saturace transferinu zůstávají dlouho nízké nebo normální až do pozdních stádií choroby. U tohoto typu bývá klinicky mírnější průběh, protože se železo ukládá spíše do buněk retikuloendotelu než do parenchymatózních buněk [4]. K diagnóze spíše přispívají koncentrace sérového feritinu než

hodnoty saturace transferinu. Hodnoty feritinu bývají vysoké již v prvním desetiletí života a neklesají po terapii flebotomiemi. Naopak, agresivní flebotomie může vyústit až v anémii [3].

#### **4.4.2. HFE 4B – částečně funkční ferroportin**

Jde o autozomálně dominantní onemocnění, mutace vede k produkci ferroportinu, který je rezistentní na hepcidin. Ferroportin je sice schopen transportovat železo, ale nereaguje na řízení hepcidinem [107, 108]. Klinické projevy jsou obdobné jako u klasické HH, v klinickém obrazu dominuje únava a bolesti kloubů, léčba venepunkcemi je účinná [3, 115].

### **4.5. DALŠÍ DĚDIČNÉ CHOROBY Z PŘETÍŽENÍ ŽELEZEM**

Existuje několik dalších, vzácných chorob způsobených mutacemi ostatních genů primárně se podílejících na homeostáze železa. Jedná se již o syndromy klinicky odlišné od hereditární hemochromatózy.

#### **4.5.1. Aceruloplazminémie**

Aceruloplazminémie je autozomálně recesivní chorobou způsobenou mutacemi v genu pro ceruloplazmin. Při defektu ceruloplazminu dochází ke ztrátě ferroxidázové aktivity v plazmě, přičemž tato ztráta sníží odvádění buněčného železa a jeho navázání na transferin [11]. Železo se hromadí v různých orgánech, včetně jater. Depozita železa v mozku (v neuronech i gliových buňkách) ovlivňují jeho rozvoj a vedou téměř pravidelně k neurologickým abnormalitám, cerebrální ataxii. Feritin je zvýšený, sérové železo je sniženo. Železo není transportováno v dostatečném množství do kostní dřeně, proto se vyvíjí anémie. Absorpce ze střeva je zvýšená, protože transport z enterocytů je zajišťován pomocí hefestinu, homologu ceruloplazminu. K léčbě jsou využívány cheláty, které zastaví progresi choroby, efektivní je doplnění ceruloplazminu podáním plazmy či jeho koncentrátu. Flebotomie v léčbě nelze využít pro anémii a zhoršenou recyklaci železa [11, 116].

#### **4.5.2. Atransferinémie a hypotransferinémie**

Při atransferinémii nebo hypotransferinémii je poškozen plazmatický transport železa a jeho dodávka do kostní dřeně [117]. Jde o autozomálně recesivně děděnou chorobu. Jejím hlavním rysem je výrazná anémie a extrémní zvýšení hladiny feritinu, přetížení železem v ostatních tkáních vyplývá z kompenzačního vzrůstu střevní absorpce železa [118].

#### **4.5.3. Mutace genu pro feritin v H oblasti**

Jedná se o autozomálně dominantně vázané onemocnění projevující se nadměrných strádáním železa v organismu, které bylo popsáno u jedné japonské rodiny. Mutace byla detekována v části genu zodpovědného za syntézu feritinu, defekt je v regulační oblasti H podjednotky. Tato mutace zvyšuje vazebnou afinitu IRE pro IRP1 a IRP2, což vede k snížení vazby železa k feritinu a k zvýšenému vstupu železa do buněk [119].

#### **4.5.4. Strukturální změny haptoglobinu**

Nadbytek železa v organismu může být také způsoben polymorfismem haptoglobinu a plazmatickými proteiny vázajícími hemoglobin, které umožní jaterní recyklaci volně cirkulujícího hemoglobinu. Muži mající polymorfismus v haptoglobinu Hp 2-2 mají vyšší plazmatické koncentrace železa a jeho vyšší zásoby než jedinci s polymorfismem Hp 1-1 nebo Hp 1-2 [120].

#### **4.5.5. Friedreichova ataxie**

Jde o vzácné onemocnění způsobené mutací genu pro frataxin, který je mitochondriálním proteinem modulujícím homeostázu železa. Typické je neurologické postižení a poškození myokardu [118].

## **5. KLINICKÉ ASPEKTY HFE HEMOCHROMATÓZY (TYP 1)**

Diagnóza hereditární hemochromatózy je obvykle založena na klinických projevech, na laboratorních nálezech zvýšené koncentrace transferinu a feritinu v séru a na vyšetření genetických mutací [1, 2, 84, 121, 122]. Dříve standardně prováděná diagnostická jaterní biopsie je nahrazována modernějšími zobrazovacími technikami [3].

### **5.1. FENOTYPOVÁ KRITÉRIA HEREDITÁRNÍ HEMOCHROMATÓZY**

Klinický obraz HH lze rozdělit do 4 stadií [19, 27]:

Stadium I – genetická predispozice nebo jiné abnormality

Stadium II – přetížení organismu železem bez klinických symptomů

Stadium III – přetížení železem s klinickými symptomy

#### Stadium IV – choroba z přetížení železem s orgánovým poškozením, s jaterní cirhózou

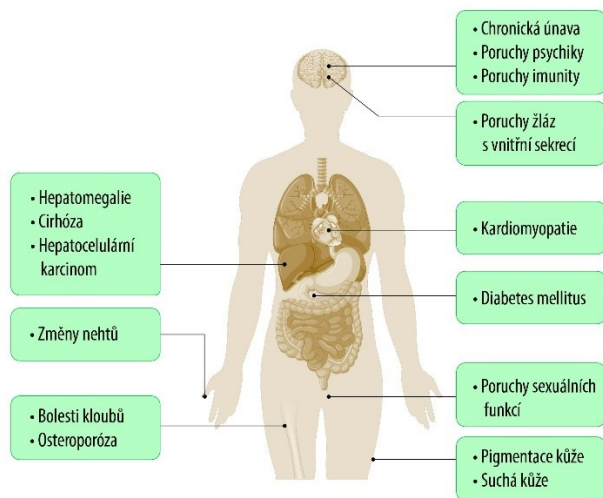
Hereditární hemochromatóza se vyvíjí pomalu a vzácně se manifestuje před dospělostí, nejčastěji až po 40 roce věku [1-3, 27]. Její progresse může být urychlena vysokým příjmem železa potravou, snížením aktivní utilizace železa, snížením jeho ztrát a dalšími faktory (příjmem alkoholu, kouřením atd.) [3]. Ochranný efekt menstruace a těhotenství vysvětluje, proč je ukládání železa v plazmě u dívek a mladých žen pozvolnější než u starších žen a proč je u chlapců a mužů poškození orgánů ve stejném věku závažnější než u žen v reprodukčním věku [2, 7, 123].

Vzhledem k variabilní penetraci (viz kap. 4.1.4.) probíhá onemocnění individuálně, v některých případech může přetrvávat pouze zvýšení laboratorních markerů, ale u více než poloviny všech C282Y homozygotů je plazmatické zvýšení železa rychle následováno jeho progresivním ukládáním do parenchymatózních orgánů, což se projeví jak stoupajícími koncentracemi sérového feritinu, tak i klinickými příznaky [124]. Intenzita depozit železa je také ovlivněna různými faktory, včetně koncentrací cirkulujícího hepcidinu, hormonů regulujících metabolismus železa, aktivity proteinů zasahujících do metabolismus hemu (hemopexin, haptoglobin) a nehemovým železem [1, 11].

Mezi klinické příznaky hereditární hemochromatózy patří (obr. 9, tab. 1) [2, 5, 27, 125, 126]

- únava, slabost, nechutenství,
- bolesti břicha (v pravém podžebří nebo difuzního charakteru),
- artritida postihující kterýkoliv kloub, nejčastěji drobné klouby rukou,
- diabetes mellitus (v kombinaci s typickým zbarvením pokožky nazýván bronzový diabetes mellitus),
- poškození žláz s vnitřní sekrecí – hypothyroidismus, hypogonadismus atd.,
- poškození jater (patologické jaterní testy, hepatomegalie, cirhóza, hepatocelulární karcinom),
- kardiomyopatie – poškození srdeční svaloviny bez souvislosti s poškozením koronárních arterií,
- psychické a psychiatrické poruchy zahrnující poruchy paměti, výkyvy nálady, vznětlivost, deprese atd.,
- poruchy sexuální potence – pokles libida, impotence, dysmenorea, časná menopauza,
- „bronzové“ zbarvení pokožky nebo vzhled stálého opálení kůže,
- vypadávání vlasů a změny nehtů,
- poškození imunitního systému (četné opakované infekce).

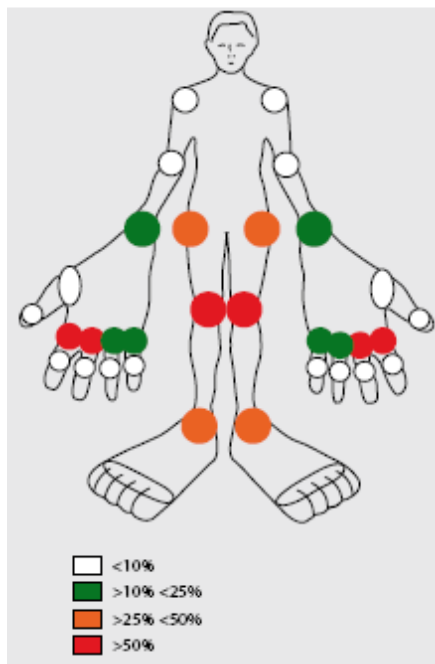
**Obr. 9** *Klinické příznaky hereditární hemochromatózy (upraveno z Brissot, 2018)[19]*



*Legenda: viz text*

Vzhledem k postupnému hromadění železa v organismu se klinické příznaky vyvíjejí v čase. V počátečním období jsou klinické příznaky necharakteristické. Nemocní si stěžují především na únavu, slabost a bolesti drobných kloubů rukou [1, 2]. Nejčastěji postiženými klouby jsou drobné metakarpofalangeální klouby rukou, kde obtíže mohou připomínat artritidu (obr. 10) [27].

**Obr. 10** *Pravděpodobnost postižení kloubů u HH (Zwerina, 2010)[127]*



*Legenda: viz text*

Postupně se mohou přidávat bolesti dalších kloubů (kolena, kyčle), průběh může v pozdějším stadiu zkomplikovat osteoporóza způsobená hepatopatií nebo ukládáním železa v kloubech. U pacientů s HH je prokazována násobně vyšší frekvence provedení totální náhrady kolenních a kyčelních kloubů [128, 129].

Ukládáním železa jsou postižena zejména játra, která jsou schopna akumulovat mnohonásobná množství železa ve srovnání s normálním stavem. Za normálních okolností je obsah železa v játrech okolo 1 g, při HH může obsah železa v játrech dosáhnout až 30 g [11]. Při HH se železo ukládá především v hepatocytech ve formě feritinu nebo hemosiderinu. Hromadící se železo vyvolává oxidační stres hepatocytu, vede k jeho poškození a k postupné náhradě funkčního parenchymu vazivovou tkání za vzniku typického obrazu jaterní cirhózy. Při postižení jater si nemocní stěžují na bolesti břicha v pravém podžebří způsobené hepatomegalií [130]. Fyzikální nález může být u mladších nemocných zcela normální. Později se objevují různě vyjádřené známky hepatomegalie, kožní pigmentace, pavoučkové névy, splenomegalie, artropatie, ascites, arytmie, kardiální insuficience, hypotrichóza, atrofie varlat, gynekomastie, ikterus [11]. Trvalé zvýšení sérové koncentrace feritinu nad 500 µg/l je spojeno s rozvojem fibrózy III. nebo IV. stupně [72]. Ve stadiu III a IV HH se postupně rozvíjí postižení jater, typickým obrazem rozvinuté choroby je jaterní cirhóza. Riziko vzniku hepatocelulárního karcinomu je až 200× vyšší v porovnání s normální populací [131-133].

Postižení srdce se projeví dilatační nebo konstriční kardiomyopatií s poruchami převodního systému, arytmie jsou nejčastější příčinou náhlé smrti u HH. Bylo prokázáno zvýšené riziko aterosklerotického poškození věnčitých tepen v souvislosti s HH [134], ale nižší riziko akutní kardiovaskulární příhody, které je vysvětlováno nižší agregabilitou destiček a nižší hladinou tromboxanu u pacientů se zvýšenou saturací transferinu [135].

S rozvojem choroby se objevují poruchy sexuální potence u mužů, psychické příznaky, vypadávání vlasů a změny nehtů [2, 19]. Postižení endokrinních žláz se projeví výskytem diabetes mellitus II. typu, hypogonadismem spojeným s impotencí či amenorheou, osteoporózou a poklesem funkce štítné žlázy [136]. Hyperpigmentace kůže je nejčastěji generalizovaná, ale může být ohraničená pouze na oblast krku, předloktí, hřbety rukou nebo může zbarvit pouze staré jizvy [5].

**Tab. 1** *Výskyt klinických příznaků u HH [2, 27, 34, 125, 137, 138]*

<b>Příznak</b>	<b>Pravděpodobnost výskytu (%)</b>
Únava, slabost	40 – 60
Bolesti břicha	30 – 56
Úbytek váhy	15 – 25
Kloubní příznaky	30 – 40
Diabetes mellitus	10 – 30
Sexuální dysfunkce	10 – 40
Hepatomegalie, cirhóza	13 – 60
Arytmie	20 – 29
Poruchy srdeční funkce	15 – 35
Hyperpigmentace kůže	60 – 80

## **5.2. DIAGNOSTIKA HEREDITÁRNÍ HEMOCHROMATÓZY**

Diagnostika HH je založena na následujících vyšetřeních.

### **5.2.1. Hladina železa**

Hladina železa se nejčastěji stanovuje fotometrickou metodou. Diagnostický význam zvýšené hladiny železa je omezený, hodnota neodráží zásoby železa v organismu. U HH je zvýšení na horní hranici normy nebo nad ní, jedná se však o nespecifický ukazatel, který nelze využít pro sledování léčby [11].

### **5.2.2. Vazebná kapacita transferinu pro železo**

Stanovením celkové vazebné kapacity pro železo (TIBC – total iron binding capacity) se zjišťuje schopnost transferinu vázat železo. Celkovou vazebnou kapacitou pro železo se rozumí takové množství železa, které je transferin schopen navázat v případě, že všechna vazebná místa budou obsazena. Laboratorní normální hodnoty odpovídají normální koncentraci transferinu. Obvykle je železem nasycena pouze 1/3 transferinu, to je tzv. vázaná kapacita. Volný transferin bez navázaného železa představuje volnou vazebnou kapacitu (2/3 transferinu), která je k dispozici pro transport železa při zvýšených požadavcích. U HH je TIBC snížena [11].

### **5.2.3. Saturace transferinu**

Z hodnot koncentrace železa a transferinu se výpočtem určuje saturace transferinu (TfS), která je definována jako podíl sérové koncentrace železa a TIBC. Jedná se o citlivý parametr



pro odhalení jak latentního nedostatku železa tak i přebytku železa v organismu. Hodnoty nad 0,45 u mužů a nad 0,40 u žen jsou považovány za patologické, jsou známkou patologického hromadění železa. V extrémních případech neléčených osob s HH může saturace dosáhnout až hodnot 0,95 – 1,0 [1].

#### **5.2.4. Feritin**

Feritin je považován za ukazatele celotělových zásob železa. Snížené hodnoty jsou specifické pro stavy spojené s nedostatkem železa v organismu (sideropenické anémie). Zvýšené hodnoty se vyskytují nejen při nadbytku železa v organismu, ale feritin stoupá také při zánětech – feritin je proteinem akutní fáze. Feritin je secernován buňkami RES v závislosti na intracelulárním obsahu železa [11]. Normální hodnota je stanovena v závislosti na metodě měření, hodnoty nad 300 µg/l u mužů a nad 200 µg/l u žen jsou považovány za patologické [1]. Při HH jsou hodnoty nad 1000 µg/l u obou pohlaví uváděny jako kritické, které vedou k významnému poškození orgánů a tkání a ke zkrácení délky života [2, 7, 139].

#### **5.2.5 Hepcidin**

Stanovení hepcidinu v plazmě nebo moči se provádí imunoanalytickými metodami (ELISA) nebo hmotnostní spektrometrií. Měření koncentrace hepcidinu má význam pro stanovení diagnózy poruch metabolismu železa, např. pro odlišení anémie chronických chorob, sideropenické anémie, klasické hereditární hemochromatózy a ostatních typů HH [9, 14].

#### **5.2.6. Genetické testování**

Vyšetření mutací HFE genu patří mezi základní diagnostické vyšetření u osob s podezřením na HH. Metodou vyšetření je PCR z DNA, obvykle získané z izolovaných leukocytů periferní krve nebo stěrem z bukalní sliznice. Standardně se pro potvrzení nejčastější diagnózy HH (HFE 1) testují 3 nejčastější a nejvýznamnější mutace HFE genu: C282Y, H63D a S65C [1-3, 5, 140].

#### **5.2.7. Zobrazovací metody**

##### **5.2.7.1. Vyšetření ultrazvukem**

Vyšetření ultrazvukem (UZ) slouží především k posouzení velikosti jater, sleziny a portální žíly, dokáže odhalit hepatomegalii se steatózou, jaterní cirhózu, popřípadě hepatocelulární karcinom [11].

### 5.2.7.2. Magnetická rezonance

Pomocí magnetické rezonance (MR) lze stanovit množství železa akumulovaného v játrech [141]. Dokonalejší rozlišovací schopnost MR je přínosná také v diagnostice hepatocelulárního karcinomu menších rozměrů ve srovnání s výtěžností UZ a CT. Zobrazení MR se dnes dává přednost před jaterní biopsií pro neinvazivitu a minimální komplikace spojené s výkonem. Ve srovnání s biopsií dokáže MR rozlišit HFE hemochromatózu od feroportinové choroby (HFE 4) a od sekundární akumulace železa [3].

### 5.2.8. Jaterní biopsie

Při dostupnosti a prokázaném diagnostickém přínosu MR se od standardního provádění jaterní biopsie při diagnostice HH upouští. Indikace biopsie se zvažuje při nejasných případech akumulace železa u mladších pacientů nebo se využívá cílená biopsie pod UZ kontrolou pro odběr materiálu z podezřelého ložiska. Jaterní biopsie přináší informace nejen o stupni a typu postižení jaterního parenchymu (u HH je železo nejvíce v hepatocytech a tíže siderózy klesá centrilobulárně, u sekundárních přetížení jsou více postiženy elementy RES), ale i o doprovodné fibróze, cirhóze, alkoholickém postižení, apod. Přímé stanovení obsahu železa v jaterní sušině přesně ukazuje stupeň akumulace železa. Hodnota pod 1800 µg/g (32 µmol/g) sušiny je považována za normální. Siderózu lze také kvantifikovat vyjádřením tzv. jaterního indexu železa – hepatic iron index (HII). HII se vypočítá jako podíl železa v jaterní sušině (v µmol/g sušiny jater) a věku pacienta. Pacienti s HII nad 1,9 vykazují významné přetížení železem a vyžadují neodkladnou léčbu [3]. Určování HII však postupně ztrácí na významu [11].

### 5.2.9. Další vyšetření

Pro posouzení tíže postižení jednotlivých orgánů se mimo výše uvedených využívá řada dalších laboratorních a funkčních vyšetření, např. glykémie, glukózo-toleranční test, alaninaminotransferáza, aspartátaminotransferáza, alkalická fosfatáza, bilirubin, albumin, protrombinový čas, hladiny hormonů, rentgenová nebo MR vyšetření kloubů, funkční testy srdce, atd. [11].

## 5.3. SCREENING HH

O tom, zda screening HH provádět či neprovádět, a o případném výběru vhodné metody screeningu HH se diskutuje [5, 11, 76]. Zvažuje se použití genetického plošného testování či fenotypového screeningu, při posuzování se přihlíží k etickým otázkám, vážení poměru cena –

výtěžek (cost-effectivity) a také k faktorům ovlivňujícím výtěžnost a riziko poškození (pohlaví, věk, příjem alkoholu, hepatitida, atd.).

### **5.3.1. Genetický screening**

Zastánci genetického screeningu poukazují na vysokou frekvenci C282Y mutace u kavkazské populace a možnost efektivního léčení při včasném záchytu mutace. Proti zavedení plošného genetického screeningu však svědčí

- nález nízké penetrace klinického onemocnění, kdy maximálně 50 % homozygotů pro C282Y vykazuje nadměrné střežení železa (viz kap. 4.1.4.) [142],
- vysoké finanční náklady,
- etické a právní problémy.

Naopak australská studie genetického screeningu u mužů nad 30 let a žen nad 45 let kavkazského původu prokázala efektivitu tohoto postupu [143].

### **5.3.2. Fenotypový screening**

Fenotypový screening může preferovat měření saturace transferinu v séru [78, 125, 144] nebo měření koncentrace feritinu v séru [27, 72]. Test saturace transferinu je některými autory považován za nejlepší screeningový test [145, 146]. Provedené studie poukazují na skutečnost, že jsou velmi nízké pozitivní prediktivní hodnoty fenotypických i genetických znaků [46, 72]. Manifestace choroby je velmi závislá na dalších faktorech, na způsobu života jedince [72, 74, 125], vliv má příjem alkoholu a léků, etnikum, rasa, pohlaví, doprovázející choroby, konzumace vitamínu C atd. [2, 147].

### **5.3.3. Rodinný screening**

Na rozdíl od plošného genetického screeningu je za velmi důležitý považován screening rodinný. Při záchytu onemocnění nebo pozitivitu mutace u jedince by měli být vyšetřeni jeho příbuzní – sourozenci, rodiče a děti. Pokud má nemocný více dětí s jedním partnerem, doporučuje se vyšetřit i partnera. Pokud není partner nositelem žádné mutace HFE, odpadá nutnost vyšetření dětí [148]. Při pozitivním nálezů mutací u příbuzných (především homozygoti C282Y nebo H63D a smíšené heterozygoti C282Y/H63D) by tyto osoby měly být sledovány v pravidelných intervalech a při laboratorních známkách akumulace železa by u nich měla být ihned zahájena léčba [3].

### 5.3.4. Cílený screening

Cílený screening hemochromatózy by měl být proveden u pacientů s nevysvětlitelným jaterním onemocněním nebo jaterním onemocněním se známkami akumulace železa, u pacientů s únavovým syndromem, sexuální dysfunkcí a u mladých pacientů s časným nástupem atypické artropatie, kardiálního onemocnění nebo změnami kožní pigmentace [11].

## 5.4. LÉČBA HH

Cílem léčby HH je odstranit patologicky působící nadbytečné železo z organismu. Léčebné postupy lze rozdělit na léčbu

- indukční nebo iniciální, jejímž cílem je po diagnóze onemocnění snížit patologické hodnoty železa na hodnoty normální, za obvyklý cíl se považuje pokles feritinu pod 50 – 100 µg/l a saturace transferinu pod 0,30 [1, 3, 149],
- udržovací, jejímž cílem je zabránit dalšímu hromadění železa v organismu. Obvykle postačuje 1 léčebná venepunkce nebo erythrocytaferéza za 3 – 12 měsíců v závislosti na rychlosti vzestupu feritinu a saturace transferinu. Hladina feritinu by měla být pravidelně kontrolována (nejméně 1× ročně) a udržována v rozmezí 50 – 100 µg/l [1-3].

### 5.4.1. Venepunkce

Za léčebnou metodu první volby léčby HH je považována léčebná venepunkce [1-3, 27, 138, 149, 150]. Nemocnému se pravidelně, obvykle 1 – 2× týdně, odebírá 450 – 500 ml krve. Odběry krve (úbytek erytrocytů) vedou k stimulaci erythropoezy a tím ke zvýšené spotřebě železa ze zásob v organismu. Protože 1 ml erytrocytů představuje ztrátu 1 mg železa, lze jedním odběrem 500 ml krve odebrat v závislosti na hematokritu 170 – 250 mg železa. Odběry se opakují při dobré toleranci nemocným až do poklesu hodnot feritinu k normálním hodnotám. Jde o metodu dostupnou, levnou a dobře tolerovanou pacienty. Nevýhodou odběrů plné krve je současná ztráta plazmy se všemi důležitými složkami, jejichž primární hladina může být již alterována vlastní chorobou (imunoglobuliny, koagulační faktory, albumin a další bílkoviny) a vysoká četnost odběrů (návštěv v zdravotnickém zařízení) [149, 151, 152]. Jsou však popisovány i závažné komplikace spojené s léčbou venepuncemi [27].

### 5.4.2. Erythrocytaferéza

Léčebná erythrocytaferéza u pacientů s HH je považována za alternativní metodu, především u pacientů obtížně tolerujících venepunkce nebo u pacientů se sklonem k hypoproteinémii. Její výhoda spočívá v možnosti odstranění násobného množství erytrocytů (a tím i železa) při jednom odběru a nižší frekvenci odběrů [2, 3, 149, 152, 153]. Účinnost této metody jsme ověřovali v naší studii, podrobnější informace o erythrocytaferéze jsou uvedeny v kap. 6 a 10.

### 5.4.3. Chelatační léčba

U pacientů netolerujících odběry krve nebo erytrocytů, např. u pacientů s anémií u některých typů HH, je alternativou léčby podávání chelatačních latek. Chelatační látka tvoří v krvi s železem komplex, který je filtrován ledvinami a vylučován močí. K dispozici je několik chelatačních látek, které se využívají i při léčbě HH, jejich nevýhodou je vysoká cena [3, 11, 154].

#### 5.4.3.1. Deferoxamin (Desferal®)

Je nejstarším dostupným lékem, má rychlý plazmatický obrat, největší účinek vykazuje při kontinuální nitrožilní nebo podkožní infuzi pumpou v dávce 20 – 60 mg/kg denně, 5 – 7 dnů v týdnu. 100 mg přípravku váže 8,5 mg železa, k dosažení účinku je třeba podat stovky gramů deferoxaminu. Mezi nejčastější vedlejší účinky patří alergická či anafylaktická reakce, retinopatie, ototoxicita a hepatotoxicita [155, 156].

#### 5.4.3.2. Deferipron (Ferriprox®)

Jde o přípravek podávaný per os, při dávce 75 – 100 mg/kg/den má stejný terapeutický účinek jako deferoxamin, na rozdíl do něj má protektivní účinek na srdce [154]. Nežádoucím účinkem je hepatotoxicita a poškození kostní dřeně vedoucí k neutropenii a agraulocytóze, které však bývají reverzibilní po vysazení léčby [155, 157].

#### 5.4.3.3. Deferasirox (Exjade®)

Perorálně podávaný přípravek mající dlouhý plazmatický poločas (11 – 19 hodin), lze jej podávat v jedné denní dávce. Jeho účinek v dávce 20 mg/kg/den je srovnatelný s účinkem deferoxaminu v dávce 40 mg/kg/den. Nepoškozuje kostní dřeň, vedlejší účinky zahrnují poškození ledvin (u 10 % pacientů), zvýšení jaterních testů a nechutenství [155, 156].

Chelatační léky je doporučeno podávat pouze při vysokých hladinách feritinu nad 1000 µg/l. Při nižší hladině převažuje riziko komplikací spojených s jejich podáváním – poškození jater, která jsou již primárně poškozena HH, při poškození ledvin je potřeba redukovat dávky chelatačních látek [3, 154].

#### **5.4.4. Nové možnosti léčby HH**

Rozvoj poznatků o metabolismu železa a mechanismech jeho regulace přináší nové možnosti využití těchto znalostí v léčbě poruch metabolismu železa, včetně hereditární hemochromatózy. Především léky cílící na hepcidin a jeho řídicí gen HAMP mohou být příslibem pro budoucnost [14, 21].

##### **5.4.4.1 Agonisté hepcidinu**

Do této skupiny jsou řazeny látky [21, 158], které

- mají podobný účinek jako hepcidin (minihepcidiny),
- stimulují gen HAMP (isoflavony, steroidní hormony, HAMP promotery),
- zvyšují produkci hepcidinu v játrech (icariin a jeho homology),
- ovlivňují degradaci hemojuvelinu (součást řídicí dráhy SMAD/HAMP, viz kap. 2.3.2.) a tím gen HAMP a produkci hepcidinu (antagonisté TMPBSS6).

##### **5.4.4.2 Antagonisté hepcidinu**

Tato skupina zahrnuje látky, které blokují produkci hepcidinu [14, 21]. Může se jednat o

- protilátky proti m-RNA hepcidinu,
- protilátky proti IL-6 nebo IL-6 receptoru (tocilizumab),
- protilátky proti BMP komplexu (součást dráhy SMAD/HAMP, viz kap. 2.3.2.),
- další látky (heparin, vitamin D, thiamin).

#### **5.4.5. Dieta a preventivní opatření při HH**

Samotná dieta se sníženým příjmem železa nemá pro léčbu choroby velký význam [1, 2, 11, 14, 21, 27, 150]. Dietní opatření jsou považována za významná jako prevence rozvoje choroby. Byly prokázány nižší koncentrace feritinu u homozygotů C282Y, kteří prokazatelně zvýšeně konzumovali čaj (tein obsažený v čaji zabraňuje absorpci nehemového železa) [159]. Každý nemocný s diagnostikovanou HH by měl dostat následující poučení týkající se diety a preventivních opatření [160, 161].

- a) Zákaz příjmu multivitaminových přípravků obsahujících železo a snížení příjmu železa v potravě spočívající v omezení či vyloučení potravin obsahující velké množství železa (červená masa, vnitřnosti, luštěniny, čokoláda, ořechy atd.).
- b) Omezení příjmu látek zvyšujících vstřebávání železa ze střeva
  - nepožívat vitamin C současně s jídlem, tj. nezapíjet jídlo ovocnými šťávami a džusy,
  - omezit příjem alkoholu,
  - nekouřit,
  - vitaminové tablety obsahující vitamin C brát pouze v období mezi jídly, nikoliv s jídlem.
- c) Snížení vstřebávání přijatého železa potravou
  - zapíjení jídel čajem nebo mléčnými výrobky – tein a vápník vytvářejí s železem nevstřebatelné komplexy,
  - inhibitory protonové pumpy, pokud jsou indikovány z důvodu jiné choroby – nedoporučuje se předepisovat je automaticky každému pacientovi s HH [3], při jejich užívání ale může být nižší potřeba venepunkcí.
- d) Prevence poškození organismu
  - vyloučení alkoholu (prevence hepatotoxického účinku),
  - vyloučení tepelně neupravených mořských plodů z potravy - důvodem je riziko onemocnění způsobené gram-negativní bakterií *Vibrio vulnificus*, která se běžně vyskytuje v šelfových mořích a kontaminuje především ústřice, do organismu se dostává oděrkami a požitím tepelně neupravených mořských plodů (k infekci jsou náchylní jedinci s jaterními chorobami, HH a nemocní v imunosupresi, u nichž onemocnění může přejít v sepsi s fatálním průběhem) [162],
  - preventivně očkovat proti hepatitidě A a B a proti pneumokokům [2].

## 5.5. ÚČINEK LÉČBY NA KLINICKÉ PROJEVY

Včas zahájená a účinná léčba je prevencí rozvoje příznaků HH [3]. Pokud byla léčba zahájena v období již rozvinutých klinických příznaků HH, může vést k úpravě symptomů. Zlepšení se týká především únavy, slabosti, nechutství, bolesti břicha, zbarvení kůže a fibrózy jater [1]. U některých pacientů je prokázáno zlepšení tolerance glukózy, což vede k snížení dávky antidiabetik [11, 27]. Pokud je rozvinuta cirhóza jater nebo vážné poškození myokardu,

nedochází léčbou k výraznému zlepšení stavu. Obdobně je na léčbu rezistentní kloubní poškození [1, 27].

Pokud je HH diagnostikována a léčena včas, kdy není přítomna cirhóza jater, neovlivňuje diagnóza HH střední délku života ani pravděpodobnost dožití [2, 8, 27]. Pokud je léčba zahájena až při hladině feritinu nad 2000 µg/l, je úmrtnost vyšší ve srovnání s normální populací (mortality ratio 24) [3].

## 5.6. HH A DÁRCOVSTVÍ KRVE A KREVNÍCH SLOŽEK

Pravidelné odběry krve nebo erytrocytů mohou přispět k oddálení vzniku klinických známek HH [163]. Některé práce však vliv dárcovství krve v době před diagnózou choroby nepotvrdily [164].

Samotná diagnóza HH není vylučujícím kritériem z dárcovství krve a krevních složek [165, 166]. Pokud osoba s HH nemá orgánové poškození a splňuje legislativní požadavky stanovené pro dárce/dárkyně krve, může darovat krev i krevní složky, odebrané transfuzní přípravky mohou být použity pro transfuzi [165, 167, 168].

Obvykle se osoby s HH akceptují k dárcovství před výskytem klinických známek onemocnění. Na laboratorní známky přetížení železem a tím na diagnózu HH se přijde náhodně. V některých zařízeních transfuzní služby se před odběrem krve prvodárce zjišťuje zásoba železa, z tohoto důvodu se u prvodárců vyšetřuje hladina feritinu nebo saturace transferinu [144]. U opakovaných nebo pravidelných dárců se feritin běžně nevyšetřuje s výjimkou dárců (nejčastěji dárkyň), u kterých došlo k náhlému poklesu hemoglobinu. Výsledkem pak obvykle bývá nález latentní sideropenie nebo sideropenické anémie. Cílené vyhledávání dárců s mutacemi vedoucími k akumulaci železa a jejich zařazování do dárcovství je naopak některými autory považováno za přínosné pro zajištění soběstačnosti a dostupnosti transfuzních přípravků [169, 170].

Krev odebíraná nemocným s HH v indukční fázi léčby se k transfuzním účelům nedoporučuje využívat. Důvodem je, že dárce nevyhoví kritériím stanoveným pro dárce krve a krevních složek – maximální počet odběrů plné krve u mužů dnes činí 6 odběrů/rok, u žen 4 odběry/rok, minimální interval mezi dvěma odběry je stanoven na 8 týdnů. U dvojité erythrocytaferézy (odběr 2 transfuzních jednotek erytrocytů, cca 2 × 200 ml) je limit 3 odběrů u mužů a 2 odběrů u žen za rok, minimální interval mezi dvěma odběry je 4, resp. 6 měsíců [168]. Problematickým je také rozpor mezi deklarovanou dobrovolností dárcovství na jedné straně a



očekávaným efektem léčby na straně druhé, kdy nemocný – dárce, vědom si nutnosti odběrů pro své zdraví, může preferovat efekt „pro sebe“ a z tohoto důvodu může zamlčet významné údaje týkající se jeho jiných chorob nebo rizikového chování, které by ve svém důsledku mohly poškodit příjemce transfuze. Studie neprokázaly vyšší infekční riziko transfuzních přípravků odebraných dárce s HH [1, 171]. V období udržovací léčby je dárcovství akceptovatelné za předpokladu splnění zdravotních kritérií pro dárce (tj. především nepoškozené orgány a tkáně, neužívání léků atd.) [172].

Pokud je HH diagnostikována jako nález mutace bez klinických projevů, např. v rámci rodinných studií, je dárcovství možné a může sloužit i k pravidelnému sledování laboratorních známek HH u těchto osob (testování hladiny feritinu nebo saturace transferinu). V případě narůstajících hodnot zásobního železa se dárce převede do léčebného režimu, který vede k rychlému snížení nahromaděného železa [172].

Kvalita odebraných transfuzních přípravků od dárce s HH je srovnatelná s přípravky od zdravých dárce, nebyly zjištěny rozdíly v hemolýze na konci doby skladování, v hladinách bioaktivních cytokinů ani v obsahu protilátek proti yersiniím [1, 151, 173]. Některé práce naopak prokázaly nižší deformabilitu erytrocytů (až o 11 %) odebraných od dárce s HH [174].

## **6. LÉČEBNÉ AFERÉZY, ERYTROCYTAFERÉZA**

### **6.1. HISTORIE**

Termín aferéza pochází z řečtiny, znamená „odstranění, odebrání“. Přístrojové léčebné aferetické metody byly zavedeny do praxe v 70. letech 20. století [175]. Nově zkonstruované přístroje (separátory) umožnily odstraňovat z krve buď plazmu obsahující patologické složky nebo jednotlivé krevní součásti (leukocyty, trombocyty, erytrocyty). S technickým rozvojem v 90. letech 20. století se za pomoci nových automatických aferetických přístrojů dočkaly léčebné aferézy rychlého rozvoje, široce se začaly aplikovat metody selektivní i neselektivní léčebné plazmaferézy, byly stanoveny diagnózy, u nichž je trombocytaferéza a leukocytaferéza součástí standardní léčby [176, 177]. Aferetické metody se začaly uplatňovat i v dárcovských odběrech krve a krevních složek. Dárcovské plazmaferézy a trombocytaferézy se provádějí od 80. let, v roce 1993 byla představena metoda multikomponentního přístrojového odběru, při kterém lze jednomu dárce při jednom odběru odebrat více transfuzních jednotek (TU,

transfusion unit) krevních složek v různých kombinacích [178]. Dárcovská erythrocytaferéza, při které lze odebrat 2 TU erytrocytů, se v Evropě provádí od roku 1994, v USA byla schválena FDA v roce 1997. Léčebná erythrocytaferéza se uplatňuje od 90. let především jako výměnná metoda (odběr patologických erytrocytů a jejich náhrada dárcovskými). Depleční erythrocytaferéza se svého rozvoje dočkala na přelomu 20. a 21. století. Ještě v roce 2005 v učebnici AABB je erythrocytaferéza uváděna pouze jako výměnná metoda u nemocných se srpkovitou anémií, talasemií, malárií a methemoglobinémií [176]. První ojedinělé práce o léčbě nemocných s HH erythrocytaferézou jsou publikovány v 90. letech 20. století [179, 180].

## 6.2. PŘÍSTROJE PRO AFERÉZU

Od 90. let 20. století jsou na trhu dostupné automatizované separační přístroje různých typů a výrobců, které jsou určeny k dárcovským i léčebným výkonům. Separátory pro erythrocytaferézu, dostupné na českém trhu v letech 2004 – 2020, jsou uvedeny v tab. 2.

**Tab. 2 Přístroje pro erythrocytaferézy**

Výrobce separátoru	Typy separátoru
Fresenius (Lake Zurich, IL, USA)	AS 104, AS.TEC 204, Comtec
Baxter, Fenwal (Deerfield IL, USA)	CS 3000+, Alyx, Amicus
BCT Gambro (Cobe), Terumo BCT (Lakewood CO, USA)	Spectra, Trima V4, Trima Accel,
Haemonetics (Braintree MA, USA)	Cymbal, MCS 3p, MCS+
Dideco (London, UK)	Excel, Electa

## 6.3. PRINCIP SEPARAČNÍ METODY

Základním principem fungování těchto přístrojů je centrifugační metoda, při které se v centrifugační nádobě nebo prstenci rozděluje odebíraná krev na základě rozdílné specifické hmotnosti jednotlivých krevních složek (viz tab. 3). Jednotlivé oddělené krevní složky jsou buď odstraňovány do sběrných/odpadních vaků nebo nádob. Složky krve, které nejsou při odběrech použity, se vrací zpět do oběhu dárce nebo nemocného [149, 181].

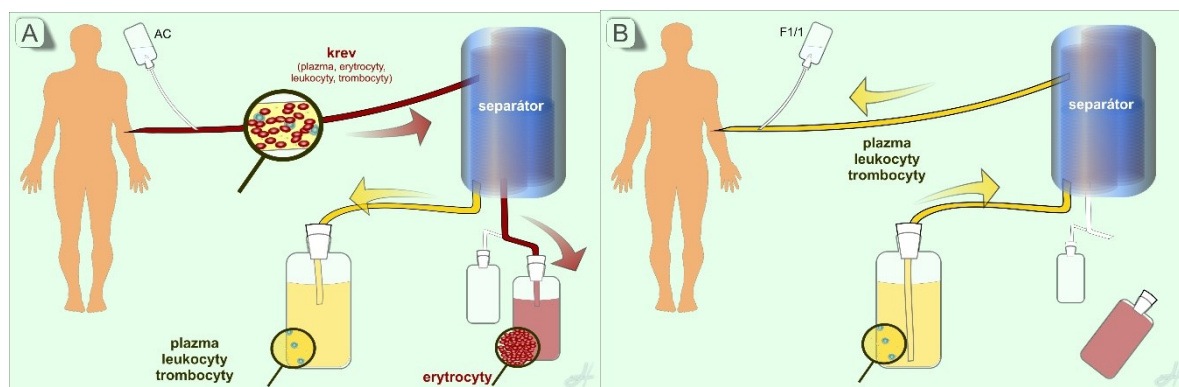
**Tab. 3** Specifická hmotnost krevních složek [168]

Krevní složka	Průměrná specifická hmotnost (g/ml)	Průměrný objem (fl)
Plazma	1,026	-
Trombocyty	1,058	9
Monocyty	1,062	470
Lymfocyty	1,070	230
Granulocyty	1,082	450
Erytrocyty	1,100	87

#### 6.4. ODBĚR ERYTROCYTŮ SEPARÁTOREM - ERYTROCYTAFERÉZA

Přístroj – separátor krevních složek – odebírá nemocnému plnou krev, zpracovává ji uvnitř přístroje (centrifuguje a rozděluje na jednotlivé složky), erytrocyty se shromažďují ve sběrném/odpadním vaku a všechny ostatní složky krve (plazma, trombocyty, leukocyty) se vracejí nemocnému do krevního oběhu. Přístroje, které pracují v kontinuálním režimu, vyžadují přístup ze dvou žil (2 venepunkce), separátor z jedné žíly odebírá krev a do druhé žíly vrací nepoužité krevní složky. Pro přístroje, které pracují v diskontinuálním režimu, postačuje 1 venepunkce. Při odběrech na separátorech s diskontinuálním režimem se pravidelně střídají odběrová a návratová fáze, při odběrové fázi je ze žíly pacienta odebírána plná krev ke zpracování do centrifugy, při návratovém cyklu přístroje se pacientovi vracejí do oběhu neodstraňované krevní složky (obr. 11) [152]. Pokud se hraří při odběru tekutiny, je možno při jednom odběru odebrat nemocnému v závislosti na celkovém objemu krve (TBV) až 800 – 1000 ml erytrocytů, tj. až 1000 mg Fe [151]. Vzhledem k snášenlivosti léčby a rychlosti úhrady erytrocytů vlastní erytropoezou je možné odběry provádět v intervalu 10 – 21 dnů [3, 149, 153].

**Obr. 11** Erytocytaferéza – princip diskontinuálního režimu



*Legenda: (A) odběr krve, separace na jednotlivé složky, (B) návrat neodebraných složek pacientovi.*

## 6.5. NEŽÁDOUCÍ REAKCE NA ODBĚR

Přístrojové léčebné erythrocytaferézy mohou být doprovázeny nežádoucími reakcemi, které se projeví

- v průběhu aferézy nebo bezprostředně po ní,
- opožděným či dlouhodobým účinkem.

Frekvence nežádoucích reakcí u léčebných aferéz se uvádí mezi 0 – 25 % [149, 176, 182, 183], četnost závisí na typu léčebné aferézy, délce trvání, množství krve prošlé přístrojem a náhradách, které se při aferéze podávají. Reakce jsou většinou lehké a lze je vyřešit i bez předčasného ukončení výkonu. Závažné reakce mohou být důvodem přerušování léčebného výkonu, výjimečně mohou vést k trvalému poškození pacienta nebo k jeho úmrtí [184].

### 6.5.1. Rozdělení nežádoucích reakcí

Nežádoucí reakce lze rozdělit podle různých hledisek, např. podle příčiny vzniku, podle rychlosti vzniku, podle závažnosti atd. [139, 184, 185].

#### 6.5.1.1. Časné, akutní nežádoucí reakce a komplikace

Mezi časné nebo akutní reakce a komplikace patří

##### a) komplikace lokální

- poranění žíly – riziko paravenózního podání krevních složek při návratovém cyklu,
- hematom v místě vpichu,
- napíchnutí drobné větve nervu, které oplétají žilní pletěň – příznakem je bolest v místě vpichu, vzácně parestezie trvající řádově minuty, výjimečně hodiny či dny po odběru,
- punkce arterie,
- alergická reakce na dezinfekční prostředek nebo na náplast,

##### b) celkové reakce

- citronanová toxicita,
- změny krevního tlaku s vazovagální reakcí při/po odběru (riziko poranění při pádu),
- alergická nebo anafylaktická reakce na podávané náhradní roztoky,
- akcelerace nepoznaných nebo latentních chorob (ischemická choroba, infarkt myokardu, srdeční arytmie atd.),

*c) technické komplikace*

- porucha přístroje (mechanická, SW),
- vada odběrového setu,
- vzduchová embolie.

**6.5.1.2. Pozdní nežádoucí reakce a komplikace**

Z pozdních reakcí a komplikací se u hemaferéz mohou vyskytnout

*a) komplikace lokální*

- tromboflebitida odběrové žíly,
- vznik arterio-venózního zkratu,
- keloidní jizva v místě venepunkce,

*b) reakce celkové*

- příznaky iatrogenní anémie,
- akcelerace nepoznaných nebo latentních chorob (ischemická choroba, infarkt myokardu, srdeční arytmie atd.).

**6.5.2. Citronanová toxicita**

Mezi nejčastější nežádoucí účinky léčebné erythrocytaferézy patří citronanová toxicita. Kyselina citronová a citronan sodný, které jsou součástí používaných antikoagulačních roztoků, vyvazují kalcium, čímž se zabrání srážení odebírané a zpracovávané krve v přístroji. Po odstranění složek krve se zbylé složky vrací nemocnému do oběhu, v případě erythrocytaferézy se vrací plazma, trombocyty a leukocyty. Součástí navracených krevních složek je i použitý antikoagulační roztok. Ten v pacientově krvi způsobuje pokles ionizovaného kalcia [176]. Citronan je metabolizován v játrech na bikarbonát, vázané kalcium se z citronanu zpětně uvolňuje do plazmy. Pokud je rychlost odbourávání citronanu v nerovnováze s jeho přísunem, může dojít ke vzniku příznaků z hypokalcemie. Ty se projeví zvýšenou nervosvalovou dráždivostí, nejprve jako parestézie, brnění rtů a prstů. Pokud nedojde k nápravě, mohou se přidat další příznaky, mezi něž patří nauzea, případně zvracení, bolesti hlavy, nervosvalové záškuby, třes a v nejtěžších případech až tonicko-klonické tetanické křeče [186]. Pokud je při aferéze sledováno ekg, je hypokalcemie prokazatelná prodloužením QT intervalu. Při pečlivém sledování pacienta se při prvotních projevech hypokalcemie (brnění prstů nebo okolo úst) jako opatření [176, 187]

- zpomaluje návratová rychlost separátoru, čímž se sníží nebo úplně zastaví přísun antikoagulačního roztoku do organismu,
- podá 1 – 2 tablety calcium effervescens rozpuštěného v malém množství vody,
- podá 1 – 2 ampule 10% calcium gluconicum.

U pacientů s neporušenou funkcí jater postačuje obvykle ke zvládnutí příznaků zpomalení návratové rychlosti separátoru. Předpokladem je pečlivé sledování pacienta během aferézy a aktivní vyhledávání příznaků citrnanové toxicity.

### **6.5.3. Vazovagální reakce**

Redistribuce objemu a vliv stresu při aferéze může být příčinou hypotenzní nebo vazovagální reakce, která se projeví bledostí, pocením, pocitem chladu na kůži a následným poklesem tepu a krevního tlaku. U těžké reakce se může přidat zvracení či krátkodobá ztráta vědomí [176]. Rizikem je možnost vzniku poranění v případě, že se reakce rozvine po opuštění odběrového lůžka. Prevencí reakce je

- dostatečný přísun tekutin před aferézou,
- hrazení odebíraných složek dostatečným množstvím náhradního roztoku,
- ponechání pacienta na lůžku několik minut po proceduře s pomalým a kontrolovaným opuštěním odběrového lůžka.

### **6.5.4. Pozdní reakce**

Mezi pozdní reakce po léčebné erythrocytaferéze patří především příznaky ze snížené kapacity krve pro přenos kyslíku – z úbytku erythrocytů. Reakce se může projevit jako slabost a únava nebo spavost po aferéze. Pokud deplece erythrocytů překročí kapacitu kompenzačních mechanismů, může se reakce projevit příznaky ischemické choroby z hypoxie s bolestmi na hrudi, dušností, závratěmi, bolestmi břicha a nechutenstvím [186].

## 7. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

### 7.1. PRIMÁRNÍ CÍLE PRÁCE

#### 7.1.1. Vytvoření souboru nemocných

Vytvořit soubor nemocných s nově diagnostikovanou HH – vyhledat nemocné, dosud neléčené pacienty s HH z různých zdrojů.

#### 7.1.2. Léčebná metoda

Zavést erythrocytaferézu do léčby nemocných HH, opakovanými erythrocytaferézami snížit hladinu feritinu u každého nemocného pod 50 µg/l. Standardizovat léčebnou metodu, stanovit optimální parametry odběru pro každého dárce dle protokolu.

### 7.2. SEKUNDÁRNÍ CÍLE PRÁCE

#### 7.2.1. Bezpečnost erythrocytaferézy

Pečlivě monitorovat výskyt nežádoucích reakcí, posoudit toleranci odběrů a výskyt nežádoucích reakcí na odběr, porovnat vlastní data s publikovanými daty.

#### 7.2.2. Efektivita procedur

Získaná data vyhodnotit, statisticky zpracovat a ze sledování závislosti poklesu hladiny feritinu na množství odebíraných erythrocytů, na četnosti odběrů a trvání léčby se pokusit vytvořit předpovědní model či „vzorec“ léčebného plánu nově zařazovaných nemocných.

#### 7.2.3. Ukazatelé úspěšnosti léčby

Ověřit, zda sledováním základních hematologických ukazatelů (např. MCV) lze nahradit nákladnější laboratorní vyšetřování hladiny feritinu, železa a TIBC.

#### 7.2.4. Udržovací léčba

Po dosažení cíle indukční léčby sledovat individuální rychlost vzestupu hladiny feritinu, každému pacientovi stanovit optimální interval následných erythrocytaferéz, u pacientů v udržovací léčbě trvající alespoň 5 let vyhodnotit a statisticky zpracovat získaná data.

### 7.3. PRACOVNÍ HYPOTÉZY

Pro soubor nemocných s hereditární hemochromatózou léčených erythrocytaferézou jsme vypracovali tyto hypotézy:

- a) Léčbou opakovanými erythrocytaferézami se u pacientů s HH sníží hladina feritinu pod 50 µg/l.
- b) Léčba erythrocytaferézou je dobře tolerovaná a bezpečná, výskyt nežádoucích reakcí a komplikací není vyšší než u jiných hemaferetických metod.

## 8. METODIKA

### 8.1. VYTVOŘENÍ SOUBORU NEMOCNÝCH

Pro získání nových pacientů s hereditární hemochromatózou a pro jejich zařazení do souboru léčených erythrocytaferézou jsme využili 3 různé postupy. Pacienty jsme hledali mezi dárci krve, v ambulancích gastroenterologů nebo hepatologů a mezi příbuznými již diagnostikovaných pacientů s HH.

#### 8.1.1. Vyhledání nemocných mezi dárci krve - screening HH u dárců krve

V průběhu dvou měsíců, v prosinci 2004 – lednu 2005 jsme každému dárci při odběru plné krve vyšetřili hladinu železa, vazebnou kapacitu a saturaci transferinu. Vzorky, jejichž hodnota saturace transferinu byla vyšší než 0,45 u mužů a nad 0,40 u žen, jsme odeslali na vyšetření feritinu. Dárci se zvýšenou hodnotou feritinu byli pozváni na transfuzní oddělení ke kontrolnímu vyšetření a k odběru zkumavky krve na vyšetření mutací HFE genu. Dárci s nálezem mutace HFE a současně se známkami patologické akumulace železa by byli vhodni pro zařazení do souboru léčených.

#### 8.1.2. Spolupráce s hepatologickými ambulancemi

Vypracovali jsme písemnou informaci o hereditární hemochromatóze a o zavádění erythrocytaferézy jako nově dostupné metody léčby pacientů s touto diagnózou. Tuto informaci jsme odeslali na



- pracoviště FN, např. II. interní kliniku FN Hradec Králové – oddělení gastroenterologie a oddělení revmatologie,
- specializované gastroenterologické ambulance v Hradci Králové.

Požádali jsme o předávání nově diagnostikovaných nemocných s HH k léčbě na naše oddělení.

### 8.1.3. Pacienti z rodinných studií

U všech nově diagnostikovaných pacientů s HH, kteří k nám byli posláni k léčbě, jsme zjišťovali, zda byl proveden screening HH u jejich pokrevních příbuzných. Pokud tomu tak nebylo, provedli jsme jejich screening na Transfuzním oddělení FN. U těchto osob jsme vyšetřili hladinu železa, TIBC, saturaci transferinu, hladinu feritinu a mutace HFE genu. Pacienti se známkami patologické akumulace železa byli zařazeni do souboru léčených. Pacienti s pozitivním nálezem mutací bez známek akumulace železa v organismu byli poučeni a zpráva o výsledcích vyšetření byla odeslána jejich praktickému lékaři s doporučením pravidelného sledování saturace transferinu a feritinu. Osobám s nálezem mutace HFE genu bez známek akumulace železa byla také nabídnuta možnost dárčovství krve a krevních složek.

## 8.2. STRATEGIE LÉČBY

Cílem léčby pacientů s HH bylo

- v indukční fázi co nejrychleji snížit patologickou hladinu feritinu k normálním hodnotám,
- v udržovací fázi pravidelnými odběry erytrocytů udržet hladinu feritinu v mezích normálních hodnot.

### 8.2.1. Indukční léčba

Cílem indukční léčby bylo snížit opakovanými erythrocytaferézami co nejrychleji hladinu feritinu pod 50 µg/l. Pro dosažení tohoto cíle byl každému pacientovi stanoven individuální léčebný plán:

- z výšky a hmotnosti pacienta jsme určili TBV (obr. 17),
- vyšetřili jsme krevní obraz, hodnotu hematokritu jsme použili pro výpočet aktuálního celkového množství erytrocytů pacienta (TEV) podle vzorce

$$\text{objem erytrocytů (ml)} \quad TEV = TBV \times HT$$

- posoudili jsme kompenzační mechanismy pacienta – stav kardiovaskulárního, plicního systému a dále jsme podle výsledků interního a laboratorního vyšetření odesílajícího pracoviště, podle anamnézy a vlastního fyzikálního vyšetření upravili množství odebraných erytrocytů,
- stanovili jsme množství odebraných erytrocytů v rozmezí 25 – 35 % celkového množství erytrocytů (TEV), případně jsme provedli korekci odebíraného množství tak, aby HT po odběru neklesl pod 0,25,
- před dalšími odběry jsme zjišťovali individuální toleranci odběru, pátrali jsme po pozdních reakcích na odběr a pokud se vyskytly, korigovali jsme odebíraný objem při následujících odběrech,
- sledovali jsme pokles zásob železa v organismu,
- po dosažení cílové hodnoty feritinu pod 50 µg/l jsme ukončili indukční fázi léčby.

### 8.2.2. Udržovací léčba

Cílem udržovací léčby bylo pravidelnými odběry erytrocytů udržovat hladinu feritinu v ideálním případě pod 100 µg/l, v ostatních případech alespoň v mezích normálních hodnot. Standardní postup u každého pacienta zahrnoval kontrolní odběry hladiny železa, feritinu, TIBC a saturace transferinu. Při vzestupu hodnoty feritinu nad 100 µg/l byl pacient pozván k léčebnému odběru. Množství odebíraných erytrocytů bylo stanovováno stejným způsobem jako při indukční léčbě, včetně individualizace, která vycházela z předchozí znalosti pacientovy tolerance odběrů. Pokud byla hladina feritinu vysoká, např. pokud se pacient dostavil ke kontrole po dlouhé době, bylo napláno a následně provedeno tolik odběrů erytrocytaferézou, aby bylo opět dosaženo hodnoty feritinu pod 100 µg/l. Při plánování počtu odběrů byla využita předchozí data daného pacienta (např. pokles hladiny feritinu v závislosti na množství odebíraných erytrocytů a frekvenci odběru, tolerance odběru apod.).

## 8.3. PŘÍSTROJ PRO ERYTROCYTAFERÉZU

Léčebné aferézy jsme prováděli na separátoru krevních částic Haemonetics MCS+ (Haemonetics Corp., Braintree MA, USA, dále MCS+) s využitím jednorázové uzavřené odběrové soupravy TAE 944 (obr. 12 a 13). Separátor MCS+ pracuje v diskontinuálním režimu, tj. přerušovaným systémem, kdy se střídá odběrová a návratová fáze. Krev pacienta je odebírána z kubitální žíly, hadičkou je přiváděna do centrifugační nádoby o objemu 210 ml (Latham bowl), ve které se při 6000 otáčkách za minutu rozdělí krev na jednotlivé krevní složky na

základě jejich specifických hmotností (viz kap. 6.3.). Při centrifugaci se u stěny centrifugační nádoby hromadí erytrocyty, navnitř od nich leukocyty, dále trombocyty a v centru se odděluje plazma. Plazma je jako první složka vytlačována do pracovního vaku, následována vrstvou buffy-coatu, který obsahuje trombocyty a leukocyty (obr. 14). V okamžiku, kdy nádoba obsahuje pouze erytrocyty, odběrová fáze končí, centrifuga se zastavuje. Druhou fází chodu je fáze transportní, kdy jsou odebrané erytrocyty peristaltickou pumpou přetlačeny z centrifugační nádoby do sběrného vaku (obr. 15). Třetí fází je návrat neodebíraných krevních složek pacientovi – plazma a buffy-coat se pacientovi vrací do žíly, současně se přidává náhradní – kompenzační fyziologický roztok v předem nastaveném poměru 1,5:1 k objemu navracených krevních složek (obr. 16). Doba trvání jednoho pracovního cyklu závisí na nastavení odběrové a návratové rychlosti separátoru. Výše uvedené tři fáze chodu se střídají tak dlouho, až je odebráno požadované množství erytrocytů.

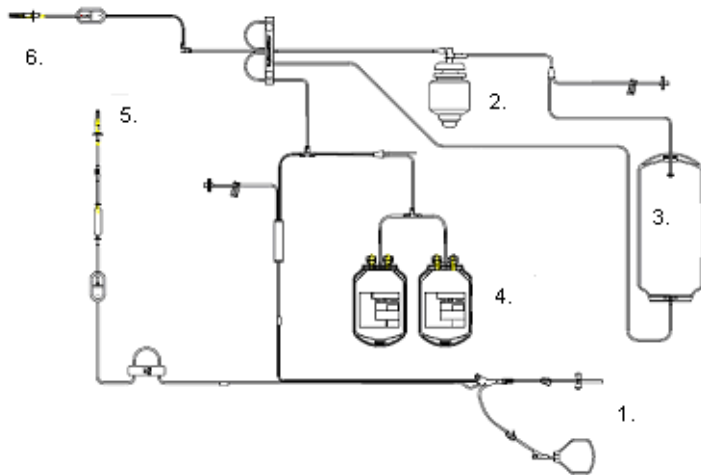
Součástí výbavy přístroje je počítačová jednotka se software (SW, hemokalkulátor), která přístroj řídí. Separátor je obsluhován školeným personálem, který prostřednictvím hemokalkulátoru komunikuje s přístrojem, v úvodu procedury zadává základní údaje o pacientovi, plánuje odběr podle doporučení lékaře a nastavuje variabilní parametry odběru. Během procedury může obsluha upravovat variabilní parametry odběru a tím reagovat na případné nežádoucí reakce pacienta.

**Obr. 12** *Separátor krevních částic Haemonetics MCS+*



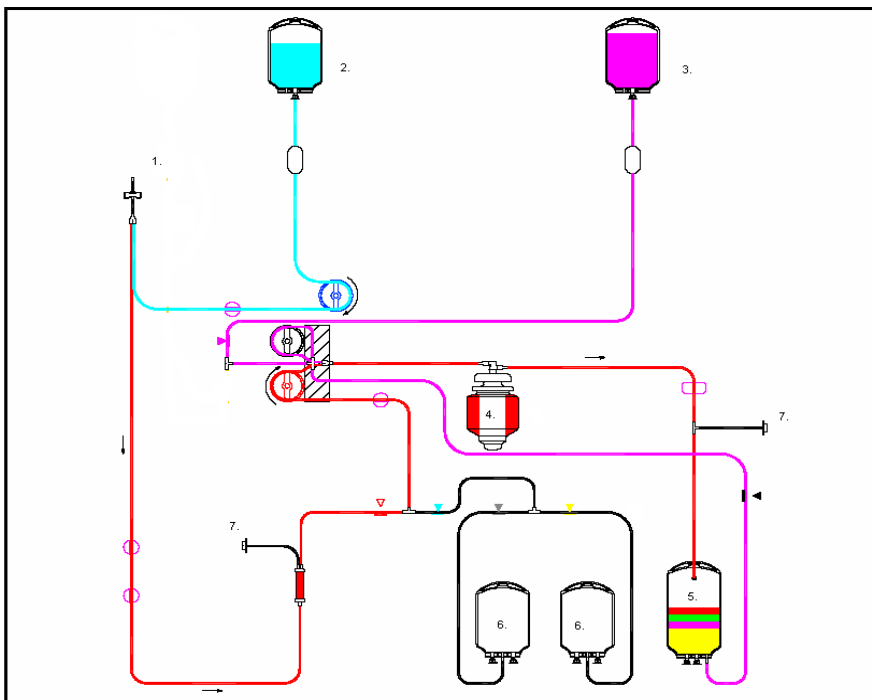
*Legenda: viz text*

**Obr. 13 Schéma jednorázového setu LN 944**



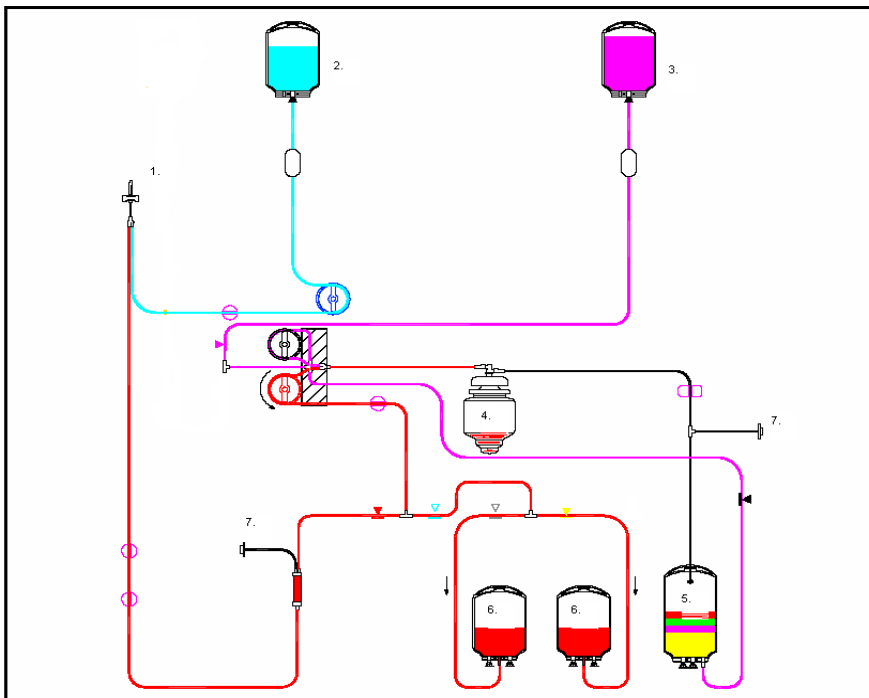
*Legenda: odběrová jehla (1), centrifugační nádoba (2), pracovní vak (3), sběrné vaky na erytrocyty (4), antikoagulační roztok (5), náhradní roztok (6).*

**Obr. 14 Fáze 1: odběr krve do centrifugy, centrifugace krve, přesun plazmy a buffy-coatu do pracovního vaku**



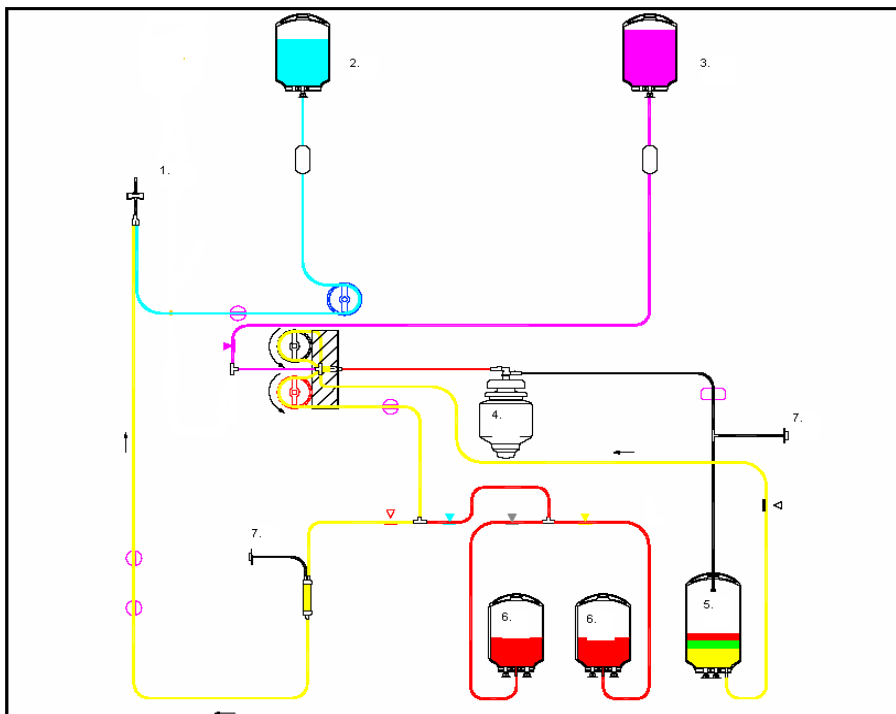
*Legenda: odběrová jehla (1), antikoagulační roztok (2), náhradní roztok (3), centrifugační nádoba (4), pracovní vak (5), sběrné vaky na erytrocyty (6), tlaková čidla (7).*

**Obr. 15** Fáze 2: přesun erytrocytů z centrifugy do sběrných vaků



*Legenda: oběrová jehla (1), antikoagulační roztok (2), náhradní roztok (3), centrifugační nádoba (4), pracovní vak (5), sběrné vaky na erytrocyty (6), čidla (7).*

**Obr. 16** Fáze 3: návrat krevních složek pacientovi z pracovního vaku



*Legenda: oběrová jehla (1), antikoagulační roztok (2), náhradní roztok (3), centrifugační nádoba (4), pracovní vak (5), sběrné vaky na erytrocyty (6), čidla (7).*

## **8.4. PŘÍPRAVA PŘED LÉČEBNÝM ODBĚREM**

### **8.4.1. Poučení pacienta**

Každého pacienta před první léčebnou erythrocytaferézou jsme srozumitelně seznámili s individuálním léčebným plánem při využití erythrocytaferézy, vysvětlili jsme mu případné komplikace výkonu, které mohou nastat během výkonu nebo s časovým odstupem po výkonu a poučili jsme ho o preventivních opatřeních, jak komplikacím předcházet. Každý pacient podepsal Písemný souhlas s léčebnou erythrocytaferézou. U pacientů jsme zjišťovali, zda mají dostatečné informace o své chorobě a zda byli seznámeni s režimovými opatřeními v souvislosti s hemochromatózou (viz kap. 5.4.5.).

### **8.4.2. Vyšetření pacienta**

Před odběrem jsme každého pacienta vyšetřili v rozsahu fyzikálního interního vyšetření (včetně TK, pulzu a teploty). Před opakovaným odběrem jsme aktivně zjišťovali, zda se po předchozím odběru vyskytly pozdní nežádoucí reakce.

### **8.4.3. Příjem tekutin**

Každý pacient byl před odběrem poučen o nutnosti dostatečné hydratace před odběrem a byly mu nabídnuty tekutiny (minimálně 0,5 litru).

### **8.4.4. Příprava separátoru**

Přípravu separátoru k léčebnému odběru jsme prováděli podle návodu k obsluze a podle standardního operačního postupu č. SOP II.4.3.10 – Léčebná aferéza, který je součástí vnitřní dokumentace transfuzního oddělení. Obsluha po zapnutí přístroje nainstalovala jednorázový odběrový set, napojila k odběrovému setu antikoagulační a resuspenzní roztoky a spustila přípravnou fázi odběru (priming), při které separátor naplnil odběrovou hadičku antikoagulačním roztokem a prověřil funkci kontrolních čidel. Obsluha na závěr zkontrolovala dokončení přípravné fáze separátoru.

## 8.5. LÉČEBNÝ ODBĚR

### 8.5.1. Zahájení odběru

Sestra po uložení pacienta na odběrové křeslo provedla po dezinfekci místa vpichu standardní venepunkci, do předem označených zkumavek odebrala požadované vzorky krve, napojila kanylu na odběrový set a spustila chod separátoru. Do SW hemokalkulátoru zadala základní údaje o pacientovi

- pohlaví,
- výšku,
- hmotnost.

Hemokalkulátor vypočetl TBV podle zadaného vzorce (obr. 17)

**Obr. 17 Vzorec pro výpočet TBV [188]**

Pro muže	$\text{Odhadovaný objem krve} = 2740 * \sqrt{\frac{\text{Výška (cm)} * \text{Váha (kg)}}{3600}}$
Pro ženy	$\text{Odhadovaný objem krve} = 2370 * \sqrt{\frac{\text{Výška (cm)} * \text{Váha (kg)}}{3600}}$

*Legenda: viz text*

Obsluha dále zadala do hemokalkulátoru na základě indikace lékaře

- množství odebíraných erytrocytů (ml),
- počet cyklů,
- objem kompenzačního roztoku,
- odběrovou a návratovou rychlost.

Hemokalkulátor přístroje vypočítal výsledný hematokrit pacienta po proceduře a stanovil očekávanou dobu trvání výkonu (obr. 18).

### Obr. 18 Hemokalulátor v úvodu procedury

TAE C.A.	STOP		
0 ml Volume Processed			Cycle 0
<b>HAEMO CALCULATOR</b>			
HCT	42 %	Post Donation Hct	34 %
Sex	M	Compensation	400 ml
Height	175 cm	Target RBC	400 ml
Weight	75 kg	Target Cycles	2
Blood Volume	4984 ml		
Press MODIFY to select, +/- to change value. Press SAVE to save all values. Press HELP to return to main Display.			

Legenda: viz text

#### 8.5.2. Odběr

Přístroj automaticky přidával k odebírané plné krvi protisrážlivý roztok CPD-50 (kat.č. 416C, Haemonetics Corp., Braintree MA, USA) (tab. 4) v poměru 1:14, roztok se mísil s odebíranou krví v blízkosti venepunkční jehly na konci venepunkční kanyly.

Tab. 4 Složení antikoagulačního roztoku CPD-50

Acidum citricum anhydr.	0,448 g
Natrii citras dihydr.	3,95 g
Natrii hydrogenphosphat. monohydr.	0,376 g
Glucosa	5,0 g
Agua pro injectione	ad 100,0 g

SW separátoru sledoval pomocí tlakových a pohybových čidel, zda

- docházelo k poklesu tlaku v odběrové hadičce,
- docházelo k vzestupu tlaku v návratové hadičce,
- byly přítomny vzduchové bubliny v návratové hadičce.

Pokud k některé z těchto komplikací došlo, přístroj vydal alarm a zpomalením či zastavením procedury zabránil poškození pacienta.

Během odběru byl pacient pod dozorem sestry, která aktivně pátrala, zda se objevují nežádoucí reakce u pacienta. Pokud se reakce objevily, po konzultaci s lékařem byly reakce léčeny a byly upraveny parametry odběru. Nežádoucí reakce byly zaznamenány.



### 8.5.3. Ukončení odběru

Po odebrání příslušného množství erytrocytů sestra ukončila odběr. Na konci odběru zobrazil SW - hemokalkulátor data o proběhlém odběru (obr. 19). Získaná data (množství odebraných erytrocytů, spotřebované množství protisrážlivého a náhradního roztoku, objem zpracované krve a dobu trvání procedury) jsme zaznamenali do dokumentace pacienta. Pro výpočet celkového množství odebraných erytrocytů byl použit korekční koeficient 0,85 (hematokrit erytrocytů v odpadním vaku separátoru). Po ukončení odběru sestra odebrala pacientovi vzorek krve na kontrolní vyšetření krevního obrazu, ukončila venepunkci, ošetřila místo vpichu a standardním způsobem pečovala o pacienta.

**Obr. 19 Hemokalkulátor na konci odběru**

TAE C.A.		
<b>PROCEDURE COMPLETE</b>		
RBC Collected	632	g
Additive Used	200	ml
AC Volume Used	60	ml
Compensation Used	400	ml
Plasma Bag Cont.	0	g
Volume Processed	1000	ml
Elapsed Time	30	min

*Legenda: viz text*

## 8.6. LABORATORNÍ VYŠETŘENÍ

Během odběru jsme u každého pacienta sledovali následující parametry:

- před odběrem krevní obraz, hladinu železa, TIBC, saturaci transferinu a hladinu feritinu,
- po odběru krevní obraz.

Krevní obraz jsme vyšetřovali v hematologické laboratoři transfuzního oddělení na přístroji NK Celltac Alfa (Nihon Kohden, Tokyo, Japonsko), od 20.12.2018 na přístroji Celldyne Ruby (Abbott Laboratories, Santa Clara, CA, USA) .

Vzorky na vyšetření hladin železa, TIBC a saturace transferinu jsme odesílali do laboratoře Ústavu klinické biochemie a diagnostiky FN, kde byly vyšetřeny následujícími metodami:

Hladina železa byla stanovena kolorimetrickou metodou na biochemickém automatickém analyzátoru Cobas Modular (Roche, Basel, Švýcarsko), od 1. 4. 2015 na biochemickém automatickém analyzátoru Cobas 8000 (Roche, Basel, Švýcarsko).

Vazebná kapacita transferinu pro železo (UIBC, unsaturated iron binding capacity) byla vyšetřována spektrofotometrickou metodou na biochemickém automatickém analyzátoru Cobas Modular (Roche, Basel, Švýcarsko), od 1. 4. 2015 na biochemickém automatickém analyzátoru Cobas 8000 (Roche, Basel, Švýcarsko). Celková vazebná kapacita železa (TIBC) byla určena jako součet hladiny železa a UIBC.

Saturace transferinu byla vypočtena jako podíl hodnot železa a TIBC.

Hladina feritinu byla vyšetřována na Oddělení nukleární medicíny FN HK enzymovou imunoanalýzou na mikročásticích MEIA na přístroji Abbott AxSYM (Abbott Laboratories Diagnostics Division, Abbott Park, IL, USA), od 1. dubna 2015 na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky FNHK turbidimetrickou imunologickou metodou na biochemickém automatickém analyzátoru Cobas 8000 (Roche, Basel, Švýcarsko).

Mutace genu HFE byly vyšetřovány na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky FN HK metodou genotypizační analýzy restričních fragmentů.

## 8.7. STATISTICKÉ METODY

Cílem statistického zhodnocení bylo vyhodnocení sledovaných parametrů souboru nemocných v čase. Pro statistickou analýzu byl použit software NCSS 2007 (NCSS LLC., Kaysville, UT, USA). Statistické postupy byly před zahájením výzkumu a pak průběžně konzultovány s Katedrou lékařské biofyziky Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze. Pro posouzení míry lineární souvislosti byl použit neparametrický Spearmanův koeficient pořadové korelace. Pro testování hypotézy shody vůči alternativě neshody byl použit dvouvýběrový t-test a neparametrický Mann-Whitney, Kolmogorov-Smirnovův test. Pro testování hypotézy nezávislosti hodnot byl použit Fischerův test. Minimální počet osob v souboru léčených pacientů byl stanoven na 40 osob. Za statisticky významnou byla považována hodnota  $p < 0,05$ .

## 9. VÝSLEDKY

### 9.1. SOUBOR NEMOCNÝCH

Pacienti s HH byli do souboru nemocných průběžně zařazováni v období od 1. ledna 2004 do 31. prosince 2019 (viz kap. 8.1. Metodika).

#### 9.1.1. Vyhledání nemocných mezi dárci krve - screening HH u dárců krve

V období 1. prosince 2004 – 31. ledna 2005 bylo vyšetřeno celkem 1348 dárců plné krve, 809 mužů (60 %) a 539 žen (40 %). Průměrný věk dárců byl  $37 \pm 11$  roků (medián 35 roků, rozmezí 18 – 65 roků) u mužů a  $35 \pm 11$  roků (medián 34 roků, rozmezí 18 – 65 roků) u žen. Hodnoty hemoglobinu, hematokritu, hladiny železa, TIBC a saturace transferinu jsou uvedeny v tab. 5 a 6.

**Tab. 5** *Výsledky screeningu dárců krve – muži (n= 809)*

	AV $\pm$ SD	Medián	Rozmezí	Norma
Hemoglobin (g/l)	150,8 $\pm$ 8,6	150	125 – 170	130 – 176
Hematokrit	0,44 $\pm$ 0,03	0,44	0,35 – 0,54	0,39 – 0,51
Fe ( $\mu$ mol/l)	23,8 $\pm$ 9,2	22,8	5,4 – 69,7	5,8 – 34,5
TIBC ( $\mu$ mol/l)	59,7 $\pm$ 8,3	59,5	0,6 – 87,6	40,8 – 76,6
Saturace transferinu	0,40 $\pm$ 0,15	0,39	0,08 – 0,99	0,20 – 0,50

**Tab. 6** *Výsledky screeningu dárců krve – ženy (n=539)*

	AV $\pm$ SD	Medián	Rozmezí	Norma
Hemoglobin (g/l)	132,3 $\pm$ 8,1	132	109 – 152	120 – 160
Hematokrit	0,39 $\pm$ 0,02	0,39	0,31 – 0,47	0,35 – 0,46
Fe ( $\mu$ mol/l)	22,2 $\pm$ 10,7	20,5	0,7 – 71,9	5,8 – 34,5
TIBC ( $\mu$ mol/l)	59,7 $\pm$ 8,3	59,5	0,6 – 87,6	40,8 – 76,6
Saturace transferinu	0,35 $\pm$ 0,16	0,33	0,06 – 1,00	0,20 – 0,50

U 255 mužů (31,5 %) byla zjištěna hodnota saturace transferinu vyšší než 0,45, u 165 žen (30,6 %) byla zjištěna hodnota saturace transferinu nad 0,40. U těchto dárců a dárkyň byla vyšetřena hladina feritinu. Průměrná hodnota feritinu ( $\pm$ SD) byla  $85,1 \pm 40,6$   $\mu$ g/l u mužů a  $26,6 \pm 18,2$   $\mu$ g/l u žen (tab. 7).

**Tab. 7 Hladina feritinu u mužů a žen se zvýšenou hodnotou saturace transferinu**

	AV ± SD	Medián	Rozmezí	Norma
Muži (n=255) µg/l	85,1 ± 40,6	79,7	18,6 – 211,1	17,0 – 230,0
Ženy (n=165) µg/l	26,6 ± 18,2	23,3	4,1 – 123,8	14,0 – 150,0

U 5 mužů a 3 žen byla zjištěna hodnota feritinu výrazně vybočující nad průměrnou hodnotu (muži > 190 µg/l, ženy > 100 µg/l). Vzoroky krve těchto dárců byly odeslány na genetické vyšetření mutací HFE. U 3 dárců byly zjištěny následující mutace HFE genu: 1× H63D homozygot, 1× C282Y/H63D smíšený heterozygot a 1× C282Y heterozygot. Vzhledem k normálním hodnotám feritinu (do 230 µg/l u mužů a do 150 µg/l u žen) nebyl žádný z dárců zařazen do souboru léčených pacientů s HH.

### 9.1.2. Pacienti s HH předání k léčbě z ambulancí

V období od 1. ledna 2004 do 31. prosince 2019 bylo na naše oddělení celkem odesláno k léčbě 45 pacientů s diagnózou HH se zvýšenou hladinou feritinu, u nichž bylo rozhodnuto o nutnosti léčby.

### 9.1.3. Pacienti z rodinných studií

Celkem bylo vyšetřeno 6 osob – příbuzných pacientů s diagnostikovanou HH, u 5 z nich byla zjištěna mutace HFE (3× homozygot C282Y, 1 × smíšený heterozygot C282Y/H63D, 1× heterozygot H63D). Dva z těchto pacientů měli známky akumulace železa se zvýšenými hodnotami saturace transferinu i feritinu a byli proto zařazeni do souboru léčených.

## 9.2. CHARAKTERISTIKA SOUBORU

Celkem bylo do souboru zařazeno 47 pacientů, u kterých byla nově zjištěna hereditární hemochromatóza se známkami akumulace železa. Všichni byli zařazeni do programu léčby erythrocytaferézami.

### 9.2.1. Zastoupení mutací HFE v souboru

U 33 pacientů (70,2 %) byla zjištěna homozygotní mutace C282Y, 3 pacienti byli smíšení heterozygoti C282Y/H63D, 4 homozygoti H63D, 3 heterozygoti H63D, jeden heterozygot C282Y, 3 pacienti byli negativní pro všechny 3 vyšetřované mutace (tab. 8).

**Tab. 8 Zastoupení mutací HFE genu v souboru léčených pacientů (n=47)**

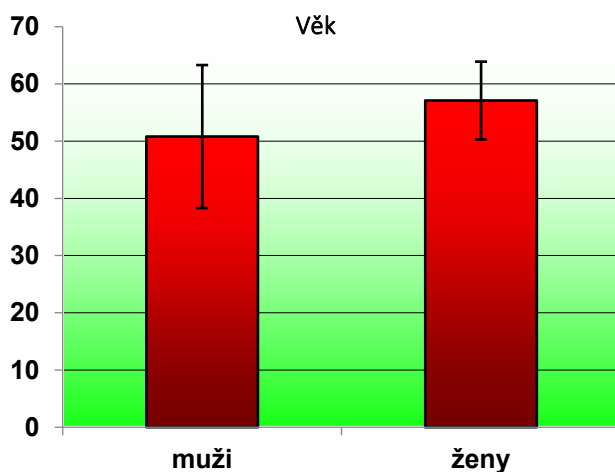
Mutace	Počet pacientů	%
C282Y/C282Y	33	70,2
C282Y/H63D	3	6,4
H63D/H63D	4	8,5
C282Y/-	1	2,1
H63D/-	3	6,4
nezjištěna (-/-)	3	6,4

### 9.2.2. Demografická data souboru

V souboru léčených je zastoupeno 37 mužů a 10 žen. Mezi pacienty se vyskytují 4 dvojice přímých příbuzných: 2× otec – syn, 1× otec – dcera a 1× bratři.

Průměrný věk pacientů v okamžiku zahájení léčby byl  $52 \pm 12$  roků (medián 52 roků), nejmladšímu nemocnému bylo 29 let, nejstarší pacient začínal s léčbou ve věku 75 let. V souboru nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl ( $p=0,14$ ) mezi věkem mužů ( $50,8 \pm 12,4$  roků, medián 52, meze 29 – 75) a věkem žen ( $57,1 \pm 6,8$  roků, medián 58,5, meze 47 – 67 roků) (graf 1).

**Graf 1 Průměrný věk mužů (n=37) a žen (n=10)**



*Legenda: Srovnání průměrného věku mužů a žen, nebyl nalezen statisticky významný rozdíl ( $p=0,14$ ).*

Seznam pacientů, jejich věk při zahájení indukční léčby, zjištěné mutace HFE genu, hmotnost, výška a TBV jsou uvedeny v tabulce 9.

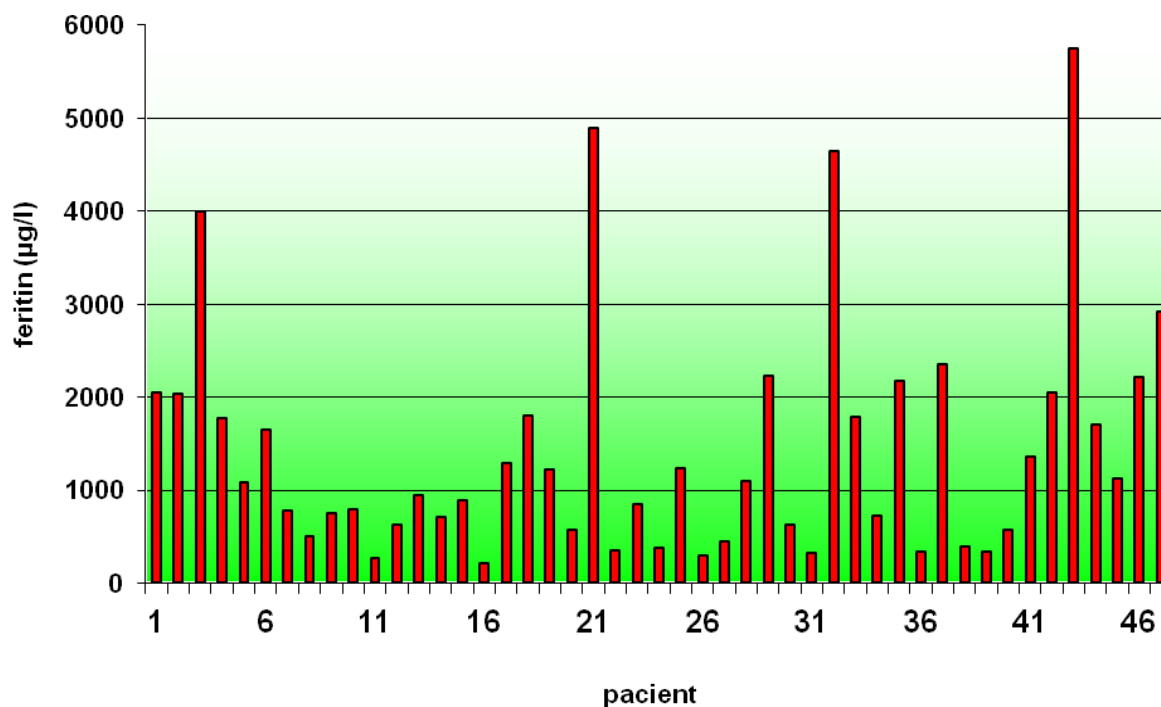
**Tab. 9 Soubor pacientů – přehled údajů (n=47)**

Pacient	Pohlaví	Věk	Mutace HFE	Výška	Váha	TBV
1	muž	52	C282Y/C282Y	182	85	5680
2	žena	50	C282Y/C282Y	166	55	3774
3	muž	37	C282Y/C282Y	180	80	5480
4	muž	52	C282Y/C282Y	173	70	5025
5	žena	62	C282Y/C282Y	160	80	4469
6	muž	55	C282Y/C282Y	178	83	5551
7	muž	44	C282Y/C282Y	190	105	6450
8	muž	37	C282Y/C282Y	185	70	5197
9	muž	53	C282Y/C282Y	185	90	5893
10	muž	52	C282Y/C282Y	175	80	5403
11	muž	32	C282Y/H63D	187	87	5825
12	muž	62	C282Y/C282Y	172	72	5082
13	muž	56	C282Y/C282Y	170	80	5326
14	žena	52	C282Y/C282Y	168	95	4990
15	muž	50	C282Y/C282Y	180	110	6426
16	muž	36	C282Y/H63D	175	75	5232
17	žena	67	C282Y/H63D	162	90	4770
18	muž	55	C282Y/C282Y	182	95	6005
19	muž	37	H63D/H63D	180	98	6051
20	muž	59	H63D/H63D	181	97	6065
21	muž	60	C282Y/C282Y	174	82	5455
22	muž	34	C282Y/-	174	90	5715
23	muž	34	C282Y/C282Y	185	114	6632
24	muž	37	H63D/-	178	88	5715
25	žena	62	C282Y/C282Y	164	64	4047
26	žena	49	C282Y/C282Y	155	54	3614
27	muž	46	C282Y/C282Y	180	98	6065
28	muž	73	C282Y/C282Y	171	77	5240
29	žena	59	-/-	176	77	4598
30	žena	47	C282Y/C282Y	170	74	4430
31	žena	65	C282Y/C282Y	170	97	5072
32	muž	41	C282Y/C282Y	169	68	4896
33	muž	65	C282Y/C282Y	170	100	5954
34	muž	40	H63D/H63D	176	86	5618
35	žena	58	C282Y/C282Y	172	76	4516
36	muž	46	C282Y/C282Y	186	91	5941
37	muž	45	C282Y/C282Y	183	108	6420
38	muž	45	C282Y/C282Y	170	95	5803
39	muž	70	C282Y/C282Y	172	70	5011
40	muž	29	C282Y/C282Y	185	74	5343
41	muž	69	-/-	179	99	6079
42	muž	53	H63D/-	180	114	6542
43	muž	62	H63D/H63D	173	88	5635
44	muž	52	H63D/-	182	103	6252
45	muž	71	C282Y/C282Y	171	77	5240
46	muž	75	-/-	175	81	5437
47	muž	62	C282Y/C282Y	184	85	5711

### 9.3. LABORATORNÍ HODNOTY PŘED ZAHÁJENÍM LÉČBY

Hladina feritinu před zahájením léčby u pacientů byla 213,9 – 5743,8 µg/l, (průměr 1429,0 ± 1248,9 µg/l, medián 1086,8 µg/l) (graf 2).

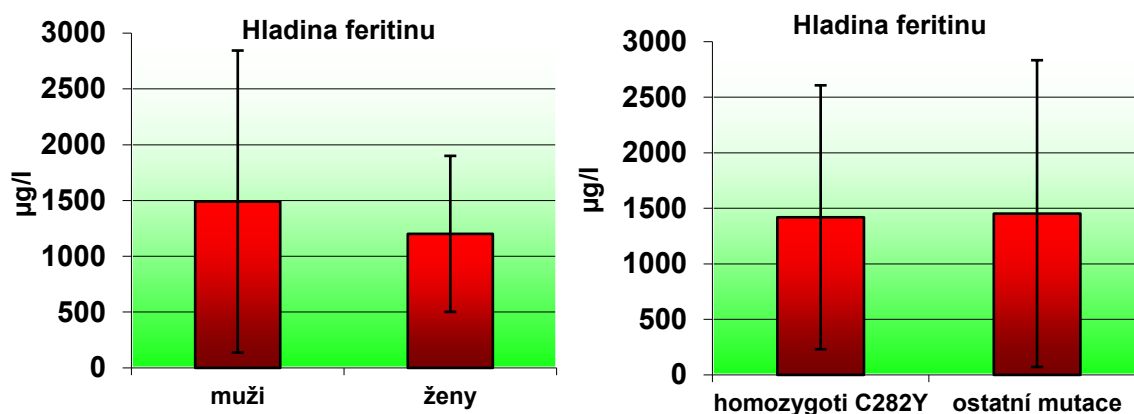
Graf 2 *Hodnoty feritinu před zahájením léčby (n=47)*



*Legenda: viz text*

Celkem 24 pacientů (51 %) mělo hladinu feritinu nad 1000 µg/l, 13 pacientů (28 %) v intervalu 500 – 1000 µg/l, 10 pacientů (21 %) mělo hladinu feritinu nižší než 500 µg/l. Nenalezli jsme statisticky významný rozdíl ( $p=0,88$ ) mezi hodnotami feritinu u mužů ( $1490,7 \pm 1353,4$  µg/l, medián 946,5 µg/l, rozmezí 213,9 – 5743,8 µg/l) a žen ( $1201,0 \pm 698,6$  µg/l, medián 1163,0 µg/l, rozmezí 292,3 – 2229,1 µg/l). Obdobně nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl ( $p=0,92$ ) mezi hladinou feritinu v souboru homozygotů C282Y ( $1419,3 \pm 1188,0$  µg/l, medián 946,5 µg/l, rozmezí 292,3 – 4899,3 µg/l) a v souboru pacientů s ostatními mutacemi ( $1451,9 \pm 1381,0$  µg/l, medián 1255,6 µg/l, rozmezí 213,9 – 5743,8 µg/l) (graf 3).

**Graf 3 Porovnání hladiny feritinu v souborech mužů a žen a v souborech pacientů s homozygotní mutací C282Y a pacientů s ostatními mutacemi**



*Legenda: Rozdíly hladin feritinu v souborech mužů a žen a v souborech pacientů s homozygotní mutací C282Y a pacientů s ostatními mutacemi nejsou statisticky významné ( $p > 0,05$ ).*

Počáteční hodnoty hladiny železa, TIBC, saturace transferinu a feritinu zjištěné u nemocných před zahájením léčby jsou uvedeny v tabulce 10.

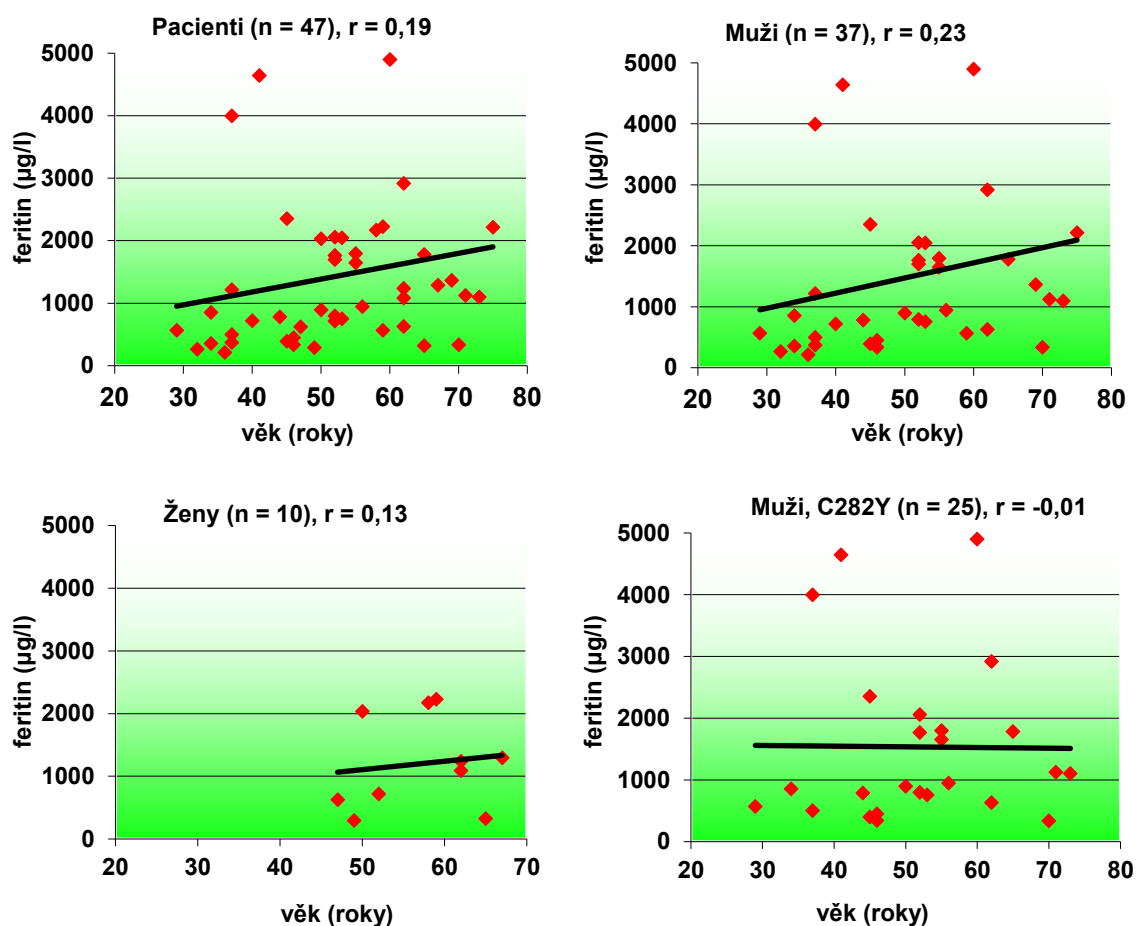
**Tab. 10 Hodnoty feritinu, hladiny železa, TIBC a saturace transferinu před léčbou (n=47)**

	AV ± SD	medián	rozmezí	norma
Feritin (µg/l)	1429,0 ± 1248,9	1086,8	213,9 – 5743,8	14 – 150 ženy 17 – 230 muži
Železo (µmol/l)	35,0 ± 8,9	36,0	19,7 – 52,1	5,8 – 34,5
TIBC (µmol/l)	44,4 ± 5,7	44,7	32,9 – 58,3	40,8 – 76,6
Saturace transferinu	0,77 ± 0,19	0,86	0,40 – 0,98	0,20 – 0,45

Nebyla zjištěna statisticky významná závislost hladiny feritinu na věku pacientů v souboru všech pacientů ( $p=0,19$ ), v souboru mužů ( $p=0,17$ ), žen ( $p=0,72$ ) ani u pacientů s homozygotní mutací C282Y ( $p=0,87$ ) (graf 4).



**Graf 4** Závislost hladiny feritinu na věku pacienta v souboru všech pacientů, v souboru mužů, žen a mužů – homozygotů C282Y



*Legenda: Závislost hladin feritinu na věku pacientů ve všech 4 souborech není statisticky významná ( $p > 0,05$ ).*

## 9.4. INDUKČNÍ LÉČBA

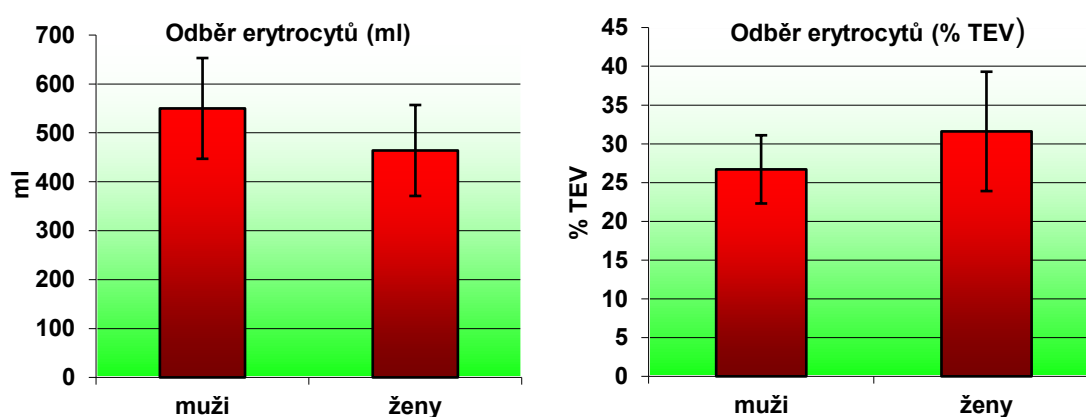
Celkem bylo provedeno 501 léčebných erythrocytaferéz (379 u mužů, 122 u žen), průměrně 10,6 u každého pacienta (medián 7, rozmezí 1 – 70). Jeden výkon trval od 21 do 145 minut (průměr  $63 \pm 19$  minut, medián 61 minut).

### 9.4.1. Množství odebraných erythrocytů při jedné erythrocytaferéze

Při jedné erythrocytaferéze bylo odebráno  $532 \pm 107$  ml erythrocytů (medián 538 ml, rozmezí 69 – 837 ml). V souboru mužů činil průměrný objem odebraných erythrocytů  $550 \pm 103$  ml (medián 554 ml, rozmezí 116 – 837 ml), u žen  $464 \pm 93$  ml (medián 451 ml, rozmezí 69 – 612 ml).

ml), rozdíl mezi souborem mužů a žen je statisticky významný ( $p < 0,05$ ). Výše uvedené množství odebraných erytrocytů znamená, že bylo při jednom odběru odebráno u mužů  $26,7 \pm 4,4$  % (medián 26,5 %, rozmezí 15,3 – 34,7 %) celkového vypočteného objemu erytrocytů (TEV) a u žen  $31,6 \pm 7,7$  % TEV (medián 28,6 %, rozmezí 21,1 – 41,1 %). Rozdíl v % TEV mezi souborem mužů a žen není statisticky významný ( $p = 0,19$ ) (graf 5).

**Graf 5** Objem odebraných erytrocytů při jedné erytrocytaferéze

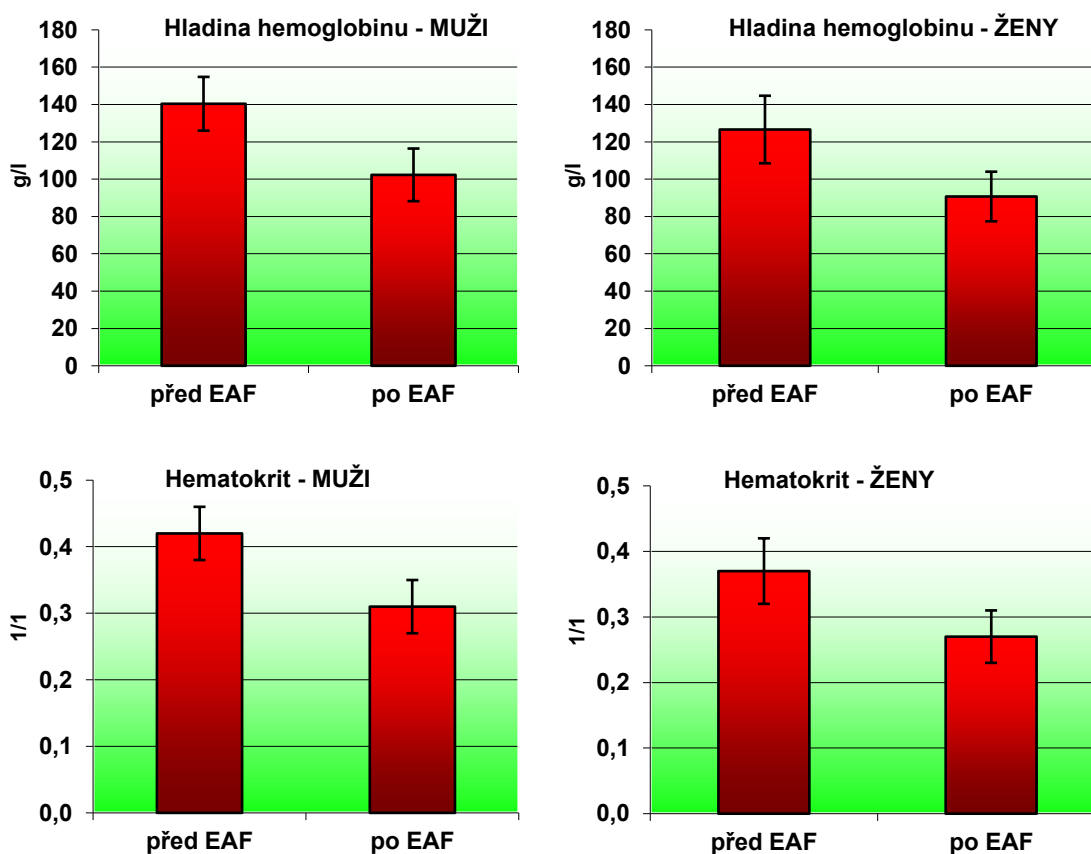


*Legenda: Rozdíl v množství odebraných erytrocytů (v ml) v souborech mužů a žen je statisticky významný ( $p < 0,05$ ). Rozdíl v množství odebraných erytrocytů vyjádřený jako % TEV v souborech mužů a žen není statisticky významný ( $p = 0,19$ ).*

#### 9.4.2. Změna hodnot krevního obrazu

Odběrem erytrocytů se snížila hladina hemoglobinu u mužů z  $140,4 \pm 14,4$  g/l (medián 142 g/l, rozmezí 108 – 186 g/l) před odběrem na  $102,3 \pm 14,1$  g/l (medián 102 g/l, rozmezí 74 – 143 g/l) po odběru, resp. u žen z  $126,6 \pm 18,1$  g/l (medián 122 g/l, rozmezí 103 – 153 g/l) na  $90,7 \pm 13,3$  g/l (medián 90 g/l, rozmezí 75 – 123 g/l). Hematokrit klesl z  $0,42 \pm 0,04$  (medián 0,42, rozmezí 0,31 – 0,53) na  $0,31 \pm 0,04$  (medián 0,31, rozmezí 0,22 – 0,42) u mužů, resp. z  $0,37 \pm 0,05$  (medián 0,37, rozmezí 0,28 – 0,47) na  $0,27 \pm 0,04$  (medián 0,27, rozmezí 0,22 – 0,36) u žen. Změny hodnot hemoglobinu a hematokritu v souboru mužů i žen jsou statisticky signifikantní ( $p < 0,05$ ) (graf 6).

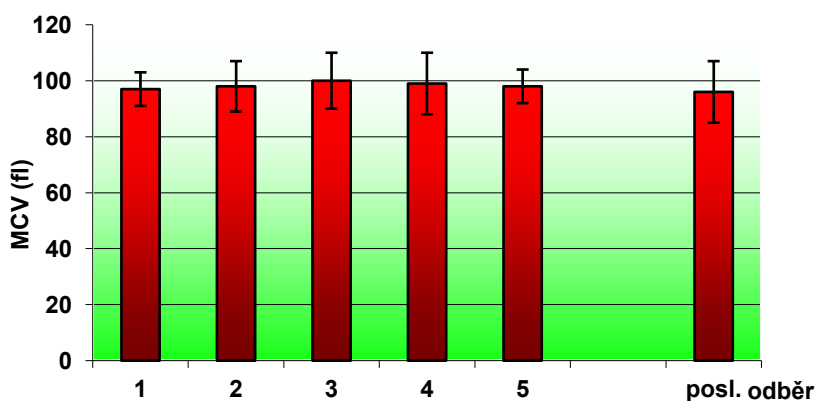
**Graf 6 Snížení hladiny hemoglobinu a hematokritu po erythrocytaferéze**



*Legenda: Porovnání hodnot hemoglobinu a hematokritu před a po erythrocytaferéze, pokles hodnot je ve všech 4 souborech statisticky významný ( $p < 0,05$ ).*

Střední objem erytrocytů (MCV) poklesl v souboru všech pacientů z  $97,0 \pm 6,0$  fl (medián 97,9 fl, rozmezí 84 – 109 fl) na  $96,3 \pm 10,8$  fl (medián 98 fl, rozmezí 79 – 112 fl) po posledním odběru, změny MCV nejsou statisticky signifikantní ( $p > 0,05$ ) (graf 7).

**Graf 7 Změny středního objemu erytrocytů v závislosti na odběrech**



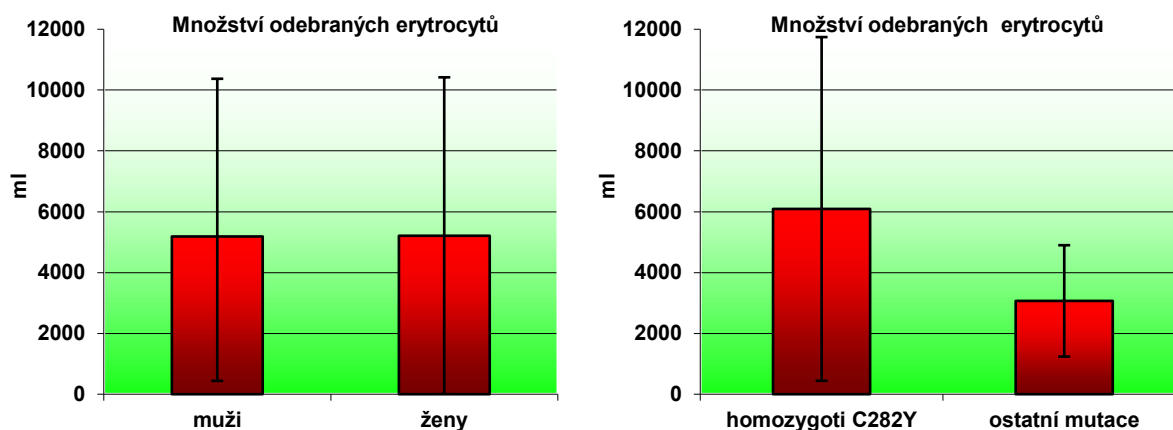
*Legenda: Změny hodnot MCV mezi jednotlivými odběry nejsou statisticky významné ( $p > 0,05$ ).*

### 9.4.3. Doba léčby, množství odebraných erytrocytů během indukční léčby

Indukční léčba trvala průměrně 5,7 měsíce (směrodatná odchylka 6,3 měsíce, medián 4 měsíce), nejkratší doba byla 1 měsíc, maximální doba léčby byla 36 měsíců. Interval mezi dvěma odběry byl  $19,4 \pm 6,4$  dnů (medián 18, rozmezí 10 – 36 dnů).

V průběhu indukční léčby bylo pacientům odebráno celkem 5191 ml erytrocytů (medián 3849 ml, směrodatná odchylka 5001 ml, rozmezí 410 – 26927 ml). V souboru mužů bylo odebráno  $5186 \pm 4747$  ml (medián 3877 ml, rozmezí 410 – 26927 ml), v souboru žen  $5210 \pm 5846$  ml (medián 3482 ml, rozmezí 607 – 21707 ml), rozdíl mezi souborem mužů a žen není statisticky významný ( $p=0,52$ ). V souboru pacientů s homozygotní mutací C282Y bylo odebráno  $6092 \pm 5651$  ml (medián 4491 ml, rozmezí 607 – 26927 ml), v souboru pacientů s ostatními mutacemi  $3068 \pm 1831$  ml (medián 2816 ml, rozmezí 410 – 8210 ml), rozdíl mezi těmito soubory je statisticky významný ( $p<0,05$ ) (graf 8).

**Graf 8 Celkové množství odebraných erytrocytů při indukční léčbě**



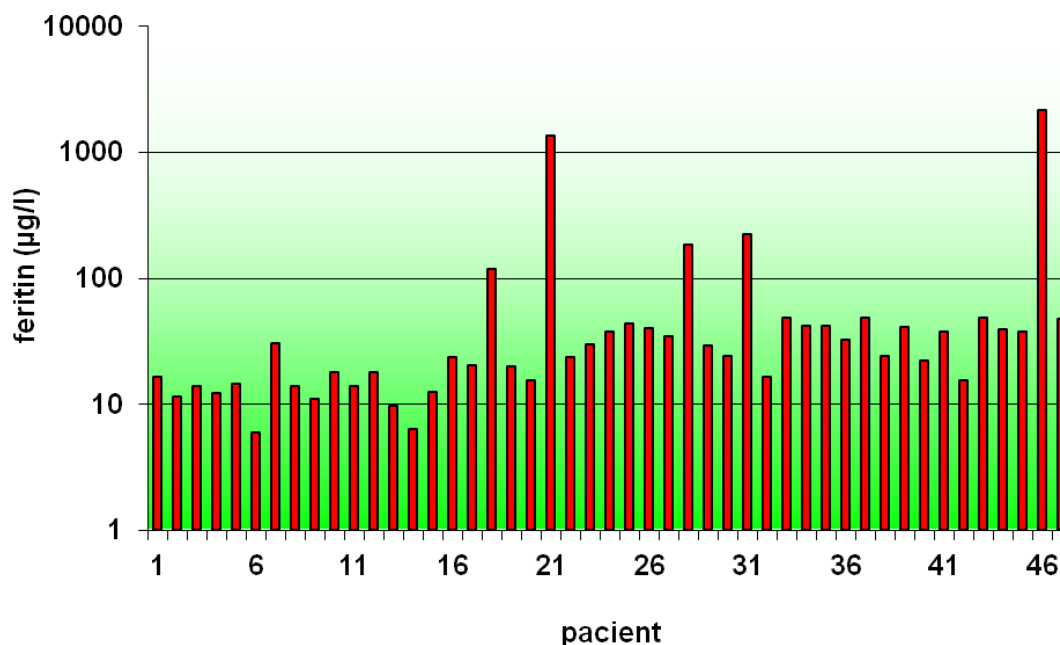
*Legenda: Porovnání množství odebraných erytrocytů při indukční léčbě mezi souborem mužů a žen (rozdíl není statisticky významný ( $p=0,52$ )). Rozdíl mezi souborem homozygotů C282Y a souborem pacientů s ostatními mutacemi je statisticky významný ( $p<0,05$ ).*

## 9.5. LABORATORNÍ HODNOTY PO UKONČENÍ INDUKČNÍ LÉČBY

Stanovený cíl léčby, pokles hladiny feritinu pod  $50 \mu\text{g/l}$ , byl splněn u 42 z 47 pacientů. Dosažená hodnota feritinu na konci léčby u 42 vyléčených pacientů byla  $26,2 \pm 13,0 \mu\text{g/l}$ , medián 23,9, rozmezí 6,0 – 49,1  $\mu\text{g/l}$  (graf 9). U 11 pacientů poklesla hladina feritinu po

posledním odběru pod 15 µg/l, u 12 pacientů byla výsledná hodnota feritinu v rozmezí 15 – 25 µg/l (tab. 11).

**Graf 9** Hodnoty feritinu po ukončení indukční léčby (n=47)



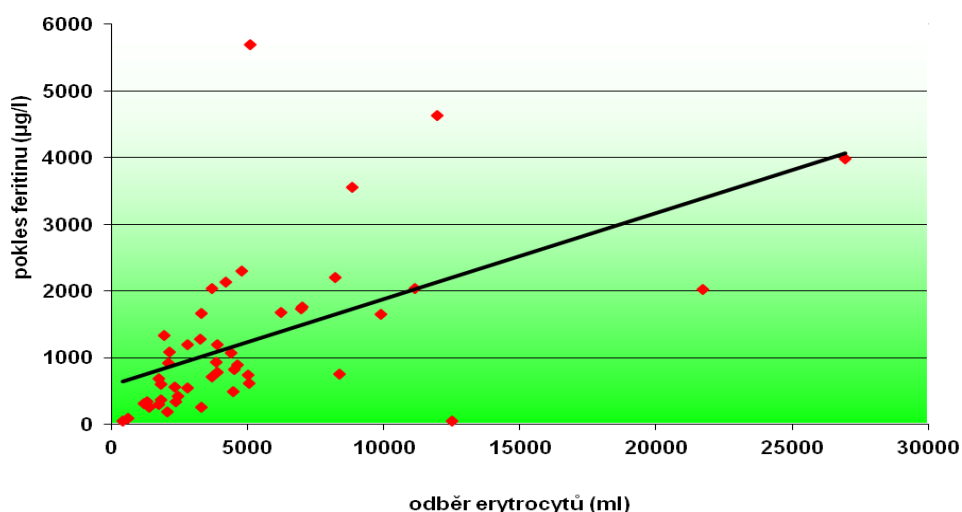
*Legenda: viz text*

**Tab. 11** Hladina feritinu po posledním odběru (n=47)

Feritin (µg/l)	Počet pacientů
0 – 15,0	11
15,1 – 25,0	12
25,0 – 50,0	19
> 50,0	5

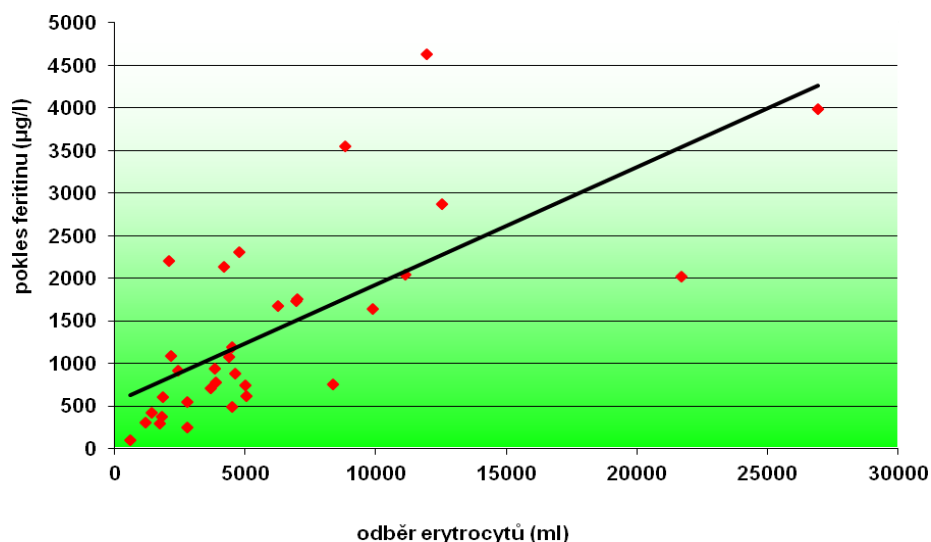
Pokles hladiny feritinu v souboru všech (n=47) pacientů koreloval ( $r=0,66$ ,  $p<0,05$ ) s množstvím odebraných erytrocytů. Těsnější korelace byla prokázána v souboru pacientů s homozygotní mutací C282Y ( $r=0,77$ ,  $p<0,05$ ) (graf 10 a 11).

**Graf 10** *Závislost poklesu feritinu na množství odebraných erytrocytů (n=47)*



*Legenda: Statisticky významná závislost poklesu feritinu na množství odebraných erytrocytů byla prokázána v souboru všech pacientů ( $r=0,66$ ,  $p<0,05$ ).*

**Graf 11** *Závislost poklesu hladiny feritinu na množství odebraných erytrocytů (soubor homozygotů C282Y, n=33)*

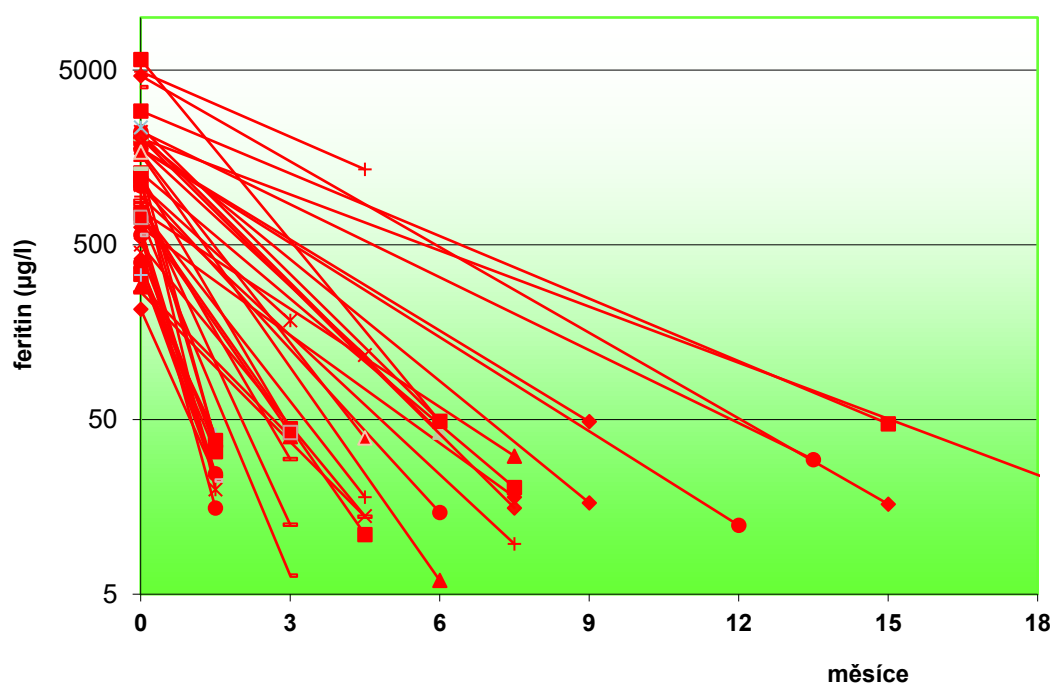


*Legenda: Statisticky významná závislost poklesu hladiny feritinu na množství odebraných erytrocytů byla prokázána u pacientů s homozygotní mutací C282Y ( $r=0,77$ ,  $p<0,05$ ).*

Rychlost poklesu hladiny feritinu, vyjádřená úbytkem feritinu za měsíc, dosáhla hodnoty  $297 \pm 195 \mu\text{g/l}$ , medián  $274 \mu\text{g/l}$ , rozmezí  $64 - 949 \mu\text{g/l}$ . Nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v rychlosti poklesu feritinu mezi souborem pacientů s homozygotní mutací C282Y a souborem

pacientů s ostatními mutacemi ( $p=0,36$ ). Rychlost poklesu feritinu u C282Y homozygotů byla  $267 \pm 142 \mu\text{g/l}$  (medián  $274 \mu\text{g/l}$ , rozmezí  $84 - 645 \mu\text{g/l}$ ), u pacientů s ostatními mutacemi  $384 \pm 270 \mu\text{g/l}$  (medián  $267 \mu\text{g/l}$ , rozmezí  $64 - 949 \mu\text{g/l}$ ). Ani mezi souborem mužů a souborem žen nebyl prokázán statisticky významný rozdíl ( $p=0,51$ ) v rychlosti poklesu feritinu (muži  $300 \pm 205 \mu\text{g/l}$  (medián  $274 \mu\text{g/l}$ , rozmezí  $64 - 949 \mu\text{g/l}$ ), ženy  $266 \pm 150 \mu\text{g/l}$  (medián  $182 \mu\text{g/l}$ , rozmezí  $84 - 502 \mu\text{g/l}$ ) (graf 12).

**Graf 12** *Závislost poklesu hladiny feritinu na době léčby (n=47)*



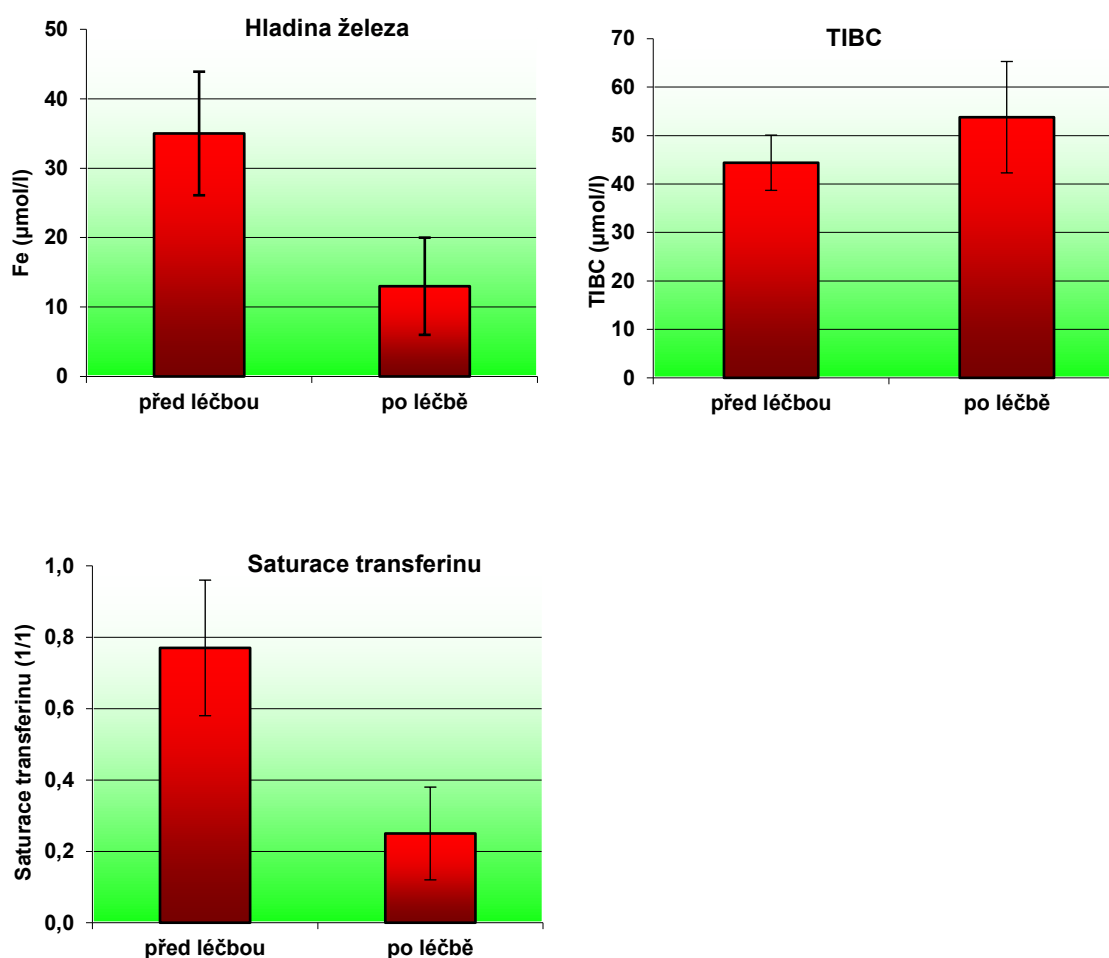
*Legenda: Závislost poklesu hladiny feritinu na době léčby. Strmost křivky vyjadřuje rychlost poklesu hladiny feritinu (viz text).*

Všechny tři sledované markery metabolismu železa se po ukončení indukční léčby statisticky významně ( $p<0,05$ ) upravily. Hladina železa klesla z původní hodnoty  $35,0 \mu\text{mol/l}$  na  $13,0 \mu\text{mol/l}$  po léčbě, TIBC stoupla z  $44,4 \mu\text{mol/l}$  na  $53,8 \mu\text{mol/l}$ . Saturace transferinu klesla z  $0,77$  na  $0,25$  po skončení léčby (tab. 12, graf 13).

**Tab 12 Hodnoty hladiny železa, TIBC a saturace transferinu po léčbě (n=47)**

	AV ± SD	Medián	Rozmezí	Norma
Železo (μmol/l)	13,0 ± 7,0	10,6	4,2 – 29,5	5,8 – 34,5
TIBC (μmol/l)	53,8 ± 11,5	51,1	33,4 – 72,2	40,8 – 76,6
Saturace transferinu	0,25 ± 0,13	0,23	0,06 – 0,50	0,20 – 0,45

**Graf 13 Hodnoty hladiny železa, TIBC a saturace transferinu před léčbou a po léčbě**



*Legenda: Porovnání výsledků laboratorních hodnot metabolismu železa před zahájením léčby a po léčbě. Změny všech tří hodnot jsou statisticky významné ( $p < 0,05$ ).*

U 5 pacientů nebyla léčba dokončena, 2× ze zdravotních důvodů, 2× z důvodu změny bydliště pacienta, 1× pro úmrtí pacienta (autonehoda). Hodnoty feritinu těchto pacientů naměřené při posledním odběru na našem oddělení byly v rozmezí 117,7 – 2167,5 μg/l (graf 9, viz výše).



## 9.6. NEŽÁDOUCÍ REAKCE NA ODBĚR

V průběhu 501 odběrů bylo zaznamenáno u 28 pacientů celkem 52 nežádoucích reakcí (10,4 %), z toho 50 reakcí bylo lehkých a 2 středně těžké. Z lehkých reakcí se nejčastěji (53,8 %) vyskytly reakce na podání citronanu. Ze středně těžkých reakcí se v jednom případě jednalo o hypokalcemii způsobenou citronanovou toxicitou, ve druhém případě o vazovagální reakci na konci odběru s protražovanou hypotenzí. Přehled nežádoucích reakcí v souvislosti s odběrem je uveden v tab. 13.

**Tab. 13** *Nežádoucí reakce na odběr (n=52)*

Typ komplikace	Celkem n (%)	Lehké n (%)	Středně těžké n (%)
Ruptura žíly, hematom	12 (23,1)	12 (23,1)	0
Poranění nervu	1 (1,9)	1 (1,9)	0
Citronanová toxicita	29 (55,7)	28 (53,8)	1 (1,9)
Vazovagální reakce	8 (15,5)	7 (13,6)	1 (1,9)
Technická komplikace	2 (3,8)	2 (3,8)	0
<b>Celkem</b>	<b>52 (100)</b>	<b>50 (96,2)</b>	<b>2 (3,8)</b>

## 9.7. UDRŽOVACÍ LÉČBA

Po ukončení indukční léčby byli pacienti předáni zpět do péče zařízení, odkud byli k léčbě odesláni, ke kontrolám zdravotního stavu a k další péči.

### 9.7.1. Soubor pacientů a jejich léčba

Celkem 33 pacientů ze 42 (79 %) po ukončení indukční léčby bylo odesláno zpět na naše oddělení s doporučením k dalšímu léčebnému odběru nebo ke kontrole hladiny feritinu.

Časový odstup první kontroly od ukončení iniciální léčby činil 3 – 17 měsíců ( $9,0 \pm 3,6$  měsíců, medián 9 měsíců). Zjištěná hodnota feritinu při této kontrole byla  $68,7 \pm 66,2$   $\mu\text{g/l}$ , medián 42  $\mu\text{g/l}$ , rozmezí 11 – 580  $\mu\text{g/l}$ .

V období 1. 1. 2004 – 31. 12. 2020 bylo následně u těchto pacientů provedeno 585 erythrocytaferéz v rámci udržovací léčby. Při těchto odběrech bylo u 13 pacientů zaznamenáno

40 (6,8 %) lehkých nežádoucích reakcí (18× ruptura žíly, 16× citronanová toxicita, 5× vazovagální reakce, 1× technická komplikace).

### **9.7.2. Dárcovství krve u pacientů v průběhu udržovací léčby**

Celkem 3 pacienti, kteří splňovali kritéria stanovená pro dárce krve, začali po ukončení indukční léčby darovat krev nebo krevní složky. Jeden dárce po 7 letech dárcovství krve v roce 2015 ukončil, byl zařazen zpět mezi pacienty léčené erythrocytaferézou. Hladina feritinu se při odběrech průběžně sledovala (nejméně 1x ročně), hodnoty zjištěné při posledním odběru v roce 2020 byly před odběrem krve v rozmezí 100 – 150 µg/l.

### **9.7.3. Aktuálně sledovaní pacienti**

V posledních 24 měsících, tj. v období 1. ledna 2019 – 31. prosince 2020, se alespoň jedenkrát dostavilo ke kontrolnímu nebo léčebnému odběru celkem 19 pacientů (15 mužů a 4 ženy). Zjištěná hladina feritinu při poslední kontrole nebo před posledním odběrem v tomto období byla  $176,4 \pm 84,4$  µg/l, medián 151 µg/l, rozmezí 45,6 – 437,0 µg/l. Celková doba sledování těchto 19 pacientů činí  $9,6 \pm 5,2$  roku, medián 12,8 let, rozmezí 0,9 – 14,7 roku.

## **10. DISKUZE**

### **10.1. LÉČEBNÁ METODA**

Hereditární hemochromatóza je chorobou, jejíž četný výskyt a klinické aspekty jsou významnější, než se soudilo ještě v nedávné minulosti [9, 160, 189]. Časná diagnóza HH a rychlá a účinná léčba představují trvalou a stále aktuální výzvu současné klinické medicíny [190].

Za základní léčebnou metodu první volby, zmiňovanou v publikovaných doporučeních pro léčbu HH, je považována venepunkce [1, 3, 181, 190-192]. Venepunkce (pouštění žilou) je metodou známou od středověku, používanou historicky v širokém spektru indikací [193]. Jakkoliv byla většina těchto indikací postupně opuštěna [194], venepunkce je pro léčbu HH doporučována i v 21. století [1, 3, 11, 181, 190-192].

S rozvojem, zaváděním a využíváním automatizovaných přístrojových metod v medicíně vznikla možnost aplikovat jednu ze separátorových metod, léčebnou erythrocytaferézu, i k léčbě HH. Ověřit možnosti použití této metody v našich podmínkách bylo úkolem předkládané práce.

V době plánování metodiky a sestavování cílů naší práce byl dostupný jen omezený počet publikací věnujících se léčbě pacientů s hemochromatózou pomocí erythrocytaferézy. Obvyklé randomizované studie (evidence based studies) chyběly. Byly publikovány pouze údaje o jednotlivých nemocných nebo nerandomizované studie popisující léčbu malých skupin pacientů, které svědčily pro klinický a terapeutický úspěch erythrocytaferézy oproti klasické venepunkci [151, 179, 180, 195]. Po zahájení naší studie byly postupně zveřejňovány předběžné a následně i kompletní výsledky randomizovaných studií [149, 152, 153, 183, 192, 196-198]. Průběžné výsledky naší studie shrnující léčbu 22 pacientů jsme publikovali v roce 2012 [199]. S potěšením můžeme konstatovat, že většina našich výsledků byla shodná s výsledky výše uvedených studií. Naše studie je v literatuře citována, např. ve výsledcích nizozemské randomizované studie [149], v přehledné práci o léčbě hemochromatózy [139] nebo v doporučení gastroenterologů USA pro léčbu HH [3].

Obě uvedené léčebné metody, venepunkce i erythrocytaferéza, mají své výhody a nevýhody. Léčba venepunkcemi je považována za jednoduchou, účinnou a levnou [1, 3, 11, 181, 190-192]. Většímu rozšíření erythrocytaferéz brání ekonomické důvody a nutnost přítomnosti trénovaného personálu a vlastnictví separátoru [149, 181]. Menší technická, medicínská i ekonomická náročnost venepunkce podporuje její využití v léčbě HH v současnosti i v budoucnosti [2, 181]. Přesto i venepunkce může být příčinou celé řady nežádoucích reakcí a komplikací. Moirand popisuje komplikace u 64 % osob v souboru 353 pacientů léčených venepunkcemi. Komplikace zahrnují problémy s žilním přístupem u 43 % pacientů, únavu u 63 % pacientů, významná je také psychická újma, kdy 28 % pacientů považuje pravidelné venepunkce za obtěžující, 8 % pacientů je považuje za výrazný zásah do osobního života a 6 % za významný zásah do profesního života [200]. Lima popisuje jak lokální komplikace, zahrnující bolest a zhmoždění v místě vpichu, tak komplikace celkové, např. závratě a kolapsy, které mohou být limitujícím faktorem především u pacientů s kardiovaskulárním postižením [181]. Rombout-Sestrienkova uvádí, že po delší době léčby nadpoloviční většina pacientů shledává opakované venepunkce jako obtěžující, které jim působí značné nepohodlí. Dvě třetiny pacientů jejího souboru nesouhlasily s týdenními venepunkcemi a vyžadovaly snížení jejich frekvence [153]. Jako nejzávažnější komplikace byla popsána dvě úmrtí po venepunkci [201, 202]. Nelze opominout ani fakt, že odběrová jehla pro venepunkci je o 1 – 2 gauge silnější než pro erythrocytaferézu.

Větší průměr jehly zvyšuje riziko hematomů a poškození žíly, arterie nebo nervových větví [203, 204].

Při venepunkci se odstraňuje mimo erytrocytů také plazma s obsahem koagulačních faktorů, proteinů a trombocyty, což může limitovat léčbu pacientů s hypoproteinemií nebo trombocytopenií [153]. Hypoproteinémie může nepříznivě ovlivnit zejména pacienty s HH, kteří mají cirhózu jater [196]. Při erytrocytaferéze se po odstranění erytrocytů z odebírané krve všechny ostatní složky navracejí pacientovi do cirkulace [181]. Ztráta plazmy při venepunkcích může být velmi velká a klinicky významná. Při venepunkcích, které se doporučuje provádět 1 – 2× týdně, a při hematokritu 0,35 – 0,45 se odstraní 275 – 325 ml plazmy. To může znamenat celkovou roční ztrátu až 17 litrů plazmy při jedné venepunkci týdně, případně roční ztrátu až 34 litrů plazmy při dvou venepunkcích týdně u pacienta s hematokritem 0,35. Toto množství odebrané plazmy dokonce výrazně převyšuje maximální množství plazmy, které je povoleno odebrat zdravým dárčům plazmy v intenzivním dárcovském plazmaferetickém programu – maximálně 25 litrů/rok [168]. V dárcovských studiích je prokázáno, že již odběry na hranici 25 litrů plazmy za rok vedou k výraznému poklesu celkové bílkoviny a imunoglobulinů u zdravých osob a více než třetina dárců (40 %) je následně pro hypoproteinemii a hypogamaglobulinemii z dárcovství vyřazována [205]. Ve srovnání s tím ztráta plazmy při erytrocytaferéze obnáší max. 15 % odebíraného objemu erytrocytů, tzn., že při jedné aferéze bylo v našem souboru odebráno průměrně 83 ml plazmy u mužů a 70 ml u žen. Celková roční ztráta plazmy by při maximální frekvenci erytrocytaferézy každých 14 dnů byla pouze 2,1 litru u mužů, resp. 1,8 litru u žen, což je méně než 13 % roční ztráty plazmy při jedné venepunkci týdně.

## 10.2. SOUBOR PACIENTŮ PRO ERYTROCYTAFERÉZU

Cíl studie, shromáždit a léčit alespoň 40 pacientů, jsme splnili. Celkem bylo do studie zařazeno 47 pacientů. K vytvoření souboru největší měrou přispěla spolupráce s hepatologickými a gastroenterologickými poradnami, díky níž jsme získali 45 pacientů. Dva pacienty jsme vyhledali mezi příbuznými již léčených pacientů. Překvapením bylo, že vhodný pacient k léčbě nebyl nalezen ve velké skupině otestovaných dárců krve, přestože u více než 30 % z nich byla screeningovým vyšetřením zjištěna zvýšená hodnota saturace transferinu.

Literární zdroje obvykle uvádějí, že HH se vyskytuje s vyšší pravděpodobností u mužů a pokud se HH vyskytne u žen, je diagnostikována v pozdějším věku než u mužů [1, 3, 11, 27]. Větší zastoupení mužů (79 %) jsme také prokázali v našem souboru. Rozdíl ve věku mezi muži a ženami v našem souboru (muži 51 roků, ženy 57 roků) však nebyl statisticky významný.

V souladu s literaturou [2, 3] převažuje v našem souboru homozygotní mutace C282Y (70,2 %), celkem 3 pacienti (6,4 %) jsou nositeli mutací obou hlavních genů HFE (smíšené heterozygoti C282Y/H63D), 4 pacienti (8,5 %) jsou homozygoti H63D. Fakt, že u zbývajících 7 pacientů nebyla zjištěna žádná mutace nebo že byla zachycena pouze mutace C282Y či H63D v heterozygotní formě, a přesto tito pacienti měli známky akumulace železa, nebyl překvapivý. Známých příčin akumulace železa v organismu je celá řada, včetně mnoha různých mutací genu HFE (viz kap. 4). Při podezření na HH se genetickým vyšetřením rutinně testují pouze 3 nejčastější mutace genu HFE – C282Y, H63D a S65C [4, 206]. Zajímavým nálezem v našem souboru je fakt, že pacient s nejvyšší hladinou feritinu (5743,8 µg/l) byl nositelem homozygotní mutace H63D, o které se uvádí, že je příčinou významné akumulace železa pouze výjimečně [1, 2, 207].

Hladina feritinu byla u pacientů v průměru před zahájením léčby výrazně nad hranicí normy (1429 ± 1248 µg/l), stejně jako v souboru byla patologická hladina Fe, TIBC a saturace transferinu (viz kap. 9.3., tab. 9). Počáteční hodnoty feritinu zahrnovaly celé spektrum hodnot – od hodnot na hranici normálních (minimální hodnota byla 213,9 µg/l) až po hodnoty nad 5000 µg/l. Více než polovina pacientů (24) měla počáteční hodnotu vyšší než 1000 µg/l. Tato hladina je považována za kritickou hodnotu, která znamená vyšší pravděpodobnost vzniku poškození tkání a orgánů s klinickými projevy [2, 192]. Sledování a hodnocení klinických příznaků, případně jejich ústupu v průběhu léčby nebylo náplní naší studie, nicméně 4 pacienti s hladinou feritinu nad 4000 µg/l byli na první pohled dobře rozpoznatelní pro výraznou pigmentaci pokožky. Jeden pacient (muž, smíšený heterozygot C282Y/H63D), u kterého jsme zahajovali léčbu při normální hodnotě feritinu 213,9 µg/l, měl výrazné klinické příznaky neodpovídající hodnotě feritinu (chronická únava, bolesti kloubů a psychické obtíže), které ustoupily po snížení hladiny feritinu pod 50 µg/l.

Hodnota feritinu našich pacientů nekorelovala s věkem v souboru všech pacientů ( $r = 0,19$ ) ani v souboru mužů ( $r = 0,23$ ), žen ( $r = 0,13$ ) ani mužů s homozygotní mutací C282Y ( $r = -0,01$ ) (viz kap. 9.3., graf 4). V našem souboru jsme tedy nepotvrdili publikovanou závislost, že laboratorní známky akumulace železa v organismu narůstají se stoupajícím věkem [2, 72, 77]. Současně však literatura udává, že rychlost akumulace železa je závislá na řadě dalších faktorů (např. konzumace alkoholu, kouření, příjem potravy s vysokým obsahem železa atd.) [3, 27]. Vliv uvedených faktorů a malá velikost našeho souboru může vysvětlit nízkou korelaci hladiny feritinu a věku našich pacientů. Obdobným způsobem lze vysvětlit nesoulad mezi našimi výsledky a literárními údaji týkajícími se hladiny feritinu, která má být v průměru

ve stejném věku u žen oproti mužům nižší [2, 139]. V našem souboru jsme nenalezli statisticky významný rozdíl v hladině feritinu v závislosti na věku mezi souborem mužů a žen ani mezi souborem pacientů s homozygotní mutací C282Y a ostatními pacienty.

### 10.3. MNOŽSTVÍ ODEBÍRANÝCH ERYTROCYTŮ

Průměrné množství erytrocytů odebraných při jedné aferéze bylo 532 ml (550 ml u mužů a 464 u žen), v rozmezí od 69 do 837 ml. Dvě nejnižší hodnoty odebraného množství erytrocytů (69 a 116 ml) byly způsobeny předčasným ukončením odběru (ruptura žil a porucha přístroje), u dokončených odběrů byl nejnižší odebraný objem 308 ml. V literatuře doporučené množství odebíraných erytrocytů při léčebných erytrocytaferézách u HH kolísá mezi 350 a 1000 ml při jedné proceduře [3, 149, 152, 192, 208]. Alternativně se doporučuje odebírat maximální možné, ale pouze takové množství, aby nedošlo k poklesu hematokritu pod 0,25 [197]. Všechny výše uvedené zdroje současně doporučují přizpůsobovat předem stanovené či vypočtené množství odebíraných erytrocytů individuálně každému pacientovi podle jeho aktuálního zdravotního stavu a aktuálních laboratorních výsledků s přihlédnutím k případným nežádoucím reakcím na předchozí odběry. Tohoto doporučení jsme se drželi při léčbě našich pacientů.

V naší studii se nám více než sledování absolutního množství odebraných erytrocytů (v ml) osvědčilo sledování a stanovování procenta odebíraných erytrocytů z celkového aktuálního množství erytrocytů u každého pacienta (TEV, total erythrocyte volume). TEV jsme vypočetli z TBV a aktuálního hematokritu (viz kap. 8.2. Metodika). Stanovení TEV a určení množství odebíraných erytrocytů jako % TEV nám umožnilo individualizovat odběr u každého pacienta a pružně tak reagovat na změny krevního obrazu v čase, případně na předchozí nežádoucí reakce na odběr. Prokázali jsme, že odběr 25 – 30 % objemu erytrocytů nepředstavuje pro organismus kritickou zátěž a nenese s sebou výskyt nežádoucích reakcí u pacientů s neporušenými kompenzačními mechanismy, včetně pozdních komplikací, vyvolaných např. anemizací pacienta. Naproti tomu po odběru erytrocytů nad 30 % TEV si v našem souboru 50 % nemocných stěžovalo na zvýšenou únavu, slabost a spavost v odpoledních hodinách po odběru. Tyto obtíže jsme před následujícím odběrem aktivně zjišťovali a na jejich podkladu jsme redukovali množství odebíraných erytrocytů (% TEV). Zajímavým zjištěním v našem souboru je, že ženy dobře tolerovaly odběr o 2 – 5 % TEV vyšší ve srovnání s muži, tento rozdíl však nebyl statisticky významný (viz kap. 9.4.1.).

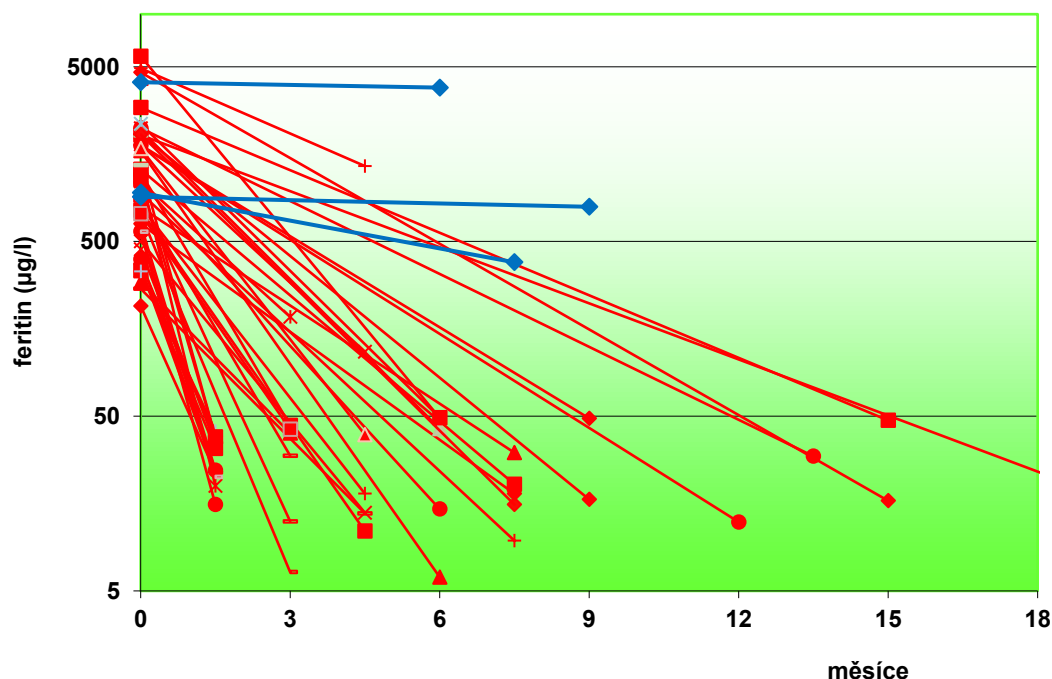
Maximální množství odebraných erytrocytů v našem souboru bylo 837 ml. Někteří autoři referují i o větších objemech erytrocytů, až o 1000 ml, odebraných při jedné erythrocytaferéze [3, 197]. Neuvádějí však, o jaké procento TEV se u daných pacientů jednalo, nebo jaký měli jejich pacienti TBV. Provádět opakovaně takto velké odběry je podle našich zkušeností možné pouze u osob s vysokým TBV a dostatečným hematokritem při absenci komplikujících nemocí. Erythrocytaferéza je však dostatečně účinná i při průměrném množství odebraných erytrocytů kolem 500 ml na 1 odběr [149, 151, 196, 197], tak jako je tomu i v našem souboru. Byly publikovány i práce, kdy se autoři pokoušeli navýšit potřebné množství odebíraných erytrocytů a tím i efektivitu léčby současným podáním erythropoetinu [196, 209]. V naší studii jsme, především z ekonomických důvodů, neměli možnost prověřit tuto možnost.

Na základě výše uvedených zkušeností jsme stanovili následující standardní postup. U každého pacienta jsme určili TEV výše uvedeným propočtem z TBV a aktuálního hematokritu. Cílové množství odebraných erytrocytů jsme stanovili na 25 – 35 % TEV, nižší hodnoty v tomto rozmezí byly voleny u pacientů s předpokládanými porušenými kompenzačními mechanismy (vyšší věk, přítomnost choroby srdce a cév, jaterní cirhóza atd.). Po každém odběru byla zjištěna tolerance odběru a při výskytu výrazné únavy a spavosti po odběru byl odebíraný objem erytrocytů (% TEV) snížen. Mezi prvním a druhým odběrem jsme stanovili interval 14 dnů, každý další odběr jsme se snažili provádět za 10 – 14 dnů tak, aby za 3 – 4 týdny byly vždy provedeny 2 erythrocytaferézy. Důvodem ponechání delšího intervalu mezi prvním a druhým odběrem byla předchozí zkušenost z venepunkcí, kdy po prvních 2 – 5 odběrech docházelo k hlubšímu poklesu hemoglobinu a hematokritu než po dalších odběrech v řadě, což lze vysvětlit postupně narůstající aktivací kostní dřeně, která je stimulována opakovanými odběry [186]. Zjištěný interval mezi dvěma odběry (medián) byl v našem souboru 18 dnů. Snížení frekvence odběrů proti původnímu plánu bylo způsobeno odkládáním termínu odběru z osobních důvodů nebo z důvodu onemocnění pacientů, případně byl delší interval volen u pacientů s nedostatečnou erythropoézou, u nichž bylo při individualizaci odběru upřednostněno zachování odebíraného množství před dodržením intervalu mezi odběry.

Ideální by bylo srovnávat pacienty léčené erythrocytaferézou s pacienty léčenými pouze venepunkcemi, jak tomu bylo v publikovaných randomizovaných studiích [149, 152, 192]. Z obavy z nedostatečného počtu pacientů při plnění hlavních cílů naší studie jsme pacienty venepunkcemi neléčili. Pro orientační porovnání efektivity erythrocytaferéz jsme jako výzkumnou sondu zpracovali data 3 nemocných s HH, léčených v minulosti na našem oddělení jen venepunkcemi (všichni C282Y homozygoti). Protože nebylo možné z důvodu malého počtu

pacientů tato data statisticky porovnat s daty pacientů léčených erythrocytaferézami, neuvádíme je ve výsledcích, ale komentujeme je pouze v této kapitole. Jednalo se o 2 muže a 1 ženu, u nichž bylo provedeno 25 – 37 venepunkcí v období 5,5 – 9 měsíců léčby, venepunkce byly prováděny s týdenní frekvencí. Zaznamenané poklesy feritinu u těchto nemocných byly 850→790, 4080→3800, 950→320 µg/l. Hematokrit těchto 3 pacientů se pohyboval v rozmezí 0,33 – 0,40, při jedné venepunkci o objemu 500 ml bylo tedy odebráno 165 – 200 ml erythrocytů. Náš závěr je tedy ve shodě s literárními údaji – erythrocytaferézy vedou průměrně k dvojnásobně až trojnásobně vyššímu množství odebraných erythrocytů při jednom výkonu [3, 152, 197]. Hodnoty feritinu těchto 3 pacientů jsme přidali do grafu závislosti poklesu feritinu na době léčby k datům pacientů léčených erythrocytaferézou (graf 14). Rychlost poklesu feritinu (vyjádřená strmostí křivky) je u venepunkcí nižší, což je rovněž v souladu s publikovanými daty [3, 149, 151, 152]

**Graf 14** *Závislost poklesu hladiny feritinu na délce léčby a metodě. Pacienti léčení erythrocytaferézou (n = 47, červeně), pacienti léčení venepunkcemi (n = 3, modře)*



*Legenda: viz text*

Celkové množství erythrocytů odebraných během indukční fáze (410 – 26927 ml, viz kap. 9.4.3.) statisticky významně korelovalo se vstupní hodnotou feritinu pacientů (graf 10 a 11).



Přestože jsme v našem souboru nenalezli statisticky významný rozdíl v hladině feritinu mezi souborem homozygotů C282Y a souborem pacientů s ostatními mutacemi (viz kap. 9.3., graf 3), prokázali jsme mezi těmito dvěma soubory statisticky významný rozdíl v množství odebraných erytrocytů pro dosažení cílové hladiny feritinu pod 50 µg/l (graf 8). Zjištěný fakt odpovídá dříve uvedeným údajům (kap. 5.1. a 5.5.), že homozygoti C282Y akumulují více železa, mají více poškozené orgány a včasnou léčbou lze, alespoň částečně, jejich poškození mírnit [1-3, 27].

Jedním z cílů práce bylo vyvodit ze zkušeností s proběhlými odběry, z množství odebraných erytrocytů a rychlosti poklesu feritinu „vzorec“ či predikční model pro odhad léčebného plánu a rychlosti poklesu hladiny feritinu u nových nemocných. Tento předpoklad se nám nepodařilo naplnit, pravděpodobně z důvodu nehomogenity souboru a jeho malé velikosti. Pokles feritinu v našem souboru lze nejlépe charakterizovat jako individuální. Prokázali jsme, že pokles hladiny feritinu statisticky významně závisel na množství odebraných erytrocytů. Ostatní závislosti, uváděné v literatuře (závislost hladiny feritinu na věku a pohlaví) [1, 3], jsme v našem souboru neprokázali jako statisticky významné. Při stanovování přesného predikčního modelu by bylo třeba vzít do úvahy i další faktory, které mohou ovlivnit efektivitu léčby (rychlost vstřebávání železa, mobilizace železa z buněk do plazmy, schopnost kostní dřeně pacienta nahradit odebrané erytrocyty apod.). Rombout-Sestrienkova v roce 2020 publikovala návrh prediktivního modelu pro pokles feritinu při léčbě HH venepunkcemi a erytrocytafrézou [210]. Model nabízí predikci počtu předpokládaných odběrů pro léčbu konkrétního pacienta po zadání jeho počátečního feritinu, hemoglobinu a TBV nebo BMI do publikovaného vzorce. Data našich pacientů před indukční léčbou jsme zadali do uvedeného modelu a vypočtený počet odběrů porovnali se skutečným počtem erytrocytaferéz. Autorka uvádí ve svém souboru prediktivní chybu 4 odběrů pro erytrocytaferézu, v našem souboru byla chyba odhadu větší (více než 5 odběrů u pacientů s více než 10 odběry).

#### **10.4. ŘÍZENÍ A INDIVIDUALIZACE ODBĚRU**

Erytrocytaferéza poskytuje na rozdíl od venepunkce možnost přizpůsobit odběr krvinek na míru každému pacientovi. U venepunkce lze korigovat pouze konečný objem odebrané krve, nikoliv však množství odebraných erytrocytů, které závisí na aktuálním hematokritu pacienta. Obdobně v případě reakce pacienta na venepunkci je možné pouze odběr ukončit, protože i po krátkodobém zastavení toku krve dojde v odběrové hadičce ke koagulaci krve a jejímu zneprůchodnění.

Naproti tomu u erythrocytaferézy lze přesně naplánovat množství odebraných erythrocytů (viz kap. 8.5. a 10.3.), individualizovat odběr podle aktuálního hematokritu s predikcí cílového hematokritu, podle stavu kompenzačních mechanismů, podle snášenlivosti při předchozích odběrech. Obdobně se individuálně nastavuje odběrová a návratová rychlost krve a krevních složek podle zkušeností z předchozích odběrů tak, aby se předešlo nežádoucím reakcím a komplikacím [139, 149, 192].

## 10.5. NÁHRADA ODEBÍRANÝCH ERYTHROCYTŮ

Při plánování metodiky pro erythrocytaferéz před zahájením studie jsme hledali odpověď na otázku, zda při odběrech hradit odebraný objem krvinek a pokud ano, jaký zvolit náhradní roztok a jaké množství podat pacientovi v průběhu odběru. Tehdy dostupné publikace odpověď na tyto otázky neposkytovaly nebo pouze zmiňovaly, že by se měl provádět izovolemický odběr [151, 179, 180, 195]. Při jednorázovém odběru plné krve u dospělého člověka, ať se jedná o dárcovský odběr 450 ml plné krve nebo léčebnou venepunkci (400 – 500 ml krve), není nutná žádná náhrada za předpokladu dobré předchozí hydratace dárce nebo pacienta (např. vhodným pitným režimem před odběrem) [151, 179-181, 190, 195]. Naproti tomu např. AABB standard pro léčebné aferézy [176] doporučuje pečlivě hradit odebírané složky pro udržení normovolémie jako prevenci nežádoucích reakcí při léčbě. Na základě dlouholetých zkušeností pracoviště školitele s léčebnými aferézami a s vědomím, že podávaný fyziologický roztok uniká rychle do extravaskulárního prostoru, jsme rozhodli o standardní objemové náhradě každé erythrocytaferézy fyziologickým roztokem v poměru 1,5:1 k odebíraným erythrocytům. Tato náhrada byla snadno uskutečnitelná, protože jednorázová odběrová souprava k léčebné erythrocytaferéze má Y spojku pro připojení vaku s náhradním roztokem a současně SW separátoru umožňuje volbu náhrady v rozmezí 0 – 150 % objemu odebraných erythrocytů. Následně publikované studie potvrdily správnost naší volby. Rombout-Sestrienkova hradila ½ odebraného objemu erythrocytů fyziologickým roztokem [153], u pacientů s kardiovaskulárními chorobami podávala albumin s fyziologickým roztokem v poměru 1:1 [149]. Sundic hradil odběr 400 ml erythrocytů stejným objemem 400 ml fyziologického roztoku [152]. Lima mimo to doporučuje výrazně navýšit hydrataci pacienta před léčbou jako prevenci nežádoucích reakcí [181].

## 10.6. SLEDOVÁNÍ STŘEDNÍHO OBJEMU ERYTROCYTŮ JAKO MARKERU POKLESU ZÁSOB ŽELEZA

Cílem léčby HH je snížení zásob železa na normální hodnoty, indukční léčba by měla být ukončena až po poklesu hladiny feritinu pod 50 – 100  $\mu\text{g/l}$ , ve fázi udržovací léčby se doporučuje udržovat hladinu feritinu pod 100  $\mu\text{g/l}$  [1, 181, 190-192]. Při léčbě venepunkcemi je třeba kontrolovat hladinu feritinu v pravidelných intervalech, nejméně jedenkrát měsíčně [1, 3], při léčbě erythrocytaferézami se obvykle kontroluje feritin při každém odběru [139, 210]. Při koncipování naší studie jsme se rozhodli otestovat hypotézu, zda by se hodnota středního objemu erytrocytů (MCV) mohla měnit při klesajících zásobách železa, tzn., zda by sledování jednoduchého a levného ukazatele zjišťovaného při vyšetření krevního obrazu mohlo nahradit sledování hladiny feritinu. Vycházeli jsme z publikace, ve které autoři pokládají MCV spolu s hladinou hemoglobinu za jednoduchý a spolehlivý znak, který je významný při sledování léčby HH venepunkcemi [211]. V naší studii se střední objem erytrocytů u pacientů v závislosti na odběrech významně neměnil. Před 2. – 4. odběrem byl sice zaznamenán statisticky nevýznamný nárůst MCV o 3 % ( $p = 0,15$ ), po 5. odběru již nebyl žádný rozdíl ve srovnání s MCV před první odběrem (viz kap. 9.4.2., graf 7). Pouze v souboru pacientů, u nichž poklesla hladina feritinu na konci indukční léčby pod 15  $\mu\text{g/l}$ , byl následně zaznamenán pokles MCV. Současně však bylo zaznamenáno snížení hladiny hemoglobinu a hematokritu způsobené iatrogenní sideropenií. Náš závěr je v rozporu s výše uvedenou Bolanovou publikací, praktický význam sledování MCV jsme neprokázali.

## 10.7. NÁKLADY NA LÉČBU

Studie porovnávající materiálové náklady vynaložené na oba typy odběru preferují venepunkci jako levnější [149, 151]. V našich podmínkách jsou materiálové náklady na erythrocytaferézu násobně vyšší, do 100 Kč na venepunkci, do 3000 Kč na erythrocytaferézu. Hlavní náklady zahrnují odběrový vak (u venepunkce) a (u erythrocytaferézy) jednorázový odběrový set, antikoagulační a náhradní roztoky. Doba jednoho odběru znamená rozdílné personální náklady – u erythrocytaferézy přibližně 6× vyšší (10 minut venepunkce vs. 60 minut erythrocytaferéza). Tento rozdíl je ale platný pouze za předpokladu, že se jedna sestra věnuje jednomu pacientovi v průběhu celého odběru. Při krátkém trvání venepunkce je tento předpoklad platný. Naproti tomu v průběhu erythrocytaferézy, pokud probíhá bez komplikací, sestra na našem pracovišti provádí ve stejné místnosti další odběry, např. autotransfuze nebo odběry krve pacientům pro výrobu autologních očních kapek. Tím se personální náklady na

erythrocytaferézu výrazně snižují. Do nákladů při detailní kalkulaci je třeba zahrnout i odpisy pořizovací ceny separátoru a roční náklady na jeho validace a opravy. Přepočtený náklad na jeden odběr závisí především na využití separátoru. Pokud je přístroj mimo léčebných aferéz používán denně k dárcovským odběrům, jako je tomu i v případě separátoru na našem transfuzním oddělení, tvoří tento náklad řádově pouze jednotky procent materiálových nákladů.

Autoři, kteří provedli podrobné ekonomické kalkulace, připouštějí, že celkové náklady jsou u erythrocytaferéz dokonce nižší, za předpokladu, že se do kalkulace zahrne nižší frekvence odběrů erythrocytaferézou, nižší počet návštěv pacienta ve zdravotnickém zařízení a zkrácení doby léčby se vztahem k přínosům pacienta v případech, kdy je pacient v pracovním procesu, kdy nečerpá nemocenské nebo jiné dávky [183, 196].

## 10.8. NEŽÁDOUCÍ REAKCE

V literatuře je udáváno při léčbě HH venepunkcemi nebo erythrocytaferézami různé procento vedlejších reakcí. Ong uvádí u 129 erythrocytaferéz jednu synkopu a 32 (25 %) lehkých citrátových reakcí [192]. Rombout-Sestrienková pozorovala při léčbě 6 pacientů s HH 13,6 % velmi lehkých citrátových reakcí [153]. Muncunill nezaznamenal při léčbě 16 nemocných žádné reakce – tento údaj se týká pouze klinických reakcí, nesledoval jiné, např. technické nebo žilní komplikace [151].

Nežádoucí reakce v našem souboru se vyskytly u 10,4 % erythrocytaferéz v indukční fázi s převahou lehkých reakcí (96,2 %, kap. 9.6., tab. 12) a u 6,8 % erythrocytaferéz v udržovací fázi (pouze lehké reakce, kap. 9.7.1.). Jako lehkou reakci jsme hodnotili subjektivní potíže bez jakékoliv ovlivnění vědomí a bez nutnosti podávat parenterální nebo perorální léky, s výjimkou tablety Calcium effervescens a případného navýšení objemu náhradního roztoku. Nejčastější komplikací u našich nemocných v indukční fázi (55,7 %) byly příznaky z hypokalcemie projevující se u pacientů lehkým brněním okolo úst nebo brněním prstů. Tato reakce je příznakem nepoměru mezi rychlostí návratu krevních složek s antikoagulačním roztokem a schopností jater pacienta metabolizovat dodávaný citronan [149, 152]. Reakce byla vždy řešena zpomalením či zastavením návratové pumpy separátoru do ústupu obtíží, což obvykle nastávalo za 1 – 2 minuty. Po ústupu příznaků hypokalcemie byla nastavena snížená návratová rychlost o 10 – 20 ml/min. Celkem v 12 případech byl ústup obtíží pomalejší, pacientům byl podán nápoj s rozpuštěnou tabletou Calcium effervescens s pozitivním efektem. V jednom případě byl průběh hypokalcemie závažnější, u pacienta se hypokalcemie projevila nauzeou, zvracením a křečemi svalů horních končetin. Komplikace byla zvládnuta nitrožilním podáním 1 amp.

Calcium gluconicum, po ústupu obtíží byla erythrocytaferéza dokončena podle plánu. Abychom předešli opakování této reakce při příštích odběrech, podávali jsme před erythrocytaferézou preventivně 1 tabletu Calcium effervescens každému pacientovi, u kterého byly v minulosti zaznamenány příznaky z hypokalcemie. Do dokumentace jsme zaznamenávali každé, i minimální parestesie (brnění) okolo úst nebo prstů, na které jsme se cíleně vyptávali pacientů během procedury. Je otázkou, zda nebyl počet zaznamenaných reakcí navýšen právě aktivním dotazováním pacientů na tyto obtíže.

V průběhu 8 léčebných výkonů u 6 pacientů v indukčním režimu a v průběhu 5 výkonů u 2 pacientů v udržovací léčbě se projeví příznaky vazovagální reakce – nevolnost a slabost doprovázené lehkou hypotenzí (ne pod 100 mm Hg v systole), vždy v průběhu nebo po ukončení posledního odběrového cyklu. Na vznik této reakce mohla mít vliv řada faktorů, např. delší pobyt v odběrovém křesle v relativně strnulé poloze bez možnosti pohybu, vyloučit nelze ani kolísání tlaku při opakovaném střídání odběru a návratu krevního objemu při činnosti separátoru. Podílela se pravděpodobně i psychická složka. Reakce jsme řešili změnou polohy pacienta (Trendelenburgova poloha), zpomalením odběrové rychlosti pumpy separátoru o 10 – 20 ml/min., případně podáním bolusu náhradního roztoku (fyziologický roztok) v množství podle stavu pacienta, maximálně do 500 ml. V jednom případě přetrvávala hypotenze po dobu delší než 30 minut, stav byl zvládnut až podáním celkem 1000 ml infuze (500 ml fyziologického roztoku a 500 ml glukózy). Po odeznění příznaků reakce zůstal tento pacient pod zvýšeným dohledem personálu ještě po dobu minimálně 30 minut. Vzhledem k tomu, že při erythrocytaferéze je úbytek erythrocytů kompenzován podáváním náhradního roztoku – v případě pacientů v našem souboru šlo o fyziologický roztok podávaný v poměru 1,5 : 1 k odebíranému množství erythrocytů, je nižší riziko hypovolémie a hypotenzních reakcí, zvláště u starších pacientů s narušenými kompenzačními mechanismy. Rombout-Sestrienkova pozorovala v randomizované studii nižší celkový počet vedlejších hypotenzních reakcí u pacientů léčených erythrocytaferézou, u 87 erythrocytaferéz zaznamenala 1 reakci (1,1 %), u 342 venepunkcí zachytila 9 reakcí (2,6 %) [153, 197]. V našem souboru jsme zaznamenali 13 vazovagálních reakcí na 1086 aferéz, tj. 1,2 %.

Komplikace způsobené nevhodným žilním přístupem jsme řešili u 30 odběrů (v indukční i udržovací léčbě, celkem u 7 pacientů), v 29 případech jsme pokračovali v proceduře po nové venepunkci jiné žíly (obvykle v druhé loketní jamce), u jedné pacientky s velmi špatným stavem periferních žil musel být odběr předčasně ukončen z důvodu ruptur žil na obou horních končetinách při návratovém cyklu, i přes nastavení minimální návratové rychlosti.

U jednoho pacienta jsme zaznamenali poškození drobné větve senzitivního nervu, které se projevovalo brněním a tupým pocitem v prstech ruky, obtíže přetrvávaly celkem 7 dnů po odběru, poté spontánně vymizely. Tato komplikace není neznámá, objevuje se u dárců plné krve i krevních složek, její četnost je udávána v poměru 1:70 000 odběrů [204]. Podráždění nervu bývá krátkodobé, spontánně ustupuje, vzácně může být poškození vážnější, projevuje se poškozenou citlivostí trvající řádově dny až týdny. Výjimečně jsou popisovány poruchy motorických funkcí z poškození nervu, vzácně může vést komplikace až k invalidizaci dárce. V případě poškození motorických funkcí bývá častější příčinou poškození nervu útlakový mechanismus vyvolaný hematodem nebo paravenózním podáním navracených krevních složek při ruptuře žíly než přímé napíchnutí nervu jehlou [204].

Pozdní komplikace odběru zahrnovaly především stížnosti nemocných na únavu po odběru, která se projevovala do 24 hodin po proceduře. Pacienti odcházeli po výkonu poučení o nutnosti zvýšeného příjmu tekutin v období 24 hodin po erythrocytaferéze. I při dodržení tohoto doporučení se cítili odpoledne po odběru unavení, odpoledne prospali. Přes tyto obtíže byli všichni druhý den schopni práce a tolerovali obvyklou námahu. Nikdo z léčených nepřerušil pracovní poměr ani si nevyžádal vystavení pracovní neschopnosti. K subjektivní úpravě stavu došlo do 2. dne po erythrocytaferéze. Nejvíce byla únava pocíťována po 2. erythrocytaferéze, protože 14 dnů po prvním odběru nedošlo k úplnému návratu hematokritu k původní hodnotě. Po třetím a dalších odběrech, i když byly prováděny ve stejném odstupu od předchozího odběru, se již obtíže objevovaly výjimečně. Pravděpodobným vysvětlením je narůstající aktivace kostní dřene, jejíž produkce již stačila hradit odebrané erythrocyty, hematokrit již nebyl před další procedurou snížen oproti předchozímu odběru. Tato domněnka vychází z našich zkušeností s dárcovskými dvojitými erythrocytaferézami, u kterých jsme prokázali úplný návrat hodnoty hematokritu a hemoglobinu na původní hodnotu po 3 – 4 týdnech po odběru, pokud se jednalo o první odběr. Pokud se jednalo o 2. odběr u dárce v intervalu 4 měsíců po prvním odběru, byla hodnota hematokritu a hemoglobinu za 3 – 4 týdny po odběru dokonce vyšší, než před prvním odběrem [212].

## **10.9. DLOUHODOBĚ SLEDOVANÍ PACIENTI PŘI UDRŽOVACÍ LÉČBĚ**

Transfuzní oddělení není ambulantním pracovištěm, které by mohlo dlouhodobě poskytovat dispenzární péči pacientům s HH. Proto jsme všechny pacienty po skončení indukční léčby předávali do péče lékařům a specialistům, kteří je k nám k této léčbě poslali. Dlouhodobě jsme sledovali pouze ty pacienty, kteří k nám byli po skončení indukční léčby pravidelně odesílání

k léčebným aferézám v rámci udržovací léčby, a pacienty, kteří se stali dárci krve (viz kap. 9.5.). Sběrem jejich dat jsme naplňovali jeden ze stanovených cílů naší studie - sledovat rychlost vzestupu feritinu a stanovit optimální interval následných erythrocytaferéz. To se nám dobře podařilo u 17 pacientů, kteří na kontroly nebo léčebné výkony docházeli pravidelně (nejméně dvakrát za rok). Tito pacienti vyžadovali pro udržení normální hladiny feritinu (optimálně pod hodnotou 100  $\mu\text{g/l}$ ) 1 – 3 erythrocytaferézy ročně. Mezi 19 pacientů, kteří byli vyšetřeni v posledních 24 měsících, patřili jak pacienti pravidelně sledovaní tak i pacienti náhodně odeslaní k léčbě po delší době. To je důvodem, proč je průměrná hladina feritinu pacientů při jejich poslední návštěvě (viz kap. 9.5.) vysoko nad 100  $\mu\text{g/l}$  (v rozmezí 45,6 – 437  $\mu\text{g/l}$ ).

Zajímavými příklady potvrzujícími individuální rychlost akumulace železa v našem souboru jsou dva následující pacienti. Jeden pacient (C282Y homozygot) se dostavil k léčbě po 2 letech po skončení indukční léčby, jeho feritin dosáhl hodnoty 1460  $\mu\text{g/l}$ . Jedna pacientka (C282Y homozygot) nám byla odeslána k léčbě až po 9,5 letech od skončení indukční léčby, její hodnota feritinu byla 1410  $\mu\text{g/l}$  (jakoukoliv léčbu v tomto období pacientka vyloučila). U obou pacientů byly prováděny erythrocytaferézy s obdobnou intenzitou a frekvencí jako při indukční léčbě s cílem co nejrychleji snížit hladinu pod 50  $\mu\text{g/l}$ .

## 10.10. PERSPEKTIVY DALŠÍ LÉČBY

Erythrocytaferéza je metodou, která si vedle venepunkce našla místo v léčbě pacientů s HH [181, 198, 210]. Rozvoj vědeckých poznatků o fyziologii a patologii regulace hladiny železa v organismu přináší nové možnosti léčby HH, např. podávání nových chelatačních látek, hepcidinu nebo jeho derivátů [2] Nelze vyloučit, že nové molekuly, např. minihepcidiny nebo agonisté hepcidinu, mohou v budoucnosti snížit či úplně nahradit u pacientů s HH potřebu léčebných odběrů krve, ať už venepunkcí nebo erythrocytaferézou [12, 21, 158]. V současné době léčba pacientů s HH na našem oddělení pokračuje. Erythrocytaferézy provádíme jak u nově zařazovaných pacientů, tak i u pacientů v udržovací léčbě. V roce 2021 jsme již zahájili indukční léčbu u jednoho pacienta s nově zjištěnou diagnózou HH. Ve sběru dat, tak jak jsme jej vytyčili na počátku naší studie, pokračujeme.

## 11. PLNĚNÍ CÍLŮ VÝZKUMU A ZÁVĚRY

Cíle disertační práce byly splněny.

### 11.1. PRIMÁRNÍ CÍLE

#### 11.1.1. Vytvoření souboru nemocných

Soubor nemocných léčených erythrocytaferézou byl vytvořen, podařilo se zařadit dostatek respondentů k vyvození závěrů z analýz. Soubor je velikostí srovnatelný s publikovanými zahraničními soubory, v ČR je unikátní. Vzhledem k dlouhodobému sledování pacientů patří mezi ojedinělé.

#### 11.1.2. Léčebná metoda

Erythrocytaferéza, přístrojová metoda odběru erytrocytů byla zavedena do léčby nemocných HH, opakovanými odběry erytrocytů touto metodou jsme dosáhli snížení hladiny feritinu pod 50 µg/l u všech nemocných, kteří dokončili léčbu (42/47).

### 11.2. SEKUNDÁRNÍ CÍLE

#### 11.2.1. Bezpečnost erythrocytaferézy

Nežádoucí reakce jsme sledovali a vyhodnotili. Erythrocytaferéza byla našimi pacienty dobře snášena, nežádoucí reakce se objevily s očekávanou nízkou četností, nebyly pozorovány klinicky závažné příhody.

#### 11.2.2. Efektivita procedur

Získaná data jsme vyhodnotili, statisticky zpracovali a publikovali. Publikované výsledky jsou citovány, naše výsledky byly využity k tvorbě guidelines pro léčbu HH [3]. U každého nemocného byla vyhodnocena závislost poklesu hladiny feritinu na množství odebíraných erytrocytů, na četnosti odběrů a trvání léčby. Z těchto individuálně variabilních dat nebylo možné sestavit obecně platný vzorec pro predikci množství odebraných erytrocytů a doby léčby při optimální frekvenci léčebných erythrocytaferéz u nově zařazovaného pacienta.



### 11.2.3. Ukazatelé úspěšnosti léčby

Sledování MCV jako indikátoru účinnosti léčby se neukázalo jako prakticky využitelné.

### 11.2.4. Udržovací léčba

Pacienti v průběhu udržovací léčby byli sledováni, při vzestupu hladiny feritinu byli léčeni erythrocytaferézou. Data dlouhodobě sledovaných pacientů byla vyhodnocena.

## 11.3. POZNATKY MIMO PŮVODNÍ ZÁMĚR

Studii byly získány další poznatky mimo původní záměr. Jde o průkaz významnosti sledování hladiny feritinu, jako jednoduchého parametru v prevenci významného snížení zásob železa u dárců krve. Screeningem 1348 dárců krve, provedeným v letech 2004 – 2005, jsme sice nezískali žádného pacienta do naší studie, ale zjistili jsme, že část dárců (16,3 % žen a 5,7 % mužů) v našem registru má snížené zásoby železa. Na základě tohoto zjištění a po jeho následném potvrzení jsme zavedli testování zásobního železa (hladiny feritinu) u všech prvodárců přicházejících darovat krev na naše oddělení, abychom u našich dárců a dárekůn předešli vzniku nebo prohloubení sideropenie. Není překvapením, že u řady prvodárců, především prvodárkyň, jsme před prvním odběrem při normálním krevním obrazu zjistili středně těžkou nebo závažnou sideropenii. Data plánujeme statisticky zpracovat a publikovat.

## 11.4. HODNOCENÍ PRACOVNÍCH HYPOTÉZ

Pracovní hypotézy byly potvrzeny.

- a) Erythrocytaferéza je účinnou metodou pro odstraňování nahromaděného zásobního železa u pacientů s hereditární hemochromatózou.
- b) Erythrocytaferéza je dobře tolerovanou a bezpečnou metodou, výskyt nežádoucích reakcí a komplikací je nízký (10,4 % v indukční léčbě, 6,8 % v udržovací léčbě), závažné reakce se nevyskytly.

## 12. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Seznam literatury byl vytvořen pomocí systému EndNote™ 20.

1. Murphree, C.R., et al., *Diagnosis and management of hereditary haemochromatosis*. Vox Sang, 2020. 115(4): p. 255-262.
2. Powell, L.W., R.C. Seckington, and Y. Deugnier, *Haemochromatosis*. The Lancet, 2016. 388(10045): p. 706-716.
3. Kowdley, K.V., et al., *ACG Clinical Guideline: Hereditary Hemochromatosis*. Am J Gastroenterol, 2019. 114(8): p. 1202-1218.
4. Katsarou, M.S., et al., *Hemochromatosis: Hereditary hemochromatosis and HFE gene*. Vitam Horm, 2019. 110: p. 201-222.
5. Pilling, L.C., et al., *Common conditions associated with hereditary haemochromatosis genetic variants: cohort study in UK Biobank*. BMJ, 2019. 364: p. k5222.
6. Gerhard, G.S., B.V. Paynton, and J.K. DiStefano, *Identification of Genes for Hereditary Hemochromatosis*. Methods Mol Biol, 2018. 1706: p. 353-365.
7. Deugnier, Y., et al., *Reduced phenotypic expression in genetic hemochromatosis with time: Role of exposure to non-genetic modifiers*. J Hepatol, 2019. 70(1): p. 118-125.
8. Wojcik, J.P., et al., *Natural history of C282Y homozygotes for hemochromatosis*. Can J Gastroenterol, 2002. 16(5): p. 297-302.
9. Lal, A., *Iron in Health and Disease: An Update*. Indian J Pediatr, 2020. 87(1): p. 58-65.
10. Daher, R. and Z. Karim, *Iron metabolism: State of the art*. Transfus Clin Biol, 2017. 24(3): p. 115-119.
11. Horák, J., *Hemochromatóza*. 2010.
12. Reichert, C.O., et al., *Hepcidin: Homeostasis and Diseases Related to Iron Metabolism*. Acta Haematol, 2017. 137(4): p. 220-236.
13. Pácal, L. and K. Kaňková, *Novější poznatky o metabolismu železa a jeho poruchách*. Časopis lékařů českých, 2004. 143(1): p. 9-14.
14. Sangkhae, V. and E. Nemeth, *Regulation of the Iron Homeostatic Hormone Hepcidin*. Adv Nutr, 2017. 8(1): p. 126-136.
15. Penka, M., A. Buliková, and M. Matýšková, *Hematologie. I. Neonkologická hematologie*. 2001.
16. Bureš, J. and J. Horáček, *Základy vnitřního lékařství*. 2003.
17. Loreal, O., et al., *Iron as a Therapeutic Target in HFE-Related Hemochromatosis: Usual and Novel Aspects*. Pharmaceuticals (Basel), 2018. 11(4).
18. Novotný, J., *Poruchy metabolismu železa I. Regulace homeostázy železa*. Vnitřní lékařství : orgán Československé společnosti pro vnitřní lékařství, sekce Československé lékařské společnosti J. E. Purkyně, 2005. 51(6): p. 681-689.
19. Brissot, P., et al., *Haemochromatosis*. Nature Reviews Disease Primers, 2018. 4.
20. Anderson, G.J., D.M. Frazer, and G.D. McLaren, *Iron absorption and metabolism*. Curr Opin Gastroenterol, 2009. 25(2): p. 129-35.
21. Liu, J., et al., *Hepcidin: A Promising Therapeutic Target for Iron Disorders: A Systematic Review*. Medicine (Baltimore), 2016. 95(14): p. e3150.
22. Guo, S., D.M. Frazer, and G.J. Anderson, *Iron homeostasis: transport, metabolism, and regulation*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2016. 19(4): p. 276-81.
23. Gaël, N., et al., *The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation*. J Clin Invest, 2002. 110(7): p. 1037-44.
24. Ashby, D.R., et al., *Erythropoietin administration in humans causes a marked and prolonged reduction in circulating hepcidin*. Haematologica, 2010. 95(3): p. 505-8.

25. Tetzlaff, W.F., et al., *-174 G > C IL-6 polymorphism and primary iron overload in male patients*. *Annals of Hematology*, 2018. 97(9): p. 1683-1687.
26. Indrák, K., *Hematologie a transfuzní lékařství*. 2014: Triton. 610.
27. Adams, P., P. Brissot, and L.W. Powell, *EASL International Consensus Conference on Haemochromatosis*. *J Hepatol*, 2000. 33(3): p. 485-504.
28. Sheldon, J.H., *Haemochromatosis*. 1935, London: Oxford University Press, H. Milford. 382.
29. Simon, M., et al., *A study of 609 HLA haplotypes marking for the hemochromatosis gene: (1) mapping of the gene near the HLA-A locus and characters required to define a heterozygous population and (2) hypothesis concerning the underlying cause of hemochromatosis-HLA association*. *Am J Hum Genet*, 1987. 41(2): p. 89-105.
30. Simon, M., et al., [*Letter: Idiopathic hemochromatosis associated with HL-A 3 tissular antigen*]. *Nouv Presse Med*, 1975. 4(19): p. 1432.
31. Feder, J.N., et al., *A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis*. *Nat Genet*, 1996. 13(4): p. 399-408.
32. Parkkila, S., et al., *HFE mutations do not account for transfusional iron overload in patients with acute myeloid leukemia*. *Transfusion*, 2001. 41(6): p. 828-31.
33. Ikuta, K., et al., *Characterization of the interaction between diferric transferrin and transferrin receptor 2 by functional assays and atomic force microscopy*. *J Mol Biol*, 2010. 397(2): p. 375-84.
34. Yen, A.W., T.L. Fancher, and C.L. Bowlus, *Revisiting hereditary hemochromatosis: current concepts and progress*. *Am J Med*, 2006. 119(5): p. 391-9.
35. Finberg, K.E., *Regulation of systemic iron homeostasis*. *Current Opinion in Hematology*, 2013. 20(3): p. 208-214.
36. Camaschella, C. and P. Strati, *Recent advances in iron metabolism and related disorders*. *Intern Emerg Med*, 2010. 5(5): p. 393-400.
37. Goswami, T. and N.C. Andrews, *Hereditary hemochromatosis protein, HFE, interaction with transferrin receptor 2 suggests a molecular mechanism for mammalian iron sensing*. *J Biol Chem*, 2006. 281(39): p. 28494-8.
38. Smith, P.M., B.E. Godfrey, and R. Williams, *Iron absorption in idiopathic haemochromatosis and its measurement using a whole-body counter*. *Clin Sci*, 1969. 37(2): p. 519-31.
39. Aastaldi, G., G. Meardi, and T. Lisino, *The iron content of jejunal mucosa obtained by Crosby's biopsy in hemochromatosis and hemosiderosis*. *Blood*, 1966. 28(1): p. 70-82.
40. Pietrangelo, A., et al., *Regulation of transferrin, transferrin receptor, and ferritin genes in human duodenum*. *Gastroenterology*, 1992. 102(3): p. 802-9.
41. Bothwell, T.H., *Overview and mechanisms of iron regulation*. *Nutr Rev*, 1995. 53(9): p. 237-45.
42. Fillet, G., Y. Beguin, and L. Baldelli, *Model of reticuloendothelial iron metabolism in humans: abnormal behavior in idiopathic hemochromatosis and in inflammation*. *Blood*, 1989. 74(2): p. 844-51.
43. Montosi, G., et al., *Wild-type HFE protein normalizes transferrin iron accumulation in macrophages from subjects with hereditary hemochromatosis*. *Blood*, 2000. 96(3): p. 1125-1129.
44. Cairo, G., et al., *Inappropriately high iron regulatory protein activity in monocytes of patients with genetic hemochromatosis*. *Blood*, 1997. 89(7): p. 2546-53.
45. Feder, J.N., et al., *The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(4): p. 1472-7.

46. Asberg, A., et al., *Hereditary hemochromatosis: The clinical significance of the S65C mutation*. Genetic Testing, 2002. 6(1): p. 59-62.
47. Aguilar-Martinez, P., et al., *Iron overload in HFE C282Y heterozygotes at first genetic testing: a strategy for identifying rare HFE variants*. Haematologica, 2011. 96(4): p. 507-14.
48. Pointon, J.J., et al., *Uncommon mutations and polymorphisms in the hemochromatosis gene*. Genet Test, 2000. 4(2): p. 151-61.
49. Hanson, E.H., G. Imperatore, and W. Burke, *HFE gene and hereditary hemochromatosis: a HuGE review*. Human Genome Epidemiology. Am J Epidemiol, 2001. 154(3): p. 193-206.
50. Lucotte, G., *Frequency analysis and allele map in favor of the celtic origin of the C282Y mutation of hemochromatosis*. Blood Cells Mol Dis, 2001. 27(2): p. 549-56.
51. Ryan, E., C. O'Keane, and J. Crowe, *Hemochromatosis in Ireland and HFE*. Blood Cells Mol Dis, 1998. 24(4): p. 428-32.
52. Jézéquel, P., et al., *Allele frequencies of hereditary hemochromatosis gene mutations in a local population of west Brittany*. Hum Genet, 1998. 102(3): p. 332-3.
53. Jackson, H.A., et al., *HFE mutations, iron deficiency and overload in 10,500 blood donors*. Br J Haematol, 2001. 114(2): p. 474-84.
54. Milman, N., et al., *Clinically overt hereditary hemochromatosis in Denmark 1948-1985: epidemiology, factors of significance for long-term survival, and causes of death in 179 patients*. Ann Hematol, 2001. 80(12): p. 737-44.
55. Holmström, P., et al., *Mild iron overload in patients carrying the HFE S65C gene mutation: a retrospective study in patients with suspected iron overload and healthy controls*. Gut, 2002. 51(5): p. 723-30.
56. Moczulski, D.K., W. Grzeszczak, and B. Gawlik, *Frequency of the hemochromatosis C282Y and H63D mutations in a Polish population of Slavic origin*. Med Sci Monit, 2001. 7(3): p. 441-3.
57. Andrikovics, H., et al., *Genotype screening for hereditary hemochromatosis among voluntary blood donors in Hungary*. Blood Cells Mol Dis, 2001. 27(1): p. 334-41.
58. Merryweather-Clarke, A.T., et al., *Digenic inheritance of mutations in HAMP and HFE results in different types of haemochromatosis*. Hum Mol Genet, 2003. 12(17): p. 2241-7.
59. Merryweather-Clarke, A.T., et al., *Global prevalence of putative haemochromatosis mutations*. J Med Genet, 1997. 34(4): p. 275-8.
60. Simon, M., et al., *The genetics of hemochromatosis*. Prog Med Genet, 1980. 4: p. 135-68.
61. Rochette, J., et al., *Multicentric origin of hemochromatosis gene (HFE) mutations*. Am J Hum Genet, 1999. 64(4): p. 1056-62.
62. Steinberg, K.K., et al., *Prevalence of C282Y and H63D mutations in the hemochromatosis (HFE) gene in the United States*. Jama, 2001. 285(17): p. 2216-22.
63. Burt, M.J., et al., *The significance of haemochromatosis gene mutations in the general population: implications for screening*. Gut, 1998. 43(6): p. 830-6.
64. Whitfield, J.B., et al., *Effects of HFE C282Y and H63D polymorphisms and polygenic background on iron stores in a large community sample of twins*. Am J Hum Genet, 2000. 66(4): p. 1246-58.
65. Cullen, L.M., et al., *The hemochromatosis 845 G-->A and 187 C-->G mutations: prevalence in non-Caucasian populations*. Am J Hum Genet, 1998. 62(6): p. 1403-7.
66. Bauduer, F., *C282Y/H63D hemochromatosis mutations and microevolution: Speculations concerning the Basque population*. Homo, 2017. 68(1): p. 38-41.

67. Gochee, P.A., et al., *A population-based study of the biochemical and clinical expression of the H63D hemochromatosis mutation*. Gastroenterology, 2002. 122(3): p. 646-51.
68. Cimburová, M., et al., *S65C and other mutations in the haemochromatosis gene in the Czech population*. Folia Biol (Praha), 2005. 51(6): p. 172-6.
69. Beckman, L.E., et al., *Haemochromatosis gene mutations in Finns, Swedes and Swedish Saamis*. Hum Hered, 2001. 52(2): p. 110-2.
70. Cimburova, M., et al., *Hereditary hemochromatosis: detection of C282Y and H63D mutations in HFE gene by means of Guthrie cards in population of Czech Republic*. Genet Epidemiol, 2002. 23(3): p. 260-3.
71. Žďárský, E., et al., *Hemochromatóza. Stanovení frekvence C282Y mutace pro populaci České republiky a citlivá detekce hemochromatózy z Guthrie karet*. Časopis lékařů českých, 1999. 138(16): p. 497-499.
72. Beutler, E., et al., *Penetrance of 845G--> A (C282Y) HFE hereditary haemochromatosis mutation in the USA*. Lancet, 2002. 359(9302): p. 211-8.
73. McCune, C.A., et al., *Hereditary haemochromatosis: only 1% of adult HFEC282Y homozygotes in South Wales have a clinical diagnosis of iron overload*. Hum Genet, 2002. 111(6): p. 538-43.
74. Olynyk, J.K., et al., *A population-based study of the clinical expression of the hemochromatosis gene*. N Engl J Med, 1999. 341(10): p. 718-24.
75. Phatak, P.D., et al., *Prevalence and penetrance of HFE mutations in 4865 unselected primary care patients*. Blood Cells Mol Dis, 2002. 29(1): p. 41-7.
76. Grosse, S.D., et al., *Clinical penetrance in hereditary hemochromatosis: estimates of the cumulative incidence of severe liver disease among HFE C282Y homozygotes*. Genetics in Medicine, 2018. 20(4): p. 383-389.
77. Waalen, J., et al., *Screening for hemochromatosis by measuring ferritin levels: a more effective approach*. Blood, 2008. 111(7): p. 3373-6.
78. Asberg, A., et al., *Screening for hemochromatosis: high prevalence and low morbidity in an unselected population of 65,238 persons*. Scand J Gastroenterol, 2001. 36(10): p. 1108-15.
79. Deugnier, Y., et al., *Gender-specific phenotypic expression and screening strategies in C282Y-linked haemochromatosis: a study of 9396 French people*. Br J Haematol, 2002. 118(4): p. 1170-8.
80. Yamashita, C. and P.C. Adams, *Natural history of the C282Y homozygote for the hemochromatosis gene (HFE) with a normal serum ferritin level*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2003. 1(5): p. 388-91.
81. Nowak, A., R.S. Giger, and A. Krayenbuehl, *Higher age at diagnosis of hemochromatosis is the strongest predictor of the occurrence of hepatocellular carcinoma in the Swiss hemochromatosis cohort A prospective longitudinal observational study*. Medicine, 2018. 97(42).
82. Bulaj, Z.J., et al., *Hemochromatosis genes and other factors contributing to the pathogenesis of porphyria cutanea tarda*. Blood, 2000. 95(5): p. 1565-71.
83. Crawford, D.H., et al., *Expression of HLA-linked hemochromatosis in subjects homozygous or heterozygous for the C282Y mutation*. Gastroenterology, 1998. 114(5): p. 1003-8.
84. Mura, C., O. Ragueneas, and C. Férec, *HFE mutations analysis in 711 hemochromatosis probands: evidence for S65C implication in mild form of hemochromatosis*. Blood, 1999. 93(8): p. 2502-5.
85. Wallace, D.F., et al., *Frequency of the S65C mutation of HFE and iron overload in 309 subjects heterozygous for C282Y*. J Hepatol, 2002. 36(4): p. 474-9.

86. Kong, X.M., et al., *Genotypic and phenotypic spectra of hemojuvelin mutations in primary hemochromatosis patients: a systematic review*. Orphanet Journal of Rare Diseases, 2019. 14.
87. Roetto, A., et al., *Juvenile hemochromatosis locus maps to chromosome 1q*. Am J Hum Genet, 1999. 64(5): p. 1388-93.
88. Papanikolaou, G., et al., *Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis*. Nat Genet, 2004. 36(1): p. 77-82.
89. Cazzola, M., et al., *Juvenile genetic hemochromatosis is clinically and genetically distinct from the classical HLA-related disorder*. Blood, 1998. 92(8): p. 2979-81.
90. De Gobbi, M., et al., *Natural history of juvenile haemochromatosis*. Br J Haematol, 2002. 117(4): p. 973-9.
91. Cazzola, M., et al., *Juvenile idiopathic haemochromatosis: a life-threatening disorder presenting as hypogonadotropic hypogonadism*. Hum Genet, 1983. 65(2): p. 149-54.
92. Lamon, J.M., et al., *Idiopathic hemochromatosis in a young female. A case study and review of the syndrome in young people*. Gastroenterology, 1979. 76(1): p. 178-83.
93. Ramzan, K., et al., *Juvenile hemochromatosis and hepatocellular carcinoma in a patient with a novel mutation in the HJV gene*. Eur J Med Genet, 2017. 60(6): p. 308-311.
94. Roetto, A., et al., *Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis*. Nat Genet, 2003. 33(1): p. 21-2.
95. MacFarlane, J., G. PAPANIKALAOU, and Y.P. GOLDBERG, *GeneReviews*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle.
96. Camaschella, C., et al., *The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22*. Nat Genet, 2000. 25(1): p. 14-5.
97. Mattman, A., et al., *Transferrin receptor 2 (TfR2) and HFE mutational analysis in non-C282Y iron overload: identification of a novel TfR2 mutation*. Blood, 2002. 100(3): p. 1075-7.
98. Roetto, A., et al., *New mutations inactivating transferrin receptor 2 in hemochromatosis type 3*. Blood, 2001. 97(9): p. 2555-60.
99. Davies, P.S., et al., *Evidence for the interaction of the hereditary haemochromatosis protein, HFE, with the transferrin receptor in endocytic compartments*. Biochem J, 2003. 373(Pt 1): p. 145-53.
100. Kawabata, H., et al., *Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family*. J Biol Chem, 1999. 274(30): p. 20826-32.
101. West, A.P., Jr., et al., *Comparison of the interactions of transferrin receptor and transferrin receptor 2 with transferrin and the hereditary hemochromatosis protein HFE*. J Biol Chem, 2000. 275(49): p. 38135-8.
102. Fleming, R.E., et al., *Transferrin receptor 2: continued expression in mouse liver in the face of iron overload and in hereditary hemochromatosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(5): p. 2214-9.
103. Kawabata, H., et al., *Transferrin receptor 2-alpha supports cell growth both in iron-chelated cultured cells and in vivo*. J Biol Chem, 2000. 275(22): p. 16618-25.
104. Pietrangelo, A., *Hemochromatosis 1998: is one gene enough?* J Hepatol, 1998. 29(3): p. 502-9.
105. Peters, T.M.A., et al., *TFR2-related haemochromatosis in the Netherlands: a cause of arthralgia in young adulthood*. Netherlands Journal of Medicine, 2017. 75(2): p. 56-64.
106. Pietrangelo, A., et al., *Hereditary hemochromatosis in adults without pathogenic mutations in the hemochromatosis gene*. N Engl J Med, 1999. 341(10): p. 725-32.

107. Devalia, V., et al., *Autosomal dominant reticuloendothelial iron overload associated with a 3-base pair deletion in the ferroportin 1 gene (SLC11A3)*. Blood, 2002. 100(2): p. 695-7.
108. Montosi, G., et al., *Autosomal-dominant hemochromatosis is associated with a mutation in the ferroportin (SLC11A3) gene*. J Clin Invest, 2001. 108(4): p. 619-23.
109. Njajou, O.T., et al., *A mutation in SLC11A3 is associated with autosomal dominant hemochromatosis*. Nat Genet, 2001. 28(3): p. 213-4.
110. Donovan, A., et al., *Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter*. Nature, 2000. 403(6771): p. 776-81.
111. Gordeuk, V.R., et al., *Iron overload in Africans and African-Americans and a common mutation in the SLC40A1 (ferroportin 1) gene*. Blood Cells Mol Dis, 2003. 31(3): p. 299-304.
112. Arden, K.E., et al., *A novel mutation in ferroportin1 is associated with haemochromatosis in a Solomon Islands patient*. Gut, 2003. 52(8): p. 1215-7.
113. McKie, A.T., et al., *A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation*. Mol Cell, 2000. 5(2): p. 299-309.
114. Abboud, S. and D.J. Haile, *A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism*. J Biol Chem, 2000. 275(26): p. 19906-12.
115. Shimura, M., et al., *Ferroportin Disease Caused by a Heterozygous Variant p.Cys326Phe in the SLC40A1 Gene and the Efficacy of Therapeutic Phlebotomy in Children*. Journal of Pediatric Hematology Oncology, 2019. 41(5): p. E325-E328.
116. Maser, J., A. Grau, and E. Hornberger, *Aceruloplasminemia Diagnosis and Treatment of a rare Disease*. Nervenarzt, 2019. 90(2): p. 185-187.
117. Hayashi, A., et al., *Studies on familial hypotransferrinemia: unique clinical course and molecular pathology*. Am J Hum Genet, 1993. 53(1): p. 201-13.
118. Ponka, P., *Rare causes of hereditary iron overload*. Semin Hematol, 2002. 39(4): p. 249-62.
119. Kato, J., et al., *A mutation, in the iron-responsive element of H ferritin mRNA, causing autosomal dominant iron overload*. Am J Hum Genet, 2001. 69(1): p. 191-7.
120. Van Vlierberghe, H., et al., *Haptoglobin phenotype 2-2 overrepresentation in Cys282Tyr hemochromatotic patients*. J Hepatol, 2001. 35(6): p. 707-11.
121. Brissot, P., et al., *A genotypic study of 217 unrelated probands diagnosed as "genetic hemochromatosis" on "classical" phenotypic criteria*. J Hepatol, 1999. 30(4): p. 588-93.
122. Piperno, A., et al., *Heterogeneity of hemochromatosis in Italy*. Gastroenterology, 1998. 114(5): p. 996-1002.
123. Warne, C.D., et al., *HFE p.C282Y homozygosity predisposes to rapid serum ferritin rise after menopause: A genotype-stratified cohort study of hemochromatosis in Australian women*. Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2017. 32(4): p. 797-802.
124. Fonseca, P.F.S., et al., *Quality of life scores differs between genotypic groups of patients with suspected hereditary hemochromatosis*. BMC Medical Genetics, 2018. 19.
125. McDonnell, S.M., et al., *A survey of 2,851 patients with hemochromatosis: symptoms and response to treatment*. Am J Med, 1999. 106(6): p. 619-24.
126. Reuben, A., et al., *The hemochromatosis protein HFE 20 years later: An emerging role in antigen presentation and in the immune system*. Immunity Inflammation and Disease, 2017. 5(3): p. 218-232.
127. Zwerina, J. and T. Dallos, *[Osteoarthritis in hereditary metabolic diseases]*. Orthopade, 2010. 39(6): p. 637-46.

128. Kröner, P.T., et al., *Hereditary hemochromatosis is associated with increased use of joint replacement surgery: Results of a nationwide analysis*. Semin Arthritis Rheum, 2020. 50(2): p. 360-365.
129. Wijarnpreecha, K., et al., *Hereditary hemochromatosis and risk of joint replacement surgery: a systematic review and meta-analysis*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2021. 33(1): p. 96-101.
130. Aboulkhair, A.A., et al., *Evaluation of Hemochromatosis, Diagnosis and Management: Simple Literature Review*. Archives of Pharmacy Practice, 2020. 11(3): p. 101-103.
131. Fargion, S., L. Valenti, and A.L. Fracanzani, *Hemochromatosis gene (HFE) mutations and cancer risk: expanding the clinical manifestations of hereditary iron overload*. Hepatology, 2010. 51(4): p. 1119-21.
132. McCarthy, G.M., et al., *Hereditary hemochromatosis: a common, often unrecognized, genetic disease*. Cleve Clin J Med, 2002. 69(3): p. 224-6, 229-30, 232-3 passim.
133. Atkins, J.L., et al., *Association of Hemochromatosis HFE p.C282Y Homozygosity With Hepatic Malignancy*. Jama-Journal of the American Medical Association, 2020. 324(20): p. 2048-2057.
134. Silva, M.C.P., et al., *HFE gene mutations increase the risk of coronary heart disease in women*. European Journal of Epidemiology, 2010. 25(9): p. 643-649.
135. Barale, C., et al., *Transferrin Saturation Inversely Correlates with Platelet Function*. Thromb Haemost, 2019. 119(5): p. 766-778.
136. Pelusi, C., et al., *Endocrine dysfunction in hereditary hemochromatosis*. Journal of Endocrinological Investigation, 2016. 39(8): p. 837-847.
137. Niederau, C., *[Hereditary hemochromatosis]*. Med Klin (Munich), 2009. 104(12): p. 931-46.
138. Szántová, M., *Hemochromatóza - aktuálny prehľad*. Praktický lékař : časopis pro další vzdělávání lékařů, 2007. 87(10): p. 588-593.
139. Rombout-Sestrienkova, E., M.G. van Kraaij, and G.H. Koek, *How we manage patients with hereditary haemochromatosis*. Br J Haematol, 2016. 175(5): p. 759-770.
140. Poon, K.S., et al., *Validation of the Hemochromatosis (2SNP+) Direct EUROArray Assay for the Molecular Diagnosis of HFE-Related Hereditary Hemochromatosis*. Genetic Testing and Molecular Biomarkers, 2020. 24(9): p. 608-611.
141. Golfeyz, S., S. Lewis, and I.S. Weisberg, *Hemochromatosis: pathophysiology, evaluation, and management of hepatic iron overload with a focus on MRI*. Expert Review of Gastroenterology & Hepatology, 2018. 12(8): p. 767-778.
142. McCune, C.A., et al., *Screening for hereditary haemochromatosis within families and beyond*. Lancet, 2003. 362(9399): p. 1897-8.
143. de Graaff, B., et al., *Costs associated with hereditary haemochromatosis in Australia: a cost-of-illness study*. Aust Health Rev, 2017. 41(3): p. 254-267.
144. Laursen, A.H., et al., *Causes of iron overload in blood donors - a clinical study*. Vox Sanguinis, 2018. 113(2): p. 110-119.
145. Bacon, B.R., et al., *Molecular medicine and hemochromatosis: at the crossroads*. Gastroenterology, 1999. 116(1): p. 193-207.
146. Trinder, D., et al., *Molecular pathogenesis of iron overload*. Gut, 2002. 51(2): p. 290-5.
147. Willis, G., et al., *Incidence of liver disease in people with HFE mutations*. Gut, 2000. 46(3): p. 401-4.
148. Horák, J., *Standardní diagnostický a terapeutický postup u genetické (hereditární) hemochromatózy. Doporučený postup České hepatologické společnosti České lékařské společnosti J. E. Purkyně. Vnitřní lékařství : orgán Československé společnosti pro*



- vnitřní lékařství, sekce Československé lékařské společnosti J. E. Purkyně, 2006. 52(2): p. 173-175.
149. Rombout-Sestrienkova, E., et al., *Erythrocytapheresis versus phlebotomy in the maintenance treatment of HFE hemochromatosis patients: results from a randomized crossover trial*. Transfusion, 2016. 56(1): p. 261-270.
  150. Novotný, J., *Poruchy metabolismu železa II. Vnitřní lékařství : orgán Československé společnosti pro vnitřní lékařství, sekce Československé lékařské společnosti J. E. Purkyně*, 2005. 51(9): p. 995-1006.
  151. Muncunill, J., et al., *In hereditary hemochromatosis, red cell apheresis removes excess iron twice as fast as manual whole blood phlebotomy*. J Clin Apher, 2002. 17(2): p. 88-92.
  152. Sundic, T., et al., *Erythrocytapheresis compared with whole blood phlebotomy for the treatment of hereditary haemochromatosis*. Blood Transfusion, 2014. 12: p. S84-S89.
  153. Rombout-Sestrienkova, E., et al., *Therapeutic erythrocytapheresis versus phlebotomy in the initial treatment of hereditary hemochromatosis - A pilot study*. Transfus Apher Sci, 2007. 36(3): p. 261-7.
  154. Čermák, J., *Některé nové poznatky v diagnostice a léčbě stavů s přetížením železem*. Transfuze a hematologie dnes : časopis Společnosti pro transfuzní lékařství a Hematologické společnosti, 2006. 12(3): p. 140-144.
  155. Aydinok, Y., *Iron Chelation Therapy as a Modality of Management*. Hematology-Oncology Clinics of North America, 2018. 32(2): p. 261-+.
  156. Cappellini, M.D., et al., *Iron chelation with deferasirox in adult and pediatric patients with thalassemia major: efficacy and safety during 5 years' follow-up*. Blood, 2011. 118(4): p. 884-893.
  157. Tauchenova, L., et al., *Successful Treatment of Iron-Overload Cardiomyopathy in Hereditary Hemochromatosis With Deferoxamine and Deferiprone*. Can J Cardiol, 2016. 32(12): p. 1574 e1-1574 e3.
  158. Casu, C., E. Nemeth, and S. Rivella, *Hepcidin agonists as therapeutic tools*. Blood, 2018. 131(16): p. 1790-1794.
  159. SKIKNE, B. and R.D. BAYNES, *Iron absorption.*, in *Iron Metabolism in Health and Disease.*, J.H. Brock, Editor. 1994, W.B. Saunders: London. p. 151-187.
  160. Radford-Smith, D.E., E.E. Powell, and L.W. Powell, *Haemochromatosis: a clinical update for the practising physician*. Intern Med J, 2018. 48(5): p. 509-516.
  161. Sheahan, O. and E. O'Connell, *Hereditary haemochromatosis: patient support and education*. Nurs Stand, 2009. 24(3): p. 49-56.
  162. Harwood, V.J., J.P. Gandhi, and A.C. Wright, *Methods for isolation and confirmation of Vibrio vulnificus from oysters and environmental sources: a review*. J Microbiol Methods, 2004. 59(3): p. 301-16.
  163. Deitenbeck, R. and T. Zeiler, *Hereditäre Hämochromatose und Blutspende: Patient oder Spender? Transfusionsmedizin - Immunhämatologie · Hämotherapie · Transplantationsimmunologie · Zelltherapie*, 2018. 8(01): p. 40-44.
  164. Barton, J.C., et al., *Severity of iron overload in hemochromatosis: effect of volunteer blood donation before diagnosis*. Transfusion, 2001. 41(1): p. 123-9.
  165. Braseth, T.A., T. Hervig, and A.S. Rosvik, *Hemochromatosis and blood donation*. Transfusion and Apheresis Science, 2017. 56(3): p. 485-489.
  166. Mishra, S., D. Sim, and P. Flanagan, *Haemochromatosis: evaluating the effectiveness of a novel patient self-management approach to venesection as blood donation*. New Zealand Medical Journal, 2017. 130(1457): p. 26-33.

167. Vyhláška ze dne 15. dubna 2008 o stanovení bližších požadavků pro zajištění jakosti a bezpečnosti lidské krve a jejích složek (vyhláška o lidské krvi), in *Sbírka zákonů*. 2008: Česká republika. p. 1803-1838.
168. HealthCare, E.D.f.t.Q.o.M.a., *Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components : recommendation No. R (95) 15*. 15th ed. ed. 2011, Strasbourg : Council of Europe Publishing. 416.
169. Røsvik, A.S., et al., *Blood donors with hereditary hemochromatosis*. *Transfusion*, 2010. 50(8): p. 1787-93.
170. West, K.A. and A.F. Eder, *Accepting hereditary hemochromatosis blood donors: ask not why, ask why not*. *Transfusion*, 2016. 56(12): p. 2907-2909.
171. Hoad, V., et al., *The infectious disease blood safety risk of Australian hemochromatosis donations*. *Transfusion*, 2016. 56(12): p. 2934-2940.
172. Leitman, S.F., et al., *Hemochromatosis subjects as allogeneic blood donors: a prospective study*. *Transfusion*, 2003. 43(11): p. 1538-1544.
173. Sut, C., et al., *Properties of donated red blood cell components from patients with hereditary hemochromatosis*. *Transfusion*, 2017. 57(1): p. 166-177.
174. Richardson, K.J., A.P. McNamee, and M.J. Simmonds, *Hemochromatosis alters the sensitivity of red blood cells to mechanical stress*. *Transfusion*, 2020. 60(12): p. 2982-2990.
175. Popovsky, M.A., *Multicomponent apheresis blood collection in the United States: current status and future directions*. *Transfus Apher Sci*, 2005. 32(3): p. 299-304.
176. McLeod, B.C., B. American Association of Blood, and A. American Society for, *Therapeutic apheresis : a physician's handbook*. 2005, Bethesda, Md.; [Vancouver, BC]: AABB ; American Society for Apheresis.
177. Szczepiorkowski, Z.M., et al., *Guidelines on the use of therapeutic apheresis in clinical practice--evidence-based approach from the Apheresis Applications Committee of the American Society for Apheresis*. *J Clin Apher*, 2010. 25(3): p. 83-177.
178. Matthes, G.A., *Options and cost effectiveness of multicomponent blood collection*. *Transfus Apher Sci*, 2002. 27(2): p. 115-21.
179. Conte, D., et al., *Effectiveness of erythrocytapheresis in idiopathic hemochromatosis. Report of 14 cases*. *Int J Artif Organs*, 1989. 12(1): p. 59-62.
180. Kellner, H. and W.G. Zoller, *Repeated isovolemic large-volume erythrocytapheresis in the treatment of idiopathic hemochromatosis*. *Z Gastroenterol*, 1992. 30(11): p. 779-83.
181. Lima, T.G., et al., *Treatment of iron overload syndrome: a general review*. *Rev Assoc Med Bras (1992)*, 2019. 65(9): p. 1216-1222.
182. Bláha, M., et al., *Vedlejší účinky hemaferéz*. *Vnitřní lékařství : orgán Československé společnosti pro vnitřní lékařství, sekce Československé lékařské společnosti J. E. Purkyně*, 1989. 35(10): p. 972-981.
183. Rombout-Sestrienkova, E., et al., *Erythrocytapheresis versus phlebotomy in the initial treatment of HFE hemochromatosis patients: results from a randomized trial*. *Transfusion*, 2012. 52(3): p. 470-477.
184. Gašová, Z., *Trapeutické hemaferézy*, in *Transfuzní lékařství*, V. Řeháček and J. Masopust, Editors. 2013, Grada: Praha. p. 119-134.
185. Bláha, M., et al., *Safety and tolerability of long lasting LDL-apheresis in familial hyperlipoproteinemia*. *Ther Apher Dial*, 2007. 11(1): p. 9-15.
186. Simon, T.L., et al., *Rossi's Principles of Transfusion Medicine*. 4 ed. 2009, Oxford, UK: Wiley-Blackwell. 1095.
187. Bolan, C.D., et al., *Controlled study of citrate effects and response to i.v. calcium administration during allogeneic peripheral blood progenitor cell donation*. *Transfusion*, 2002. 42(7): p. 935-46.

188. *AABB Standards, 23th edition, AABB Publishing 811 Glenbrook Road, Bethesda, Maryland, 2005.* 2007, New Delphi : NACO: American Association of Blood Banks. Standards for Blood Banks and Transfusion Services.
189. Sandhu, K., et al., *Phenotypic analysis of hemochromatosis subtypes reveals variations in severity of iron overload and clinical disease.* Blood, 2018. 132(1): p. 101-110.
190. Adams, P., et al., *Therapeutic recommendations in HFE hemochromatosis for p.Cys282Tyr (C282Y/C282Y) homozygous genotype.* Hepatol Int, 2018. 12(2): p. 83-86.
191. Milman, N.T., et al., *Diagnosis and Treatment of Genetic HFE-Hemochromatosis: The Danish Aspect.* Gastroenterology Res, 2019. 12(5): p. 221-232.
192. Ong, S.Y., et al., *Reduction of body iron in HFE -related haemochromatosis and moderate iron overload (Mi-Iron): a multicentre, participant-blinded, randomised controlled trial.* The Lancet Haematology, 2017. 4(12): p. e607-e614.
193. Parapia, L.A., *History of bloodletting by phlebotomy.* British Journal of Haematology, 2008. 143(4): p. 490-495.
194. Assi, T.B. and E. Baz, *Current applications of therapeutic phlebotomy.* Blood Transfusion, 2014. 12: p. S75-S83.
195. Zoller, W.G., H. Kellner, and F.A. Spengel, *Erythrocytapheresis. A method for rapid extracorporeal elimination of erythrocytes. Results in 65 patients.* Klin Wochenschr, 1988. 66(9): p. 404-9.
196. Mariani, R., et al., *Erythrocytapheresis plus erythropoietin: an alternative therapy for selected patients with hemochromatosis and severe organ damage.* Haematologica, 2005. 90(5): p. 717-8.
197. Rombout-Sestrienkova, E., et al., *Therapeutic Erythrocytapheresis (TE) versus Phlebotomy (P) in the treatment of Hereditary Hemochromatosis (HH) patients: Preliminary results from an ongoing randomized clinical trial (NCT 00202436).* Transfusion and Apheresis Science, 2009. 40(2): p. 135-136.
198. Buzzetti, E., et al., *Interventions for hereditary haemochromatosis: an attempted network meta-analysis.* Cochrane Database Syst Rev, 2017. 3: p. CD011647.
199. Řeháček, V., et al., *Therapeutic erythrocytapheresis in the initial treatment of hereditary hemochromatosis.* Acta medica (Hradec Králové), 2012. 55(4): p. 180-185.
200. Moirand, R., et al., *Clinical features of genetic hemochromatosis in women compared with men.* Ann Intern Med, 1997. 127(2): p. 105-10.
201. Hofstetter, J.R., *[Risks in blood-letting in therapy of hemochromatosis].* Gastroenterologia, 1957. 87(3-4): p. 186-91.
202. Jaquet, P., et al., *[Fatal complication after 2 bleedings during the treatment of hemochromatosis].* Diabete, 1967. 15(1): p. 70-2.
203. Hicken, B.L., D.C. Tucker, and J.C. Barton, *Patient compliance with phlebotomy therapy for iron overload associated with hemochromatosis.* Am J Gastroenterol, 2003. 98(9): p. 2072-7.
204. Popovsky, M.A., *Safety of RBC apheresis and whole blood donation in allogeneic and autologous blood donors.* Transfus Apher Sci, 2006. 34(2): p. 205-11.
205. Schulzki, T., et al., *A prospective multicentre study on the safety of long-term intensive plasmapheresis in donors (SIPLA).* Vox Sang, 2006. 91(2): p. 162-73.
206. Eckerstrom, C., et al., *Evaluation of a screening program for iron overload and HFE mutations in 50,493 blood donors.* Ann Hematol, 2020. 99(10): p. 2295-2301.
207. Kelley, M., et al., *Iron overload is rare in patients homozygous for the H63D mutation.* Can J Gastroenterol Hepatol, 2014. 28(4): p. 198-202.
208. Wijermans, P., et al., *Isovolemic erythrocytapheresis technique as an alternative to conventional phlebotomy in patients with polycythemia rubra vera and hemochromatosis.* Transfusion and Apheresis Science, 2009. 40(2): p. 137-137.

209. Bruckl, D., et al., *Efficacy and safety of erythrocytapheresis and low-dose erythropoietin for treatment of hemochromatosis*. J Clin Apher, 2017. 32(3): p. 170-174.
210. Rombout-Sestrienkova, E., et al., *A predictive model for estimating the number of erythrocytapheresis or phlebotomy treatments for patients with naïve hereditary hemochromatosis*. J Clin Apher, 2020.
211. Bolan, C.D., et al., *MCV as a guide to phlebotomy therapy for hemochromatosis*. Transfusion, 2001. 41(6): p. 819-27.
212. Řeháček, V. and J. Rondiak, *Two collections of two red blood cell concentrate units in 16 weeks*. Poster na kongresu ISBT, Vídeň 2000. Publ. ve Vox Sanguinis, 78-S1-00, str. P282, ISSN 0042-9007.

## 13. SEZNAM ILUSTRACÍ

### 13.1. SEZNAM TABULEK

1. Výskyt klinických příznaků u HH .....	40
2. Přístroje pro aferézy .....	50
3. Specifická hmotnost krevních složek .....	51
4. Složení antikoagulačního roztoku CPD-50 .....	64
5. Výsledky screeningu dárců krve – muži .....	67
6. Výsledky screeningu dárců krve – ženy .....	67
7. Hladina feritinu u mužů a žen se zvýšenou hodnotou saturace transferinu .....	68
8. Zastoupení mutací HFE genu v souboru léčených pacientů .....	69
9. Soubor pacientů – přehled údajů .....	70
10. Hodnoty feritinu, hladiny železa, TIBC a saturace transferinu před léčbou.....	72
11. Hodnota feritinu po posledním odběru .....	77
12. Hodnoty hladiny železa, TIBC a saturace transferinu po léčbě .....	80
13. Nežádoucí reakce na odběr .....	81

### 13.2. SEZNAM OBRÁZKŮ

1. Vstřebávání železa a jeho regulace .....	19
2. Vstřebávání, oběh a distribuce železa, regulace hladiny železa .....	20
3. Transport železa do buňky .....	21
4. Produkce hepcidinu v hepatocytu a jeho regulace .....	24
5. Struktura HFE proteinu .....	27
6. Regulace metabolismu železa .....	28
7. Vzácné mutace HFE genu .....	29
8. Představa rozšíření mutace C282Y genu HFE v Evropě.....	30

9. Klinické příznaky hereditární hemochromatózy .....	38
10. Pravděpodobnost postižení kloubů u HH .....	38
11. Erythrocytaferéza – princip diskontinuálního režimu .....	51
12. Separátor krevních částic Haemonetics MCS + .....	59
13. Schéma jednorázového setu LN 944 .....	60
14. Fáze 1: odběr krve do centrifugy, centrifugace, přesun plazmy .....	60
15. Fáze 2: přesun erytrocytů z centrifugy do sběrných vaků .....	61
16. Fáze 3: návrat krevních složek pacientovi z pracovního vaku .....	61
17. Vzorec pro výpočet TBV .....	63
18. Hemokalkulátor v úvodu procedury .....	64
19. Hemokalkulátor na konci odběru .....	65

### 13.3. SEZNAM GRAFŮ

1. Průměrný věk mužů a žen .....	69
2. Hodnoty feritinu před zahájením léčby .....	71
3. Porovnání hladiny feritinu v souborech mužů a žen a v souborech pacientů s homozygotní mutací C282Y a pacientů s jinou mutací .....	72
4. Závislost hladiny feritinu na věku pacienta v souboru všech pacientů, v souboru mužů, žen a mužů – homozygotů C282Y .....	73
5. Objem odebraných erytrocytů při erythrocytaferéze .....	74
6. Snížení hladiny hemoglobinu a hematokritu po erythrocytaferéze .....	75
7. Změny středního objemu erytrocytů v závislosti na odběrech .....	75
8. Celkové množství odebraných erytrocytů při indukční léčbě .....	76
9. Hodnoty feritinu po ukončení indukční léčby .....	77
10. Závislost poklesu feritinu na množství odebraných erytrocytů .....	78
11. Závislost poklesu feritinu na množství odebraných erytrocytů, soubor	

homozygotů C282Y .....	78
12. Závislost poklesu hladiny feritinu na době léčby .....	79
13. Hodnoty hladiny železa, TIBC a saturace transferinu před léčbou a po léčbě ..	80
14. Závislost poklesu hladiny feritinu na délce léčby a metodě. Pacienti léčeni erythrocytaferézou, pacienti léčeni venepunkcemi .....	88