

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
katedra biologických a lékařských věd

**Záchyt talasemií a hemoglobinopatií ve
východočeském regionu v letech 1995 – 2015
(Retrospektivní studie)**

(Bakalářská práce)

Prohlašuji, že tato bakalářská práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpal/a, řádně cituji. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.”

datum

podpis

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat své školitelce Mgr. Iloně Fátorové za pomoc, vedení a udílení cenných rad při sepsání této bakalářské práce, paní Vieře Dytrychové a dalším pracovníkům laboratoře IV. IHK za pomoc s praktickou částí práce, a všem, kteří mě po celou dobu podporovali.

Abstrakt

Bakalářská práce se zabývá záchytem talasemií a hemoglobinopatií ve východním regionu České republiky. Jedná se o retrospektivní vyhodnocení laboratorních dat, u pacientů, kteří byli vyšetřeni v laboratoři IV. interní hematologické kliniky ve Fakultní nemocnici Hradec Králové, a to v období od roku 1996 až do konce roku 2015.

V teoretické části je stručně popsán hemoglobin jeho struktura a funkce. Dále jsou charakterizována vrozená onemocnění – talasemie a hemoglobinopatie. Zmíněny jsou i diagnostické metody, laboratorní nález a léčba.

V praktické části jsou popsány diagnostické metody, které se používají ve Fakultní nemocnici Hradec Králové. Mezi ně patří vyšetření krevního obrazu, vyšetření nátěru periferní krve a elektroforéza hemoglobinu. Laboratorní data u sledovaného souboru pacientů byla statisticky vyhodnocena a porovnána s celostátním a celosvětovým výskytem talasemií a hemoglobinopatií.

Klíčová slova: talasemie, hemoglobinopatie, krevní obraz, elektroforéza hemoglobinu

Abstract

The aim of this bachelor thesis is to describe the occurrence of the thalassemias and hemoglobinopathies in eastern region of Czech Republic. The data of the patients were retrospectively evaluated. The patients were examined in the hematological laboratory. The examination was performed in the University Hospital in Hradec Králové since 1996 to 2015.

In the theoretical part is shortly described hemoglobin, his structure and functions. Further on there are described congenital diseases - thalassemias and hemoglobinopathies. The diagnostical methods, laboratory findings and therapy are also mentioned.

The practical part is focused on diagnostical methods, which are used at the University Hospital in Hradec Kralové. Some of them are complete blood count, diferencial count blood smears and hemoglobin electrophoresis. The obtained laboratory data were statistically evaluated and compared with global occurrence of thalassemies and hemoglobinopathies.

Key words: thalassemia, hemoglobinopathy, blood count, hemoglobin electrophoresis

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Zadání práce – cíl práce.....	9
3	Teoretická část.....	10
3.1	Hemoglobin – vývoj, struktura, funkce	10
3.2	Hemoglobinopatie.....	11
3.2.1	Hemoglobinopatie S – srpkovitá anemie (HbS)	11
3.2.2	Hemoglobinopatie C	12
3.2.3	Choroby hemoglobinu D	12
3.2.4	Hemoglobinopatie E	13
3.2.5	Hemoglobin Lepore	13
3.2.6	Nestabilní hemoglobiny	13
3.3	Talasemie	14
3.3.1	Alfa talasemie	15
3.3.2	Beta talasemie	16
3.4	Diagnostika a laboratorní nález	17
3.4.1	Krevní obraz	17
3.4.2	Morfologie červených krvinek	19
3.4.3	Analýza hemoglobinu	19
3.5	Léčba.....	21
4	Praktická část.....	22
4.1	Charakteristika vyšetřovaného souboru.....	22
4.2	Odběr krve a metodika	22
4.2.1	Odběr krve	22
4.2.2	Vyšetřovací metody	23
4.3	Statistické vyhodnocení dat	25
4.4	Kazuistiky	31

5	Diskuze a závěr.....	37
6	Zkratky	39
7	Seznamy	41
7.1	Seznam tabulek.....	41
7.2	Seznam grafů	41
7.3	Seznam obrázků.....	41
8	Seznam literatury	42

1 Úvod

Hemoglobin (Hb) je červené krevní barvivo, které je obsažené v erytrocytech ve formě roztoku. Jeho hlavní úlohou je transport kyslíku z plic do tkání a odvod CO₂ z tkání dýchacími orgány ven z těla.

Hemoglobin je tetramerní molekula tvořená čtyřmi hemovými částmi a čtyřmi bílkovinnými (globinovými) řetězci, z nichž jsou vždy dva a dva identické. Během fyziologického vývoje jedince prochází i molekula hemoglobinu určitými strukturálními změnami, kdy se mění složení bílkovinných řetězců, ale funkce hemoglobinu není ovlivněna.

Můžeme se však setkat s vrozenými patologickými stavy, kdy dochází k bodovým mutacím ve struktuře globinových řetězců, které označujeme jako hemoglobinopatie, nebo se stavy, při kterých dochází ke snížení až potlačení syntézy jednoho typu globinového řetězce. Tyto stavy označujeme jako talasemie. Některé tyto stavy mohou být klinicky němé, jiné však mohou mít závažné klinické projevy ve smyslu změn v morfologii erytrocytů, omezení jejich životaschopnosti, které vedou k jejich předčasnému rozpadu a vzniku hemolytické anemie.

Celosvětově se tato onemocnění vyskytují nerovnoměrně, nejvíce je postižen africký kontinent, oblasti jihovýchodní Asie a Středozemního moře. Vzhledem k otevření hranic a volné migraci obyvatelstva lze očekávat, že se tato onemocnění budou v budoucnu častěji vyskytovat i v jiných regionech.

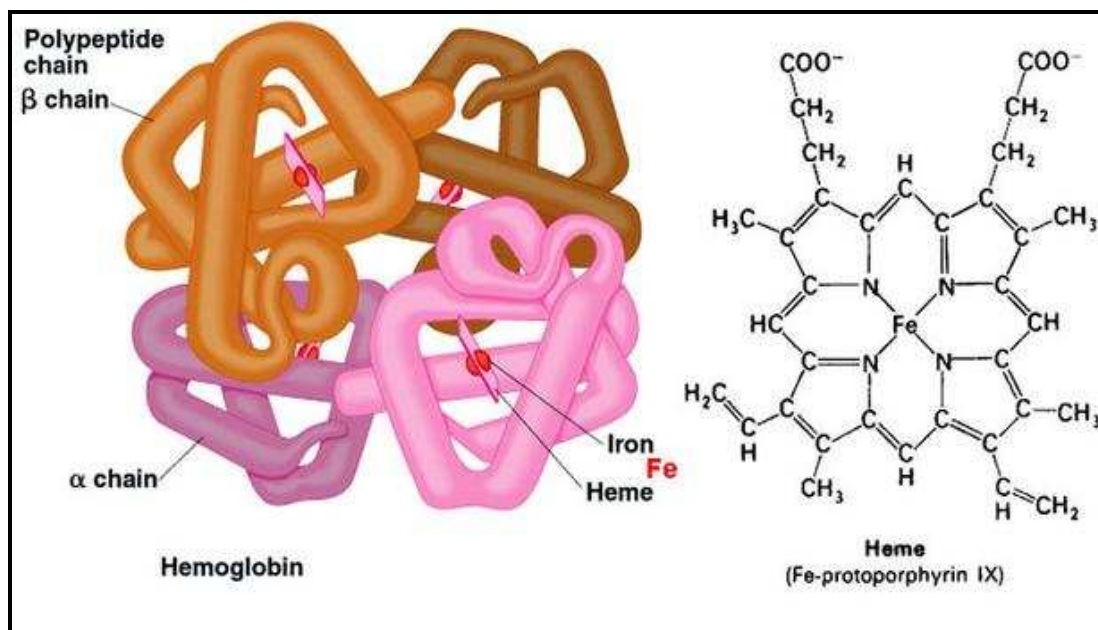
2 Zadání práce – cíl práce

Cílem této práce bylo zmapovat záchyty hemoglobinopatií a talasemií ve východočeském regionu v letech 1996 – 2015 ve Fakultní nemocnici Hradec Králové a provést retrospektivní zhodnocení laboratorních dat u pacientů. Dalším cílem bylo porovnat výskyt těchto onemocnění ve sledovaném regionu v celostátním i celosvětovém měřítku.

3 Teoretická část

3.1 Hemoglobin – vývoj, struktura, funkce

Hemoglobin je tetramerní molekula, která se skládá ze čtyř bílkovinných (globinových) řetězců, kdy vždy dva a dva jsou stejné, a ze čtyř hemů (feroproporfirinů). Globinové řetězce se liší počtem a pořadím aminokyselin. Proporfirin je základem molekuly hemu. Je složený ze 4 pyrrolových jader, které jsou spojeny methinovými můstky. Pomocí enzymu ferrochelatázy dochází k včlenění železa do proporfirinu a vznikne hem (feroproporfirin). Železo se váže na tetrapyrrolový kruh pomocí čtyř vazeb, na globinový řetězec jednou vazbou a poslední vazba je určena pro kyslík. (Pecka, 2002; Penka, 2009)



Obrázek 1: Molekula hemoglobinu

Zdroj: <https://respiratorycasestudy-7.wikispaces.com/Hemoglobin>

S vývojem jedince dochází i k tvorbě různých druhů hemoglobinů, které se liší v globinových řetězcích. V embryonálním vývoji se jedná o Hb Gower, který obsahuje 2 řetězce alfa a 2 řetězce epsilon. Vyskytuje se v prvním trimestru vývoje lidského plodu. Plodový hemoglobin neboli fetální vzniká po 10 týdnech těhotenství, je tvořen 2 řetězci alfa a 2 řetězci gama. Je přítomen po celou dobu nitroděložního vývoje a u novorozenců, pak jeho koncentrace postupně klesá, až po šesti měsících po narození klesne pod 2 %. Hemoglobin F (HbF) je nahrazen tzv. hemoglobinem

dospělých (HbA), který má 2 alfa a 2 beta řetězce, a hemoglobinem A2 (HbA2) obsahujícím 2 alfa a 2 delta řetězce. U zdravého dospělého člověka je HbA zastoupen cca 98 %, HbA2 cca 1,5 – 3,5 % a koncentrace HbF je pod 2 %. (Pecka, 2002)

Jednou z nejdůležitějších funkcí hemoglobinu je přenos kyslíku z plic do tkání. Dvojmočné železo v hemu je schopno navázat jednu molekulu kyslíku, celkově molekula hemoglobinu je schopna navázat čtyři molekuly kyslíku. Navázání molekul kyslíku probíhá postupně a je spojeno s konformační změnou celé molekuly hemoglobinu. Dále hemoglobin odvádí z tkání CO₂ pomocí tzv. pufrčního mechanismu krve, kterým zároveň udržuje acidobazickou rovnováhu vnitřního prostředí. (Fábryová, 2015)

3.2 Hemoglobinopatie

Hemoglobinopatie je vrozené genetické onemocnění, které je způsobeno poruchou primární struktury globinových řetězců. Z globinových řetězců může být postižen jakýkoli řetězec, tzn. alfa, beta, delta, gama i epsilon. Nejčastější příčinou poruchy struktury bývá bodová mutace, ale vyskytují se i inserce, delece a jejich kombinace. Záměna aminokyselin v řetězcích může způsobit změny ve vlastnostech hemoglobinu. Existuje velké množství i neobjevených hemoglobinopatií, které jsou klinicky nevýznamné, protože nemají vliv na funkci hemoglobinu. Ty postihují především řetězce gama nebo delta. Pak ale existuje skupina hemoglobinopatií s různě závažnými klinickými projevy jako je hemolýza, polyglobulie či cyanóza, mezi které patří např. hemoglobinopatie S, C, D, E aj. Ty postihují především řetězce alfa a beta. (Penka, 2009)

3.2.1 Hemoglobinopatie S – srpkovitá anemie (HbS)

Jedná se o autozomálně recesivně dědičné hemolytické onemocnění, které se klinicky projeví u homozygotních nosičů abnormálního hemoglobinu S. Heterozygoti jen vzácně vyvolávají chorobné příznaky. U srpkovité anemie podléhá mutaci beta řetězec, kde v pozici 6 nahrazuje hydrofobní valin hydrofilní kyselinu glutamovou. Vznikne hemoglobin S, který je méně rozpustný ve vodě nežli hemoglobin A. Tato mutace má za následek polymerizaci molekul hemoglobinu, ke které dochází

po uvolnění kyslíku ve tkáních, následně deformaci krvinek a vznik tzv. srpkovitých erytrocytů. (Penka, 2009)

Nejdříve se objevuje lehká hemolytická anemie. U dětí se vyskytuje tzv. hand-foot syndrom, u kterého se objevují bolestivé otoky zadních částí rukou a chodidel. Postupem času dochází ke vzniku bolestivých krizí, které postihují větší kosti jak končetin, tak páteře a žeber. Krize mají za následek vznik malých infarktů, které mohou způsobit náhlou břišní příhodu nebo příhody v CNS. Dále mohou být postiženy i plíce. Rozpadem erytrocytů dochází k poklesu hemoglobinu. To vede k aktivaci erythropoézy a náhlému zvětšení sleziny. Lidé postižení touto nemocí jsou chráněni před onemocněním malárií. (Penka, 2009)

V krevním obraze jsou zvýšené hodnoty retikulocytů, často bývá velmi těžká anemie, kdy se hodnoty hemoglobinu pohybují v rozmezí 60 – 100 g/l, dále bývá zvýšený počet leukocytů s neutrofilii a zvýšený počet trombocytů. Kostní dřeň je hypercelulární. V krevním nátěru je přítomna anizocytóza, poikilocytóza, srpkovité erytrocyty, terčovité erytrocyty, Howell-Jollyho tělíka, ovalocyty, případně erytoblasty. V alkalické elektroforéze hemoglobinu je patrná frakce abnormálního HbS. (Penka, 2009)

3.2.2 Hemoglobinopatie C

Jedná se o autozomálně recesivní chorobu hemoglobinu, kde je zbytek kyseliny glutamové, která je na 6. pozici beta globinového řetězce, vyměněn za aminokyselinu lysin. Tím se také mění rozpustnost hemoglobinu. Hemoglobin začne tvořit krystaly, které vedou k deformaci krvinky a tím i ke zkrácení doby přežívání. Lidé s hemoglobinopatií C jsou také imunní proti malárii. V krevním obraze můžeme pozorovat lehce zvýšený počet retikulocytů a hodnoty MCV jsou v průměru kolem 72 fl. V krevním nátěru se objevují terčovité erytrocyty, sférocyty a lehká polychromazie. U erytrocytů se prokazuje snížená osmotická rezistence. V alkalické elektroforéze hemoglobinu nacházíme abnormální frakci HbC v oblasti výskytu HbA₂. (Penka, 2009)

3.2.3 Choroby hemoglobinu D

Jde o skupinu onemocnění, kdy se u pacientů vyskytují různé druhy hemoglobinu D. V alkalické elektroforéze má HbD stejný pohyb jako HbS, ale nedochází k srpkovatění erytrocytů. Má stejné vlastnosti jako hemoglobin G, proto

nelze tyto stavy rozlišit. Zbytky aminokyselin jsou nahrazeny jinými a to nejčastěji na beta řetězci, kde máme přibližně 11 variant HbD. Za nejznámější můžeme považovat mutaci, při které dochází k záměně kyseliny glutamové za glycin, a to v pozici 121. K dalším druhům patří HbD Los Angeles, HbD Punjab a HbG Philadelphia. Heterozygotní formy nevykazují žádné příznaky oproti formám homozygotním, kdy se vyskytuje lehká anemie a splenomegalie. (Penka, 2009)

3.2.4 Hemoglobinopatie E

Tato hemoglobinopatie je charakterizována záměnou kyseliny glutamové v pozici 26 v beta řetězci za aminokyselinu lysin. Jedná se o druhou nejčastější hemoglobinopatii, která je zvláště rozšířena v jihovýchodní Asii. Onemocnění je zásadní v kombinaci s HbS a s beta talasemií, kdy může dojít až ke klinickým projevům talasemie major, navíc se závažnými tromboembolickými komplikacemi. U homozygotů se projevuje lehkou anemií s mikrocytózou. Nalézáme i terčovité erythrocyty a hypochromii. V alkalické elektroforéze hemoglobinu je patrný abnormální band v oblasti HbA₂. U homozygotů tvoří frakce HbE až 99 %, zbytek připadá na HbF, HbA zcela chybí. U heterozygotů je frakce HbE zastoupena cca 30 – 35 %. (Penka, 2009)

3.2.5 Hemoglobin Lepore

Jedná se o autozomálně recesivní genetickou mutaci. Jde o fúzní hemoglobin, který vzniká cestou „crossing over“, kdy dochází k fúzi části genu pro delta řetězec s částí genu pro beta řetězec. Onemocnění je charakterizováno lehkou mikrocytózou a lehkou anemií. Při alkalické elektroforéze hemoglobinu se vyděluje abnormální band v oblasti výskytu HbS (cca 5 – 15 %), HbA₂ je v normě, mírně zvýšený může být HbF. (Hoyer, 2003; Fábryová, 20015)

3.2.6 Nestabilní hemoglobiny

Charakteristikou těchto vzácných autozomálně dominantních hemolytických onemocnění je přítomnost hemoglobinu, který má nižší stabilitu než hemoglobin normální. Nejčastěji dochází k poškození na beta řetězci, kde dochází k záměně hydrofobní aminokyseliny za hydrofilní a to především v oblasti tzv. hemové kapsy, což má za následek porušení vazby s globinem. Snadnou denaturací a precipitací hemoglobinů vznikají tzv. Heinzova tělíska. Známe více než 100 hemoglobinových

variant, které jsou všechny heterozygotní povahy. Projevy jsou různé, záleží na závažnosti a rozsahu onemocnění. (Penka, 2009)

Pro tato onemocnění jsou charakteristické zvýšené hodnoty retikulocytů, snížené hodnoty MCHC a snížený počet trombocytů. V krevním nátěru je anizocytóza, poikilocytóza, bazofilní tečkování, polychromazie, hypochromie, sférocyty, schistocyty. Je pozitivní test na přítomnost Heinzových tělísek a další testy na nestabilní hemoglobiny. (Penka, 2009)

Známe i další hemoglobinopatie, které jsou velmi vzácné, z nichž některé mohou zapříčinit cyanózu nebo polyglobulii. Většinou se jedná o autozomálně dominantní onemocnění, která jsou v homozygotní formě neslučitelná se životem. (Friedmann, 1994)

3.3 Talasemie

Talasemie je onemocnění charakterizované snížením syntézy jednoho z globinových řetězců v molekule hemoglobinu. V erythrocytech tak dochází k nedokonalé tvorbě hemoglobinu a dochází i ke snížení syntézy hemu. To má za následek hromadění železa v erythrocytech. Dále dochází k poškození membrány erythrocytů v důsledku nadprodukce globinových řetězců, u kterých není narušena jejich syntéza. (Pecka, 2006)

Za příčinu u alfa talasemií můžeme považovat bodovou mutaci, popřípadě delecii globinového genu. U beta talasemií se předpokládá redukce přepisu kódu DNA na mRNA. Ale tato tvrzení nejsou dosud potvrzená. (Pecka, 2006)

Talasemie rozdělujeme podle toho, jaký řetězec je postižen. Alfa a beta talasemie reprezentují jednu z nejčastějších skupin dědičných onemocnění. Delta talasemie je velmi vzácná, gama talasemie není u dospělého jedince významná. Dále talasemie rozdělujeme na major, intermedia a minor. Toto rozdělení je uspořádáno podle závažnosti klinických projevů, v důsledku postižení jedné či více alel. (Fairbanks, 1980)

3.3.1 Alfa talasemie

K syntéze alfa řetězců dochází pomocí 4 genů, které jsou umístěny na 16. chromozomu po 2 lokusech. Nedostatek alfa řetězců je kompenzován nadměrnou syntézou beta, gama a delta řetězců. (Pecka, 2006)

Rozlišujeme tyto typy alfa talasemií:

3.3.1.1 *Silent carrier (tiché nosičství)*

Chybí 1 gen pro syntézu alfa řetězců (- α / $\alpha\alpha$). U pacientů bývá přítomna mikrocytóza bez anemie. (Penka, 2009)

3.3.1.2 *Talasemie minor*

Chybí 2 geny pro syntézu alfa řetězců (-,-/ $\alpha\alpha$), (- α / $-\alpha^T$) nebo (-,-/ $\alpha\alpha^T$). V krevním obrazu se objevují zvýšené hodnoty retikulocytů, kostní dřeň je hyperplastická. V krevním nátěru můžeme pod mikroskopem pozorovat hypochromní mikrocyty. U pacientů se projevuje lehká anemie. (Penka, 2009)

3.3.1.3 *Choroba hemoglobinu H (HbH)*

Chybí 3 geny pro syntézu alfa řetězců, genotyp je většinou (-,-/ $-\alpha$) nebo (-,-/ $\alpha\alpha^T$), ale jsou možné i jiné varianty. V důsledku nedostatečné produkce α řetězců vzniká hemoglobin H. HbH je nestabilní a doba přežívání erytrocytů se zkracuje. (Penka, 2009)

Počty retikulocytů jsou zvýšeny na hodnoty 0,050 – 0,100, hemoglobin klesá na hodnotu kolem 110 g/l. V krevním nátěru můžeme vidět hypochromii, mikrocytózu, anizocytózu, terčovité erytrocyty, bazofilní tečkování. Jsou přítomna Heinzova tělíska, která jsou obsažena v 5 – 90 % erytrocytů. Pacienti trpí žloutenkou a splenomegalií. V elektroforéze Hb je u novorozenců přítomno 20 – 40 % hemoglobinu Bart's a u dospělých 5 – 30 % hemoglobinu H. (Penka, 2009)

3.3.1.4 *Hemoglobin Bart's (-,-/-,-)*

Chybí 4 geny pro syntézu alfa řetězců, proto se netvoří normální hemoglobiny. Hemoglobin Bart's (tetrametr γ_4) má vysokou afinitu ke kyslíku, což má za následek nedostatečný přísun kyslíku tkáním. Tento stav je neslučitelný se životem, proto v těchto případech dochází již k úmrtí plodu, tzv. hydrops fetalis. (Pecka, 2006)

3.3.2 Beta talasemie

Na 11. chromozomu můžeme najít 2 geny pro syntézu β řetězců. (Pecka, 2006) Při poruchách syntézy β řetězců vzniká relativní nadbytek α , γ a δ řetězců. (Friedmann, 1994)

3.3.2.1 *Talasemie minor* β^+/β

U talasemie minor je postižena jedna alela genu pro syntézu β řetězce. Tato forma má mírný klinický průběh, někdy se žádné symptomy nemusí projevit. Klinickým projevem je hypochromní anemie. U dětí se vzácně mohou objevit malé změny na lebce, které jsou znatelné pouze na rentgenovém snímku. Někdy můžeme nahmatat zvětšenou slezinu. Klinický obraz se může lišit u různých rasových skupin. (Penka, 2009)

V krevním obrazu nalézáme zvýšené počty erytrocytů a pokles hemoglobinu na hodnotu kolem 110 g/l. Kostní dřen je hypercelulární. V krevním nátěru pozorujeme hypochromní mikrocyty, poikilocyty, terčovité erytrocyty, bazofilní tečkování. V některých případech se objevuje zkrácené přežívání erytrocytů. V alkalické elektroforéze hemoglobinu bývá zvýšena koncentrace HbA2 nad 3,5 %, ale nikdy nepřesáhne hodnotu 10 %. (Hoyer, 2003)

3.3.2.2 *Talasemie intermedia* β^+/β^+ , β^0/β

U tohoto typu talasemie jsou klinické projevy mezi talasemií minor a major. Kostní dřeň je hyperplastická s neefektivní erytropoézou, což může vést k anemii, k dřeňové expanzi a extramedulární hematopoéze. V elektroforéze hemoglobinu bývá zvýšena koncentrace HbA2, která se pohybuje v rozmezí 3,5 – 10 % a koncentrace HbF. V krevním nátěru jsou přítomny hypochromní mikrocyty, poikilocyty, terčovité erytrocyty, bazofilní tečkování a anizocytóza. (Hoyer, 2003; Harano, 2004)

3.3.2.3 *Talasemie major* β^0/β^+

V tomto případě jsou postiženy obě alely genu pro syntézu β řetězce. Má vážný klinický průběh. Pacienti mají těžkou mikrocytární anemii, někteří potřebují krevní transfúzi. (Harano, 2004)

Nemocní většinou umírají poměrně mladí. Mají zhoršený a opožděný vývoj kostí, které jsou často deformované, bývá přítomna mentální retardace, hepatosplenomegalie. Nemocní jsou bledí, výraz jejich tváře je mongoloidní. Všechny

tyto projevy jsou způsobeny vysokou koncentrací hemoglobinu F, který má vysokou afinitu ke kyslíku. (Friedmann, 1994)

Fetální hemoglobin kolísá v rozmezí mezi 30 – 98 %. V krevním nátěru se objevují hypochromní mikrocyty, anizocytóza, poikilocyty, terčovité erythrocyty. V kostní dřeni jsou zmnoženy siderofágy a sideroblasty nad 65 %. (Friedmann, 1994)

3.3.2.4 Cooley's anemia β^0/β^0

U toho typu talasemie se nesyntetizuje žádný β globinový řetězec. Krevní transfúze se podávají hned po narození. (Harano, 2004) Úmrtí většinou nastává po prvním roce života. U nemocných se objevují zvýšené hladiny HbA2 a HbF. (Friedmann, 1994)

3.4 Diagnostika a laboratorní nález

Diagnostika hemoglobinopatií a talasemií se skládá z několika kroků. V prvním sledu hodnotíme parametry červeného krevního obrazu a morfologii červených krvinek v krevním nátěru. V případě mikrocytózy je potřeba v rámci diferenciální diagnostiky vyloučit sideropenickou anemii vyšetřením parametrů metabolismu železa. (Fábryová, 2015)

Dále je nutné zkontrolovat procentuální zastoupení jednotlivých druhů hemoglobinů nejlépe pomocí elektroforézy hemoglobinu na agarózovém gelu v alkalickém a/nebo kyselém prostředí či pomocí chromatografické metody. V případě podezření na přítomnost nestabilního hemoglobinu je vhodné provést i některý z testů stability hemoglobinu (test na přítomnost Heinzových tělísek, test tepelné stability hemoglobinu nebo izopropanolový test). Poté následuje PCR vyšetření, které pomůže daný typ onemocnění přesně zařadit na molekulární úrovni. (Fairbanks, 1980; Hoyer, 2003)

3.4.1 Krevní obraz

Pro komplexní diagnostiku je důležité vyšetřit parametry červeného krevního obrazu (RBC, Hb, Ht, MCV, RDW, MCH, MCHC), které mohou pomoci při klasifikaci onemocnění. Pro vyšetření krevního obrazu na analyzátoch krevních buněk se odebírá žilní krev do zkumavek obsahujících K_3EDTA nebo K_2EDTA . (Fairbanks, 1980)

Počty erytrocytů se nejčastěji stanovují pomocí dvou principů měření – impedančního a optického. Princip impedanční analýzy spočívá v tom, že buňky jsou pomocí hydrodynamické fokusace unášeny proudem vodivé nosné kapaliny do středu otvoru v měřicí kyvetě mezi dvě elektrody, na které je vložen stejnosměrný elektrický proud. Při průchodu buňky štěrbinou je vytlačen určitý objem elektrolytu, změní se elektrický odpor prostředí (impedance) a vznikne impedanční impuls, který je zaznamenán přístrojem jako amplituda. Tento záznam nám poskytne informace o kvantitě (počtu impulsů) a kvalitě (velikosti impulsů) buněk. Některé analyzátory přímo měří MCV (průměrná hodnota ze součtu velikosti impulsů) a dopočítávají hematokrit, jiné naopak. Optická analýza pracuje na principu průtokové cytometrie, kde interagují buňky s laserovým paprskem a měří se rozptýlené světlo nebo fluorescence. Buňky postupně procházejí průtokovou kyvetou pomocí hydrodynamické fokusace. (Penka, 2011; Pecka, 2010)

Koncentrace hemoglobinu se stanovuje spektrofotometricky pomocí modifikované referenční kyanmethemoglobinové metody. Ostatní parametry červené krevní řady jsou vypočtené. (Pecka, 2010; Penka, 2011)

Tabulka 1
Fyziologické hodnoty červeného krevního obrazu

Parametry KO	Muži	Ženy
RBC ($10^{12}/l$)	4,0 – 5,8	3,8 – 5,2
Ht	0,40 – 0,50	0,35 – 0,47
Hb (g/l)	135 – 175	120 – 160
MCV (fl)	82 – 98	82 – 98
MCH (pg)	28 – 34	28 – 34
MCHC (g/l)	320 – 360	320 – 360
RDW (%)	10 – 15,2	10 – 15,2

Zdroj: Česká hematologická společnost (www.hematology.cz)

Tabulka 2

Hodnoty červeného krevního obrazu u talasemií

TYP	β TALASEMIE		α TALASEMIE
POHLAVÍ	MUŽI	ŽENY	MUŽI A ŽENY
POČET	37	34	10
MCV (fl)	53 - 79 (62,5 ± 4,8)	51 - 72 (61,2 ± 4,8)	62 - 76 (67,8 ± 4,9)
RBC (10 ¹² /l)	4,97 - 7,54 (5,87 ± 0,57)	4,92 - 5,97 (5,46 ± 0,29)	4,82 - 6,75 (5,80 ± 0,59)
Hb (g/l)	95 - 161 (121 ± 15)	96 - 146 (110 ± 10)	103 - 136 (122 ± 10)
MCH (pg)	18 - 24 (20,7 ± 1,8)	19 - 24 (20,4 ± 1,4)	19 - 24 (21,2 ± 1,8)

Zdroj: Chrobák, 2001

3.4.2 Morfologie červených krvinek

Jedná se o mikroskopické vyšetření morfolgie červených krvinek i prekurzorů erytrocytární vývojové řady. Vyšetření se provádí z nátěrů periferní krve, v případně nutnosti i z kostní dřeně. Nátěry se obarví pomocí barviv May-Grünwald a Giemsa-Romanowsky (Pappenheimovo panoptické barvení). Morfologický nálezu odpovídá tíži talasemie nebo hemoglobinopatie. U lehkých forem může být morfolgie erytrocytů zcela normální nebo bývá přítomna pouze mikrocytóza, u závažnějších stavů nalézáme morfolgické abnormality uvedené podrobně v kapitolách 3.2 a 3.3. (Pecka 2006, Penka, 2009)

3.4.3 Analýza hemoglobinu

Pro další diagnostiku je důležité, aby se potvrdila přítomnost abnormálního hemoglobinu či zvýšená syntéza některého z fyziologických typů hemoglobinů. Orientační kvalitativní metody jsou založené na principu odolnosti membrány erytrocytů, které jsou vystaveny vlivu určitého prostředí (např. test osmotické rezistence erytrocytů), nebo se jedná o testy prokazující přítomnost nestabilního hemoglobinu v erytrocytech (test na přítomnost Heinzových tělísek, test tepelné stability hemoglobinu, izopropanolový test apod.). Nejčastěji používanými kvantitativními metodami jsou elektroforéza hemoglobinu, izoelektrická fokusace nebo chromatografie, nově i hmotnostní spektrofotometrie. Pro definitivní potvrzení patologického nálezu slouží molekulárně genetické metody. ((Harano, 2004; Fábryová, 2015)

3.4.3.1 Elektroforéza hemoglobinu

Princip metody spočívá v separaci jednotlivých hemoglobinů v elektrickém poli v závislosti na jejich elektrickém náboji. Vzorky hemoglobinů (hemolyzáty) jsou

aplikovány na acetylcelulóзовý nebo agarózový nosič (gel). Nosič se vzorky je umístěn do elektrického pole, kde dochází k pohybu hemoglobinů různou rychlostí podle typu jejich náboje. Tato rychlost je ovlivněna i hodnotou pH použitého pufru. Běžně se používá pufr o alkalickém pH 8,4 – 8,6, v němž má většina proteinů záporný náboj a putují tedy od katody k anodě. Postupně dochází k rozdělení jednotlivých hemoglobinů do pruhů (tzv. bandů), v alkalickém pH je možné rozdělení do 4 pruhů, v kyselém pH 6,0 – 6,2 až do 6 pruhů. Výsledné bandy se barvením vizualizují, suší a poté kvantitativně vyhodnocují pomocí denzitometru. (Engliš, 1992; Fábryová, 2015)

Odlišnou elektroforetickou metodou je tzv. kapilární elektroforéza, kdy dělení hemoglobinů probíhá ve speciálním elektrolytu v chlazené kapiláře a současně dochází k jejich kvantifikaci pomocí ultrafialového světla. Tato metoda je přesnější, avšak cenově náročnější. (Fábryová, 2015)

3.4.3.2 *Izoelektrická fokusace*

Hemoglobiny mohou mít celkový náboj kladný nebo záporný, ale při stejném pH jako je jejich izoelektrický bod jsou bez náboje a v elektrickém poli dojde k jejich zastavení a vydělení. K vytvoření těchto pH zón se využívá speciálních roztoků tzv. amfolytů. Tato metoda je velmi manuálně náročná, proto se využívá pouze pro kvalitativní průkaz abnormálních hemoglobinů ne pro jejich kvantifikaci. (Fábryová, 2015)

3.4.3.3 *Chromatografie*

Nejčastěji se využívá tzv. vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Princip metody spočívá v průchodu mobilní fáze (vzorku hemoglobinu) přes stacionární fázi (malé částice iontoměniče v koloně, např. DEAE celulóza). Rychlého průtoku přes kolonu se docílí pomocí vysokotlakého čerpadla, kdy malé částice iontoměniče v koloně umožňují dokonalejší rozdělení jednotlivých hemoglobinů. Frakce hemoglobinů se po opuštění kolony detekují buď kontinuálně spektrofotometricky nebo napojením na hmotnostní spektrofotometr. Tato metoda je velmi rychlá a má vysokou separační účinnost. (Fábryová, 2015)

3.4.3.4 *Molekulárně genetické metody*

Pro potvrzení či průkaz přítomnosti abnormálního hemoglobinu nebo talasemie se používá nejčastěji polymerázová řetězová reakce (PCR).

3.5 Léčba

U alfa i beta talasemie minor není léčba většinou nutná. Vždy je velmi důležité v diferenciální diagnostice vyloučit sideropenii, aby se předešlo nevhodnému podávání železa. (Penka, 2001)

U talasemií major nebo homozygotních forem hemoglobinopatií, kdy jsou klinické projevy závažnější, bývá uplatňována substituční léčba. Podávají se krevní převody, provádí se splenektomie, u velmi závažných stavů bývá indikována i transplantace kostní dřeně. Transfuze je nutná v případě, kdy se koncentrace hemoglobinu výrazněji sníží, většinou pod hodnotu 70 g/l. Časté opakované podávání transfuzí může vést k přetížení organismu železem, proto je vhodně zároveň podávat i chelatační léčbu (např. deferoxamin). Splenektomie přichází v úvahu ve fázi, kdy slezina začne být příliš aktivní a začne vychytávat červené krvinky. (Penka, 2001)

4 Praktická část

4.1 Charakteristika vyšetřovaného souboru

V bakalářské práci jsme retrospektivně vyhodnotili soubor 1686 osob (962 žen a 724 mužů) převážně z východočeského regionu, u kterých byla provedena v laboratoři IV. interní hematologické kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové v letech 1996 – 2015 elektroforéza hemoglobinu. Z tohoto souboru jsme vyloučili skupinu 147 těhotných žen z porodnicko-gynekologické kliniky, kterým byla odebrána fetální krev za účelem vyšetření vrozených vad plodu a 49 novorozenců a kojenců do 1 roku života, kteří mají fyziologicky zvýšenou koncentraci HbF a výsledný nálezn je pak vyšší hodnotou HbF ovlivněn. Konečný soubor, ze kterého jsme ještě vyřadili opakovaná vyšetření pacientů, čítal 1354 osob (643 mužů a 711 žen). Tyto osoby měly v KO (nejčastěji mikrocytární anemii) a byly testovány výhradně za účelem vyloučení či potvrzení talasemie nebo hemoglobinopatie. Popisná charakteristika souboru je uvedena v tabulce 3. Cílem práce bylo zmapovat záchyt hemoglobinopatií a talasemií ve sledovaném souboru a porovnat výskyt těchto onemocnění ve sledovaném regionu v celostátním i celosvětovém měřítku.

Tabulka 3
Popisná charakteristika souboru

Počet osob celkem (muži; ženy)	1354 (643; 711)
Celý soubor věk – medián; rozmezí	24; 1 – 91
Ženy věk – medián; rozmezí	24; 1 – 91
Muži věk – medián; rozmezí	24; 1 – 83

Zdroj: autor

4.2 Odběr krve a metodika

4.2.1 Odběr krve

Na vyšetření krevního obrazu, morfologie krevních buněk a elektroforézy hemoglobinu se odebírají 2 ml žilní krve do zkumavky s protisrážlivým činidlem K₃EDTA. Stabilita krve na vyšetření KO a morfologie erytrocytů je 5 hodin při teplotě 15 – 25 °C, stabilita krve na vyšetření ELFO Hb je až 5 dní při teplotě 2 – 8 °C. (Pecka, 2010; Manual Sebia)

4.2.2 Vyšetřovací metody

Při podezření na talasemii nebo hemoglobinopatii se v laboratoři IV. interní hematologické kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové standardně provádí vyšetření červeného KO, morfologie erytrocytů a elektroforéza hemoglobinu na agarózovém gelu v alkalickém pH.

4.2.2.1 Stanovení červeného krevního obrazu

Vyšetření červeného KO se u sledovaného souboru osob provádělo na analyzátoch XE-2100 a XE-5000 firmy Sysmex. Tyto analyzátory stanovují počty RBC impedančním nebo optickým principem popsáním v kapitole 3.4.1. Přímým měřeným parametrem je rovněž hematokrit. MCV je, stejně jako další parametry, vypočtený. (Pecka 2010) Pro standardní vyšetření KO analyzátor aspiruje cca 150 µl krve. V analyzátoru se krev rozdělí do 2 měřicích apertur – pro erytrocyty, trombocyty a jejich parametry, dále pro leukocyty a hemoglobin. V měřicí apertuře pro RBC a PLT se vzorek krve ředí diluentem a lyzují se zde leukocyty. Analyzátor zvládne vyšetřit až 150 vzorků na KO za hodinu. (www.sysmex.se)

Tabulka 4

Reagencie používané ke stanovení KO na analyzátoru XE-2100 a XE-5000

Reagencie	Množství	Použití reagentie
Cellpack	20 l	Trombocyty a erytrocyty
Cellsheath	20 l	Trombocyty a erytrocyty
Stomatolyser-FB	5 l	Bazofily
Stomatolyser-NR(L)	5 l	Normoblasty
Stomatolyser-NR(S)	43 ml x 3	Normoblasty
Sulfolyser	5 l	Hemoglobin
CellClean	50 ml	Čisticí reagentie
Stomatolyser-4DL	5 l	Klasifikace leukocytů
Stomatolyser-4DS	42 ml x 3	Klasifikace leukocytů

Reagencie se skladují při teplotě 18 až 25 °C. Exspirace je vždy vyznačena na jednotlivých reagentiích. (www.katalogsysmex.cz/)

4.2.2.2 Mikroskopické hodnocení morfologie erytrocytů

Zhotovení nátěru: Na podložní sklíčko se kápne kapka krve asi v ¼ od okraje. Roztěrovým sklíčkem se rozetře pod úhlem 30-40 stupňů. Nátěr by měl být rovnoměrný, přiměřeně dlouhý a tenký. Označí se identifikačními údaji pacienta a

nechá se zaschnout. Nátěry se musí zhotovit do 5 hodin po odběru krve. Zhotovují se buď ručně, nebo lze použít nátěrové a barvicí automaty. (Pecka 2010)

Tabulka 5
Postup panoptického barvení nátěrů

	Činidlo	Doba trvání
Fixace a barvení	May- Grünwald	5 – 10 minut
Oplach	Purifikovaná voda	30 s
Barvení	Giemsa-Romanowsky + fosfátový pufr pH 6,7 – 6,8 (ředění 1:10)	15 – 20 minut

Zdroj: Pecka, 2010

Hodnocení nátěru: Suchý nátěr se hodnotí pod mikroskopem za použití imerzních objektivů, u nichž je nutné použít imerzní olej. Nejdříve se posoudí kvalita nátěru, a to při 100-200násobném zvětšení. Morfologické hodnocení se provádí při 500 nebo 1000násobném zvětšení. Pro dosažení objektivního výsledku je důležité posunovat vzorek meandrovitým pohybem. Posuzují se zároveň i morfologické změny buněk. (Pecka 2010)

Tabulka 6
Anomálie červených krvinek

Odchytky ve velikosti	Mikrocyty, makrocyty
Odchytky tvaru	Kulatý terčik - planocyty, anulocyty, leptocyty, sférocyty, achromocyty Jiný tvar terčíku – ovalocyty, drepanocyty, poikilocyty, schistocyty, akantocyty, stomatocyty, echinocyty
Odchytky zbarvení	Hypochromie, anizochromie, polychromazie
Výskyt zrn, tělísek, prstenců	Bazofilní tečkování, Heinzova tělíska, Howell-Jollyho tělíska, Cabotovy-Schleipovy prstence
Jiné změny a formace	Karyorexe, penízkovatění, malarická plasmodia

Zdroj: Pecka, 2006

4.2.2.3 Elektroforéza hemoglobinu

Metoda slouží k vyšetření hemoglobinů v daném vzorku. Při testu dochází k rozdělení hemoglobinů na jednotlivých frakce podle jejich náboje v elektrickém poli při určitém pH (viz kapitola 3.4.3.1). Používá se přístrojové vybavení a reagentie od firmy Sebia. (Manual Sebia)

Tabulka 7
ELFO HGB – přístroje, pomůcky a reagensie

Reagensie	Přístroje a pomůcky
Hemolyzační roztok	Aplikátory
Agarozový gel	Zdroj napětí
Pufr Tris-barbital (pH 8,5)	Elektroforetická komora
Ředící roztok pro amidočerň	Nádobky a držáky gelů
Amidočerň	Sušička- inkubátor
Odbarvovací roztok	Denzitometr
Hb AFSC Control - kontrolní krev	Pipety
Fixační roztok	

Zdroj: Manual Sebia

Postup: Příprava hemolyzátu se provádí smícháním krve odebrané do K₃EDTA s komerčním hemolyzačním činidlem. Vzorek se hemolyzuje při laboratorní teplotě po dobu 5 minut. (Pecka, 2010)

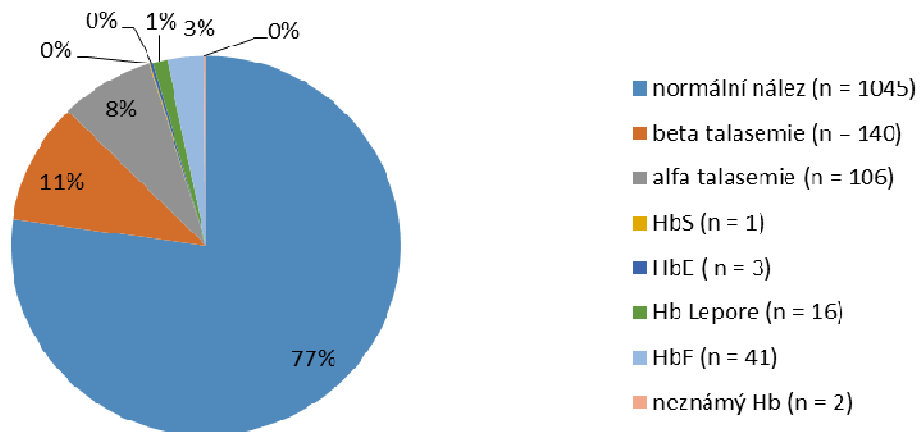
Na agarózový gel sycený v alkalickém pufru se nanesou vzorky hemolyzátu pomocí aplikátoru a gel se přenesse do migrační elektroforetické komory ve směru správné polaritě vyznačené na gelu. Hemoglobiny migrují v elektroforetické komoře 22 minut při napětí 90 V. Poté se gel vloží na 15 minut do fixačního roztoku a následně suší při teplotě 80°C. Po fixaci se gel barví v roztoku amido černí 4 minuty, poté následuje odbarvení, dokud není pozadí průhledné a bandy jednotlivých hemoglobinů nejsou ostře oddělené.

Následuje další sušení a fixace pomocí celofánu. Jednotlivé frakce Hb v hemolyzátu jsou na agarózovém gelu viditelné jako křivky zvonitého tvaru. Vyhodnocení probíhá denzitometricky pomocí počítačového software. Plocha píku je přímo úměrná relativnímu zastoupení jednotlivých frakcí Hb ve vzorku. (Manual Sebia)

4.3 Statistické vyhodnocení dat

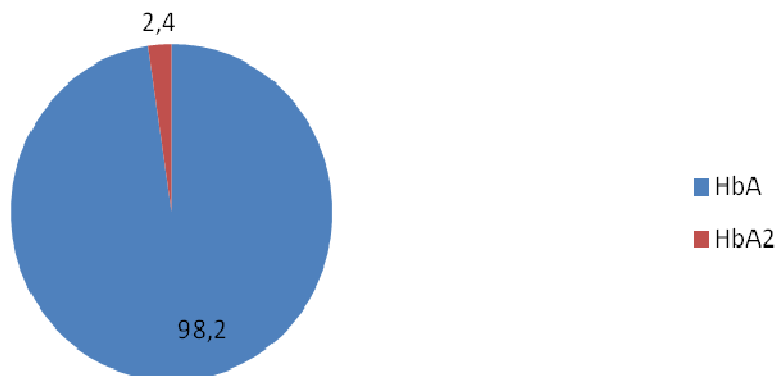
Statistické a grafické vyhodnocení bylo provedeno v programu Excel Microsoft Office 2007.

Procentuální zastoupení jednotlivých onemocnění v celém souboru (n = 1354)



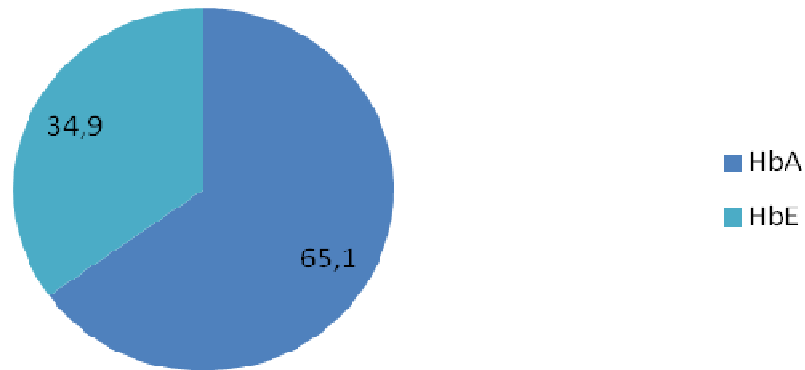
Graf 1: Procentuální zastoupení jednotlivých nálezů v našem souboru.
Zdroj: Autor

Normální nález Zastoupení Hb v procentech (n = 1045)



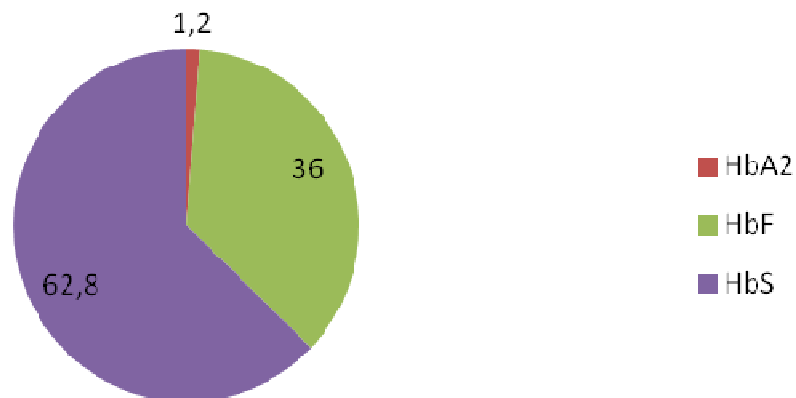
Graf 2: Průměrné procentuální zastoupení jednotlivých hemoglobinů u normálních nálezů v hodnoceném souboru
Zdroj: Autor

Hemoglobinopatie E - heterozygot Zastoupení Hb v procentech (n = 1)



Graf 3: Průměrné procentuální zastoupení jednotlivých hemoglobinů u heterozygotní formy hemoglobinopatie E u jednoho pacienta v hodnoceném souboru
Zdroj: Autor

Hemoglobinopatie S - homozygot Zastoupení Hb v procentech (n = 1)



Graf 4: Průměrné procentuální zastoupení jednotlivých hemoglobinů u homozygotní formy hemoglobinopatie S u jednoho pacienta v hodnoceném souboru
Zdroj: Autor

Hb Lepore

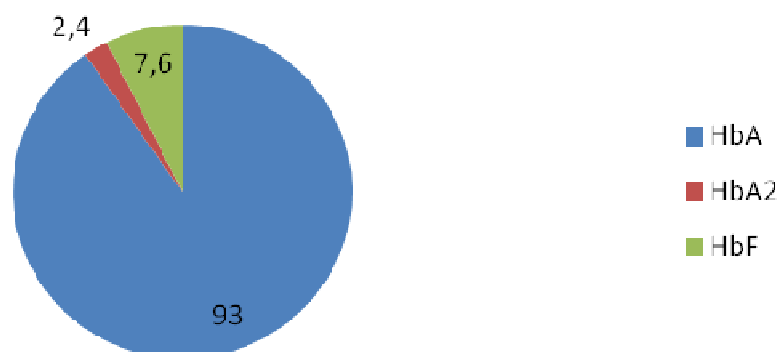
Zastoupení Hb v procentech (n = 16)



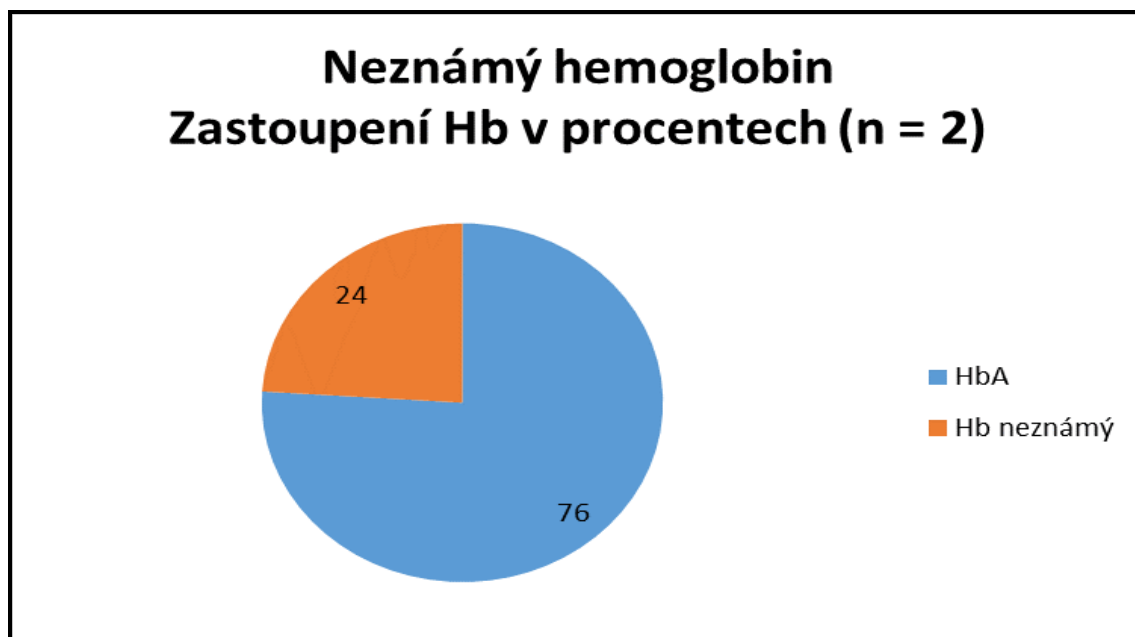
Graf 5: Průměrné procentuální zastoupení jednotlivých hemoglobinů u Hb Lepore v hodnoceném souboru; Zdroj: Autor

Hemoglobin fetální

Zastoupení Hb v procentech (n = 41)



Graf 6: Průměrné procentuální zastoupení jednotlivých hemoglobinů u pacientů se zvýšenou koncentrací HbF v hodnoceném souboru; Zdroj: Autor

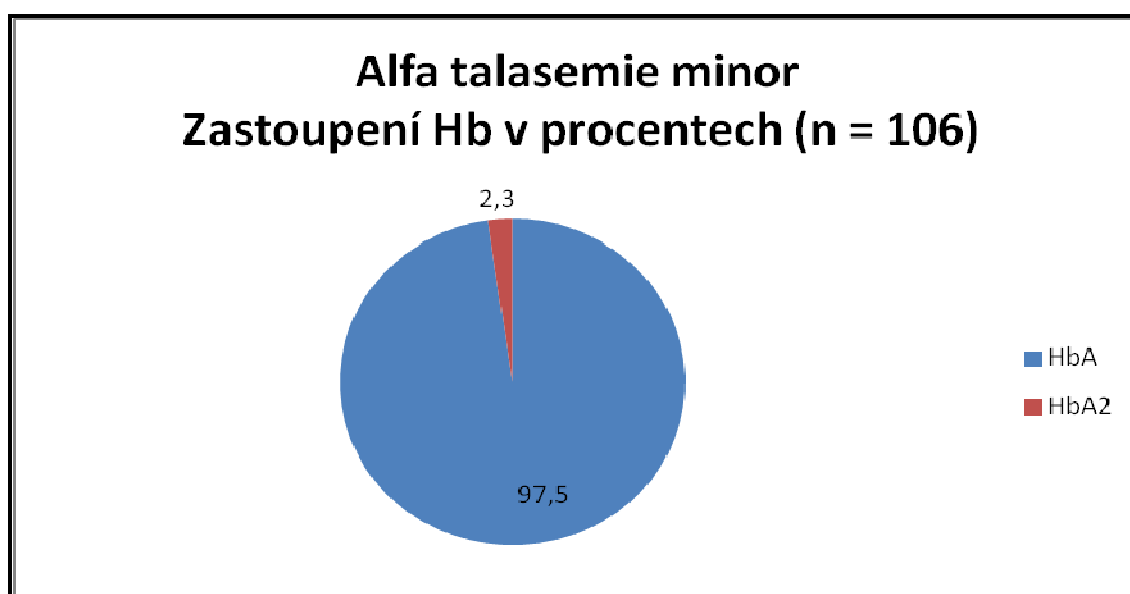


Graf 7: Průměrné procentuální zastoupení hemoglobinů u pacientů s nálezem neznámého hemoglobinu v hodnoceném souboru; Zdroj: Autor

Tabulka 8

Průměrná hodnota (rozmezí)	RBC ($10^{12}/l$)	MCV (fl)	HB (g/l)
Normální nález (n = 1045)	4,9 (1,37 – 8,08)	79,8 (52 – 157)	122,9 (31 – 198)
HbS (n = 1)	4,01	68,6	97
Hb Lepore (n = 16)	5,7 (3,96 – 6,81)	67,4 (61,9 – 77,2)	126,4 (79 – 148)
HbE (n = 3)	4,67	74,9	120
HbF (n = 41)	4,2 (1,83 – 6,85)	84,6 (65,8 – 116,1)	114 (24 – 171)
Hb neznámý (n = 2)	4,09	109,8	139,5

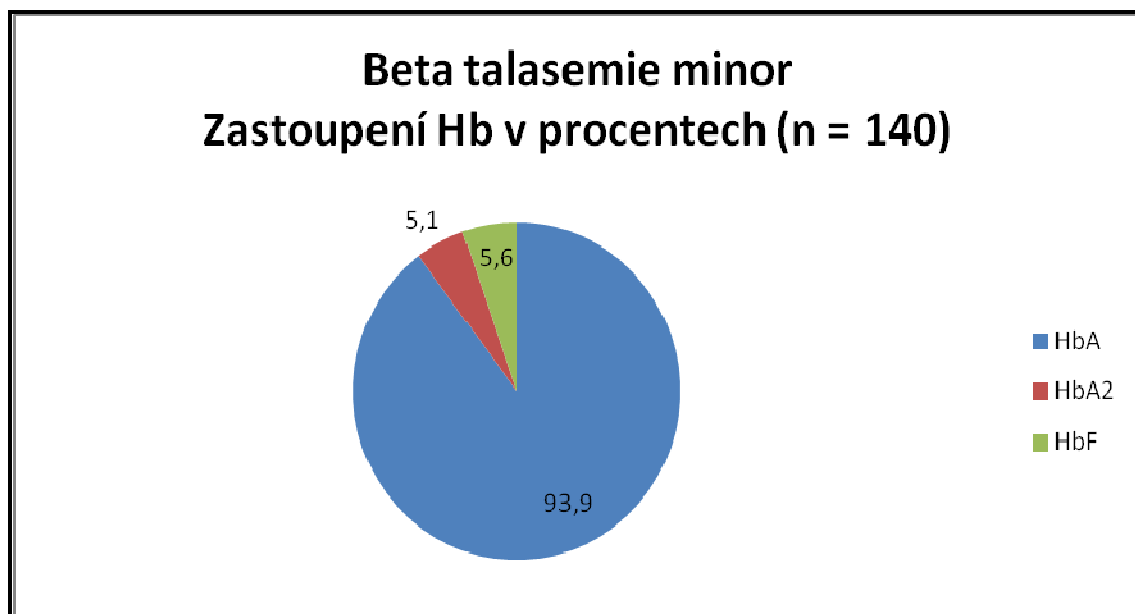
Zdroj: Autor



Graf 8: Průměrné procentuální zastoupení jednotlivých hemoglobinů u alfa talasemie minor v hodnoceném souboru; Zdroj: Autor

Tabulka 9

alfa talasemie	Muži (n =55)	Ženy (n = 51)	Muži i ženy (n = 106)
RBC (10 ¹² /l)	5,8 (3,91 - 7,29)	5,7 (3,71 - 8,04)	5,8 (3,71 – 8,04)
MCV (fl)	66,3 (55,5 - 76,1)	64,8 (53,5 - 74,5)	65,8(53,5 – 76,1)
HB (g/l)	125,9 (95 - 148)	122 (92 - 149)	125 (92 – 149)
HbA (%)	97,4 (96,6 - 98,6)	97,7 (96,6 - 98,9)	97,5 (96,6 – 98,9)
HbA2 (%)	2,4 (1,4 - 3,4)	2,3 (1,1 - 3,4)	2,3 (1,1 – 3,4)



Graf 9: Průměrné procentuální zastoupení jednotlivých hemoglobinů u beta talasemie minor v hodnoceném souboru; Zdroj: Autor

Tabulka 10

Beta alasemie	Muži (n =66)	Ženy (n = 74)	Muži i ženy (n = 140)
RBC (10 ¹² /l)	5,8 (4,26 – 6,99)	5,5 (3,45 – 6,79)	5,7 (3,45 – 6,99)
MCV (fl)	67,8 (54,9 – 78,8)	65,9 (52,9 – 78,8)	66,7 (52,9 – 78,8)
HB (g/l)	128 (92 - 150)	120 (86 - 142)	122,1 (86 – 150)
HbA (%)	93,8 (84,9 – 96,5)	93,7 (84,6 – 96,5)	93,9 (84,6 – 95,6)
HbA2 (%)	5,1 (3,5 – 8,1)	5,1 (3,5 – 7,3)	5,1 (3,5 – 8,1)

Zdroj: Autor

4.4 Kazuistiky

1. Kazuistika

Muž, ročník narození 1984, cizinec (Kuvaitan) žijící v České republice. 23. 6. 2016 byl vyšetřován a následně hospitalizován na neurologické klinice pro bolest zad. V osobní anamnéze má od dětství zvětšenou slezinu a občasné bolesti páteře a kyčlí především po zátěži. V rodině byla u 3 sourozenců diagnostikována srpkovitá anemie. Vstupně byla zjištěna leukocytóza, mikrocytární hypochromií anemie, trombocytopenie, zvýšený C reaktivní protein a koagulopatie (velmi suspektně při hemolytické krizi). Pacient byl zajištěn antibiotiky a analgetiky.

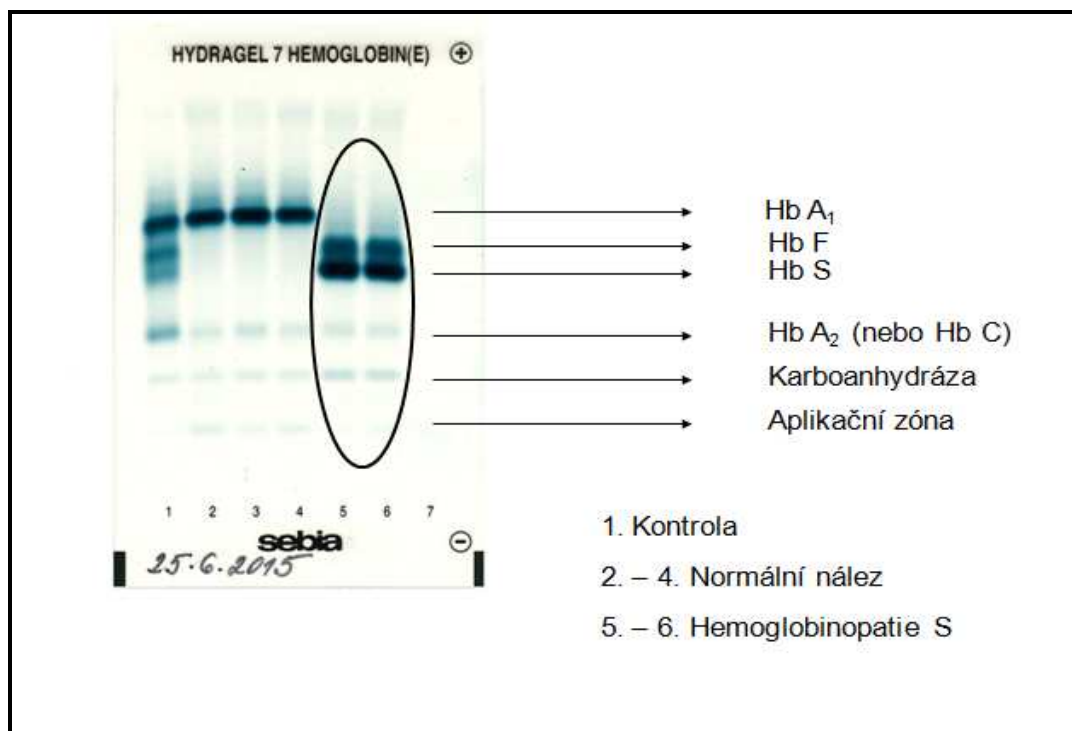
Pro progredující anemii a trombocytopenii byl přeložen na IV. interní hematologickou kliniku. Zde ordinováno vyšetření ELFO Hb a PCR pro potvrzení hemoglobinopatie. Toto vyšetření potvrdilo diagnózu homozygotní formy srpkovité anemie s akutně probíhající hemolytickou a kostní krizí. Pacient odmítl výměnné transfúze, podstoupil pouze 2 hemosubstituce s cílem snížit koncentraci HbS pod 40 % s dobrým efektem. Poté byl v uspokojivém stavu propuštěn. Dále bude sledován v ambulanci IV. IHK.

Tabulka 11

Laboratorní nález pacienta při IV. IHK příjmu a při propuštění

Laboratorní vyšetření		25. 6. 2015	10. 7. 2015
KO	WBC ($10^9/l$)	18,08	5,69
	Hb (g/l)	97	149
	MCV (fl)	68,6	77,5
	RDW (%)	14,9	23,3
	PLT ($10^9/l$)	43	584
DIF	Morfologie erytrocytů	Terčovité erytrocyty, schistocyty , ovalocyty, polychromazie přít. erytroblasty; posun doleva v rozpočtu WBC	Terčovité erytrocyty, schistocyty ojediněle , ovalocyty, polychromazie, anizocytóza, erytroblasty 0, normální rozpočet WBC
ELFO Hb	HbS (%)	62,8	37,4
	HbF (%)	36	14,7
	HbA (%)	1,2	46,6
	HbA ₂ (%)	0	1,3

Zdroj: záznamy laboratoře IV. IHK



Obrázek 2: ELFO hemoglobinu u pacienta při příjmu (zdroj: záznamy laboratoře IV. IHK)

Závěr

Pacient s homozygotní formou srpkovité anemie s klinickými projevy hemolytické a kostní krize.

2. Kazuistika

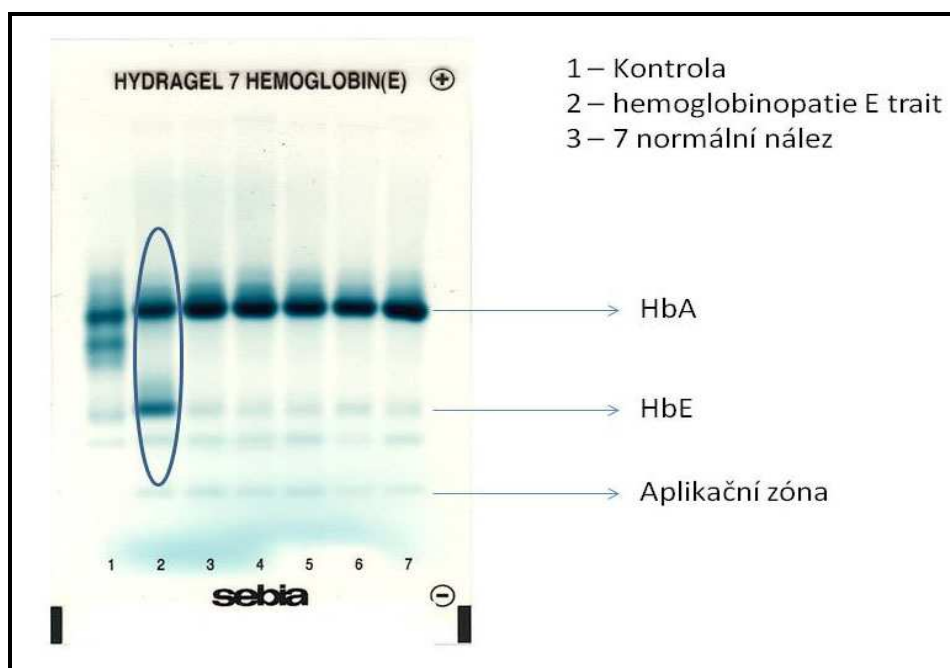
Žena, ročník narození 1971. V roce 1997 vyšetřena v ambulanci hematologické kliniky pro mikrocytózu nejasné etiologie. V ELFO Hb zjištěn abnormální band Hb v oblasti výskytu HbA₂, jednalo se heterozygotní formu hemoglobinopatie E. U pacientky byla navíc prokázána lehká forma von Willebrandovy choroby typu I bez spontánních krvácivých projevů. Pacientka byla v roce 2004 znovu vyšetřena před operací levého kolenního kloubu. Laboratorní nález byl prakticky stejný jako při prvním vyšetření. V současnosti dochází na kontroly do spádové hematologické ambulance.

Tabulka 12

Laboratorní nález pacientky v čase

Laboratorní vyšetření		1997	27. 7. 2004
KO	WBC ($10^9/l$)	14,7	10,38
	Hb (g/l)	135	123
	MCV (fl)	75,7	74,2
	RDW (%)	13,1	14,1
	PLT ($10^9/l$)	442	340
Funkční aktivita vWF (%)		50	49
ELFO Hb	HbE (%)	31,6	34,9
	HbA (%)	68,4	65,1

Zdroj: záznamy laboratoře IV. IHK



Obrázek 313: ELFO Hb – pacient s hemoglobinem E trait (pozice 2)

Zdroj: záznamy laboratoře IV. IHK

Závěr

Pacientka s heterozygotní formou hemoglobinopatie E, která se laboratorně projevuje lehkou makrocytózou, někdy spojenou s lehkou formou anemie, a klinicky bývá bez příznaků.

3. kazuistika

Žena, ročník narození 1990. V hematologické ambulanci sledována od dětství pro mikrocytární anémii. V roce 1998 je pacientce diagnostikována dominantní forma beta talasemie minor. Koncem roku 2015 přichází na oddělení urgentní medicíny s akutní cholecystitidou, předtím dlouhodobě subjektivně i objektivně bez potíží.

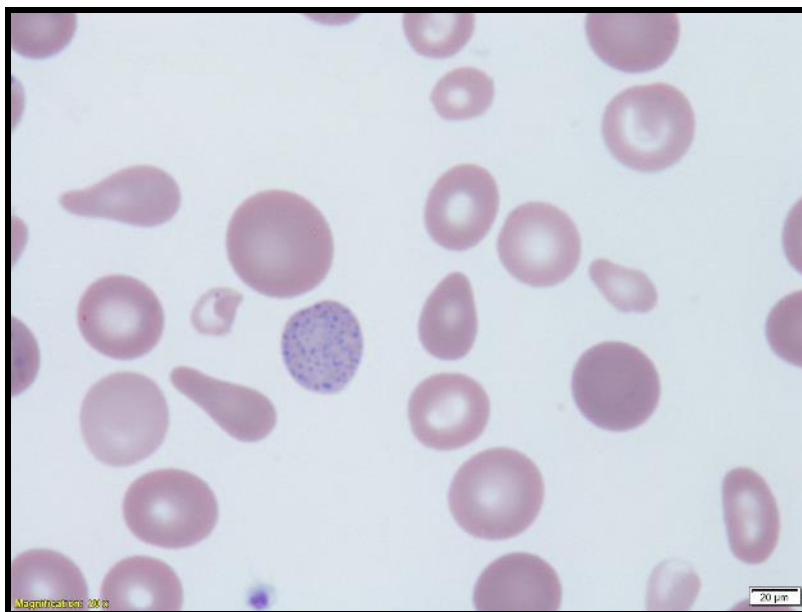
Laboratorní nález je prakticky neměnný. Po operaci je propuštěna domů, pravidelně dochází na kontroly do spádové hematologické ambulance.

Tabulka 13

Laboratorní nález pacientky s beta talasemií minor

Laboratorní vyšetření		Laboratorní hodnoty
KO	WBC ($10^9/l$)	5,7
	Hb (g/l)	89
	MCV (fl)	59,4
	RDW (%)	23,8
	PLT ($10^9/l$)	146
DIF	Morfologie erytrocytů	Terčovitě erytrocyty, schistocyty, ovalocyty, polychromazie, anizocytóza, poikilocytóza, bazofilní tečkování; normální rozpočet WBC
ELFO Hb	HbA (%)	84,6
	HbA ₂ (%)	4,4
	HbF (%)	11
Biochemické testy	Sérové Fe	V normě
	B12 a kyselina listová	V normě
	Bilirubin	Dlouhodobě zvýšen (25; 51 $\mu\text{mol/l}$)

Zdroj: záznamy laboratoře IV. IHK



Obrázek 4: Patologická morfologie RBC u pacientky s beta talasemií minor (zdroj: záznamy laboratoře IV. IHK)

Závěr

Pacientka s dominantní formou vrozené beta talasemie minor (viz obr. č. 5). Zkrácené přežívání RBC u tohoto stavu vede k mikrocytární anemii a subikteru, který

časem u pacientky vyústil v tvorbu žlučových kamenů a v akutní cholecystitidu. Opakovaně vyšetřené hodnoty KO jsou prakticky stacionární, biochemické vyšetření železa, vitamínu B12 a kyseliny listové je v normě.

4. kazuistika

Matka, ročník narození 1957, dcera, ročník narození 1982. Obě odeslány ze spádu na vyšetření mikrocytózy nejasné etiologie. Matka v minulosti sledována pro anemii, užívala intermitentně i železo. Po vyšetření ELFO Hb byl u obou žen zjištěn abnormální band Hb v oblasti výskytu HbS. Jednalo se o Hb Lepore. Stejný nález má i sestra matky. Obě ženy jsou v současnosti sledovány ve spádové hematologické ambulanci.

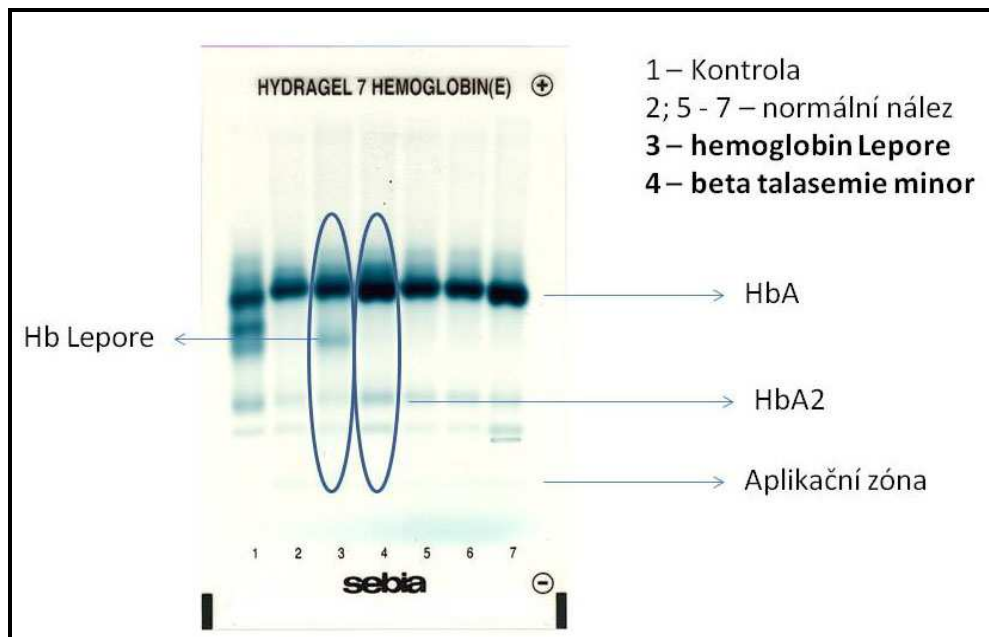
Tabulka 14
Laboratorní nález obou pacientek s Hb Lepore

Laboratorní vyšetření		Matka 26. 8. 2009	Dcera 3. 6. 2010
KO	WBC ($10^9/l$)	4,87	7,52
	Hb (g/l)	125	121
	MCV (fl)	67	68,2
	RDW (%)	11,1	15
	PLT ($10^9/l$)	191	228
ELFO Hb	HbA (%)	84,2	83,8
	HbA2 (%)	2	2,1
	Hb Lepore (%)	13,8	14,1

Zdroj: záznamy laboratoře IV. IHK

Závěr

Obě pacientky s výskytem abnormálního Hb typu Lepore (viz obr. č. 5). Onemocnění nemá žádné klinické projevy, laboratorně se projevuje makrocytózou, velmi často bez anémie.



Obrázek 5: ELFO Hb – pacient s Hb Lepore (pozice 3) a s beta talasemií minor (pozice 4) Zdroj: záznamy laboratoře IV. IHK

5 Diskuze a závěr

Statisticky a graficky jsme zpracovali celý soubor pacientů vyšetřených pro podezření na hemoglobinopatii nebo talasemii. Z grafu 1 je patrné rozložení všech vrozených onemocnění zachycených v našem hodnoceném souboru. Procento zachycených vrozených onemocnění jsme porovnali v celostátním i celosvětovém měřítku. V našem souboru bylo 77 % osob tzv. normálních bez patologického nálezu v ELFO Hb, jednalo se nejčastěji o pacienty se sideropenickou anémií, ale mohlo jít i o pacienty s kombinací sideropenie a alfa talasemie, které ELFO Hb neodhalí.

U 11 % osob jsme prokázali přítomnost beta talasemie minor (zvýšený HbA₂) a u 8 % osob v souboru jsme vyslovili podezření alfa talasemie minor. U těchto osob byla přítomna výrazná mikrocytóza, v některých případech i mikrocytární anémie a většinou i erytrocytóza, ELFO Hb bylo normální, všechny osoby však měly záporný diskriminační index (Fairbenks, 1980), který pomáhá rozlišit sideropenii od talasemie. K definitivnímu potvrzení alfa talasemie bychom však museli u těchto osob provést sekvenační analýzu. 3 % osob měla vyšší HbF z důvodu přidruženého onemocnění nebo tzv. perzistence HbF. Tento soubor jsme však blíže nezkoumali. U 1 % osob byla prokázána přítomnost Hb Lepore. Pouze u jednotlivců jsme prokázali další hemoglobinové mutace. Zachytili jsme 1 pacienta s homozygotní hemoglobinopatií S a 1 pacientku s homozygotní formou HbE, v obou případech se jednalo o cizince. Dále jsme prokázali ve 2 případech výskyt heterozygotní hemoglobinopatie E. Ve všech těchto případech byla v KO přítomna mikrocytóza. Ve 2 případech (matka a syn) jsme odhalili v elektroforéze přítomnost 2 atypických bandů Hb (v oblasti výskytu HbA₂ a v oblasti mezi výskytem HbA₂ a HbS). Obě osoby měly makrocytózu bez anémie. O dovyšetření této mutace nemáme zprávy, protože pacienti byli z jiného regionu.

V grafech 2 – 9 je znázorněno procentuální rozložení jednotlivých fyziologických i patologických hemoglobinů u těchto skupin pacientů ve sledovaném souboru. V tabulkách 8 – 9 jsou ještě doplněny údaje červeného KO.

Pro lepší názornost jsme formou kazuistik prezentovali průběh některých z těchto onemocnění u našich pacientů.

Podle výsledků je v našem regionu incidence výskytu alfa i beta talasemie 2 případy na 10 000 obyvatel, hemoglobinu Lepore dokonce 3 případy na 100 000 obyvatel. Incidence výskytu talasemií v Evropě je obdobná (1/10 000), častější výskyt talasemií je v oblasti Středozemního moře a Afriky 10 – 30 %. Hemoglobin Lepore se vyskytuje zejména v oblasti jihovýchodní Asie (cca 2 – 5 %). (Fairbanks, 1980) Záchyt HbS či homozygotní formy HbE byl v našem souboru raritní. HbS se nejvíce vyskytuje v Africe nebo Americe, kde až 8 % obyvatel má tuto mutaci v jednom ze dvou beta genů. (<http://www.labtestsonline.cz/>; Williams, 2012) Nejvyšší výskyt HbE je v jihovýchodní Asii, kdy se udává četnost výskytu v populaci mezi 3 – 30 %. (Hemoglobin E; Fairbanks, 1980)

Obecně není výskyt těchto onemocnění v naší populaci vysoký. Nejčastěji se setkáváme s alfa nebo beta talasemií minor. Vždy je nutné v případě záchytu mikrocytózy (v některých případech i mikrocytární anémie) nejasné etiologie na tyto stavy pomýšlet, provést diferenciální diagnostiku, aby tito pacienti nebyli zbytečně neléčeni a přetěžováni železem. Výskyt dalších hemoglobinopatií je vyloženě raritní, některé jsme prokázali pouze u cizinců (výskyt homozygotní formy HbS a HbE). Vzhledem k migraci obyvatelstva převážně z regionů s vysokým výskytem talasemií a hemoglobinopatií však můžeme očekávat, že i v naší populaci dojde k častějšímu výskytu těchto onemocnění.

6 Zkratky

CNS – centrální nervová soustava

CO₂ – oxid uhličitý

DNA – deoxyribonukleová nukleová kyselina

DEAE celulóza – dietylaminoethylcelulóza

ELFO Hb – elektroforéza hemoglobinu

FI - fentolitr

g/l – gram na litr

Hb – hemoglobin

HbA₂ – hemoglobin A₂

HbD – hemoglobin D

HbH – hemoglobin H

HbF – fetální hemoglobin

HbS – hemoglobin S

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Ht – hematokrit

IHK – interní hematologická klinika

KO – krevní obraz

MCH - průměrné množství hemoglobinu v erytrocytu

MCHC – střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytech

MCV – střední objem erytrocytu

MPV – střední objem krevní destičky

mRNA – ribonukleová kyselina (mediátorová)

PCR – polymerázorvá řetězová reakce

Pg – pikogramy

pH – potenciál vodíku

RBC – červené krvinky

RDW – distribuční šíře erytrocytů

RTG – rentgenové záření

vWF – von Willebrandův faktor

WBC – bílé krvinky

7 Seznamy

7.1 Seznam tabulek

Tabulka 1: Fyziologické hodnoty červeného krevního obrazu.....	str.18
Tabulka 2: Hodnoty červeného krevního obrazu u talasemií.....	str.19
Tabulka 3: Popisná charakteristika souboru.....	str. 22
Tabulka 4: Reagencie používané ke stanovení KO.....	str. 23
Tabulka 5: Postup panoptického barvení nátěru.....	str. 24
Tabulka 6: Anomálie červených krvinek.....	str. 24
Tabulka 7: ELFO HGB – přístroje, pomůcky a reagencie.....	str. 25
Tabulka 8:.....	str. 29
Tabulka 9:.....	str. 30
Tabulka 10:.....	str. 30
Tabulka 11: Laboratorní nález pacienta při IV. IHK příjmu a při propuštění.....	str. 31
Tabulka 12: Laboratorní nález pacientky v čase.....	str. 33
Tabulka 13: Laboratorní nález pacientky s beta talasemií minor.....	str. 34
Tabulka 14: Laboratorní nález obou pacientek s Hb Lepore.....	str. 35

7.2 Seznam grafů

Graf 1: Procentuální zastoupení jednotlivých nálezů v našem souboru.....	str. 26
Graf 2: Průměrné procentuální zastoupení jednotlivých hemoglobinů u normálních nálezů v hodnoceném souboru.....	str. 26
Graf 3: Průměrné procentuální zastoupení jednotlivých hemoglobinů u heterozygotní formy hemoglobinopatie E u jednoho pacienta v hodnoceném souboru.....	str. 27
Graf 4: Průměrné procentuální zastoupení jednotlivých hemoglobinů u homozygotní formy hemoglobinopatie S u jednoho pacienta v hodnoceném souboru.....	str. 27
Graf 5: Průměrné procentuální zastoupení jednotlivých hemoglobinů u Hb Lepore v hodnoceném souboru.....	str. 28
Graf 6: Průměrné procentuální zastoupení jednotlivých hemoglobinů u pacientů se zvýšenou koncentrací HbF v hodnoceném souboru.....	str. 28
Graf 7: Průměrné procentuální zastoupení hemoglobinů u pacientů s nálezem nezámého hemoglobinu v hodnoceném souboru.....	str. 29
Graf 8: Průměrné procentuální zastoupení jednotlivých hemoglobinů u alfa talasemie minor v hodnoceném souboru.....	str. 29
Graf 9: Průměrné procentuální zastoupení jednotlivých hemoglobinů u beta talasemie minor v hodnoceném souboru.....	str. 30

7.3 Seznam obrázků

Obrázek 1: Molekula hemoglobinu.....	str. 10
Obrázek 2: ELFO hemoglobinu u pacienta při příjmu	str. 32
Obrázek 315: ELFO Hb – pacient s hemoglobinem E trait (pozice 2).....	str. 33
Obrázek 4: Patologická morfologie RBC u pacientky s beta talasemií minor.....	str. 34

Obrázek 5: ELFO Hb – pacient s Hb Lepore a s beta talasemií minor.....str. 36

8 Seznam literatury

Česká hematologická společnost ČLS JEP. [online]. Vystaveno 2015. [cit.2016-04-12]. Dostupné z:

http://www.hematology.cz/doporuceni/laboratorni_sekce/referencni_meze.php

Engliš, M. *Novinky v medicíně 55: Interpretace elektroforézy plazmatických bílkovin v agarózovém gelu*. 1. vydání. Praha: Avicenum, 1992. 48 s. ISBN 80-201-0170-5

FÁBRYOVÁ Viera, BOŽEK Peter, KOLLÁROVÁ Andrea. *Hemoglobin a jeho choroby*. Bratislava: A-medi management, s.r.o., 2015, 157 s. ISBN 978-80-971836-4-6

FAIRBANKS Virgil F. *Hemoglobinopathies and Thalassemias: Laboratory Methods and Clinical Cases*. NY: B.C. Decker, 1980, 298 s. ISBN 0-913258-75-X

FRIEDMANN Bedřich, VAŇÁSEK Jaroslav. *Hematologie v praxi*. Praha: Galén, 1994, 368 s. ISBN 80-85824-05-1

HARANO Teruo. *Hemoglobinopathy*. Japan, Sysmex corporation: Kobe 2004, 131 s.

Hemoglobin E. [online]. [cit.2016-08-12]. Dostupné z: <http://www.sickle-thal.nwlh.nhs.uk/blood/HaemoglobinE.aspx>

HOYER James D., KROFT Steven H. *Color Atlas of Hemoglobin Disorders. A Compendium Based on Proficiency Testing*. Northfield, IL, College of American Pathologists, 2003. 324 s. ISBN 0-930304-80-2

CHROBÁK, Ladislav: *Mikrocytární a hypochromní anémie*. Vnitřní lékařství, 2001. 47, s. 166 – 174. ISSN 0042-773X

Manual Sebia K20 [online]. [cit.2016-04-12]. Dostupné z: http://users.teiath.gr/petef/Web_Lessons/TEI_Anartiseis/Sebia_electrophoresis_ALP_Applicator.pdf

PECKA Miroslav. *Laboratorní hematologie v přehledu. Buňka a křevtvorba*. Český Těšín: FINIDR, 2002. 160 s. ISBN 80-86682-01-3

PECKA Miroslav. *Laboratorní hematologie v přehledu. Fyziologie a patofyziologie krevní buňky*. Český Těšín: FINIDR, 2006. 304 s. ISBN 80-86682-02-1

PECKA Miroslav: *Praktická hematologie. Laboratorní metody*. Český Těšín: FINIDR, 2010, 343 s. ISBN 978-80-903871-9-5

PENKA, Miroslav, BULIKOVÁ Alena, MATÝŠKOVÁ Miloslava, ZAVŘELOVÁ Jiřina. *Hematologie I. Neonkologická hematologie*. Praha: Grada, 2001. 201 s. ISBN 80-247-0023-9

PENKA, Miroslav, BULIKOVÁ Alena. *Neonkologická hematologie*. 2. vyd. Praha: Grada, 2009. 240 s. ISBN 978-80-247-2299-3

PENKA Miroslav, TESAŘOVÁ Eva. *Hematologie a transfuzní lékařství I*. Praha: Grada, 2011. 421 s. ISBN 978-80-247-3459-0

Williams T.N., Weatherall D.J. Cold spring Harbour Perspective in medicine. World distribution population genetics and Health Burden of the Hemoglobinopathies.[online]. Vystaveno 2012.[cit.2016-04-12]. Dostupné z: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/2/9/a011692.full.pdf+html>

www.katalogsystemex.cz/: [online].[cit.2016-08-12]. Dostupné z: <http://www.katalogsystemex.cz/katalog/kategorie/xe-5000>

<http://www.labtestsonline.cz/>: [online].[cit.2016-08-12]. Dostupné z: <http://www.labtestsonline.cz/tests/HemoglobinVariants.html?idx=2>

www.sysmex.se [online].[cit.2016-08-12]. Dostupné z: <http://www.sysmex.se/products/product-singleview/xe-5000-302.html>