



**ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE**  

---

**FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ**  
**Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**

**Význam laboratorní diagnostiky RET-He  
(ekvivalent hemoglobinu v retikulocytech)  
a jeho přínos pro diagnostiku anémie  
z nedostatku železa**

**The importance of laboratory determination  
of RET-He (reticulocyte haemoglobin  
equivalent) and the benefit for the diagnosis  
of iron deficiency anemia**

Bakalářská práce

Studijní program: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

Autor bakalářské práce: Simona Sýkorová

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Václava Mašková, EuSpLM

---

**Kladno 2023**

## I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Sýkorová** Jméno: **Simona** Osobní číslo: **491621**  
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**  
Garantující katedra: **Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**  
Studijní program: **Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**

## II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

**Význam laboratorní diagnostiky RET-He (ekvivalent hemoglobinu v retikulocytech) a jeho přínos pro diagnostiku anémie z nedostatku železa**

Název bakalářské práce anglicky:

**The Importance of Laboratory Determination of RET-He (Reticulocyte Haemoglobin Equivalent) and the Benefit for the Diagnosis of Iron Deficiency Anemia**

Pokyny pro vypracování:

Předmětem bakalářské práce bude laboratorní diagnostika novějšího rozšířeného parametru krevního obrazu RET-He (ekvivalent hemoglobinu v retikulocytech) a jeho možný přínos pro léčbu anémií z nedostatku železa. RET-He je ukazatelem hemoglobinizace červených krvinek, a proto i cenným parametrem při posouzení efektivity léčby anémií. V teoretické části bakalářské práce bude popsán význam hematologického stanovení rozšířeného parametru červené řady krevního obrazu RET-He jako citlivého parametru pro diagnostiku často latentních sideropenických anémií.

Úkolem bakalářské práce bude najít a ověřit vztahy RET-He k vybraným laboratorním parametrům pro vyšetření deficitu železa a zhodnocení zásobního železa (HGB, MCHC, MCV, Fe, transferin a jeho saturace, ferritin atd.). Tyto vztahy budou dále graficky zpracovány, odvozena možná pravidla a získané závěry porovnány s dostupnou literaturou.

Seznam doporučené literatury:

- [1] UÇAR, Mehmet Ali, Mesude FALAY, Simten DAĞDAS, Funda CERAN, Selin Merih URLU a Gülsüm ÖZET, The importance of RET-He in the diagnosis of iron deficiency and iron deficiency anemia and the evaluation of response to oral iron therapy, online, Journal of Medical Biochemistry, ed. 2019, ročník 38, číslo 4, Přístupné z: <https://doi.org/10.2478/jomb-2018-0052>, ISSN 1452-8266
- [2] TOKI, Yasumichi, Katsuya IKUTA, Yoshie KAWAHARA, et al., Reticulocyte hemoglobin equivalent as a potential marker for diagnosis of iron deficiency, online, International Journal of Hematology, ed. 2017, ročník 106, číslo 1, Přístupné z: <https://doi.org/10.1007/s12185-017-2212-6>, ISSN 0925-5710
- [3] TIWARI, Aseem K, Gunjan BHARDWAJ, Dinesh ARORA, et al., Applying newer parameter Ret-He (reticulocyte haemoglobin equivalent) to assess latent iron deficiency (LID) in blood donors-study at a tertiary care hospital in India, online, Vox Sanguinis, ed. 2018, ročník 113, číslo 7, Přístupné z: <https://doi.org/10.1111/vox.12700>, ISSN 0042-9007

Jméno a příjmení vedoucí(ho) bakalářské práce:

**RNDr. Václava Mašková**

Jméno a příjmení konzultanta(ky) bakalářské práce:

Datum zadání bakalářské práce: **20.09.2022**

Platnost zadání bakalářské práce: **22.09.2024**

doc. Mgr. Zdeněk Hon, Ph.D.  
vedoucí katedry

prof. MUDr. Jozef Rosina, Ph.D., MBA  
děkan

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Význam laboratorní diagnostiky RET-He (ekvivalent hemoglobinu v retikulocytech) a jeho přínos pro diagnostiku anémie z nedostatku železa vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Kladně dne 18.05.2023

.....  
Simona Sýkorová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Velice ráda bych touto cestou poděkovala paní RNDr. Václavě Maškové, EuSpLM za odborné vedení mé bakalářské práce, poskytnutí odborných materiálů, cenné rady, vstřícnost, bezmeznou trpělivost a především za čas, který mi vždy s ochotou věnovala. Mé poděkování rovněž patří paní Ing. Ludmile Landové Ph.D. za pomoc při statistickém zpracování dat, které mi pomohlo tuto práci zkompletovat. Dále bych chtěla poděkovat panu primáři plk. gšt. MUDr. Miloši Bohoňkovi Ph.D. za to, že mi umožnil realizovat praktickou část bakalářské práce na Oddělení hematologie a krevní transfuze Ústřední vojenské nemocnice – Vojenské fakultní nemocnice Praha. Na závěr děkuji také zaměstnancům Oddělení klinické biochemie a Oddělení hematologie a krevní transfuze ÚVN za spolupráci při sběru dat.

## **ABSTRAKT**

Předmětem této bakalářské práce je stanovení nového rozšířeného parametru krevního obrazu RET-He (ekvivalent hemoglobinu v retikulocytech) a jeho možný přínos pro diagnostiku anémie z nedostatku železa.

Teoretická část začíná popisem anémií, a to především jejich definicí, diagnostikou a klasifikací. Uveden je také fyziologický metabolismus železa v lidském organismu, a s tím spojený jeho deficit, který narušuje erytropoézu a výsledkem může být až rozvoj sideropenické anémie. Dále se teoretická část věnuje parametru RET-He. Jsou rozebrány výhody a nevýhody jeho stanovení ve srovnání s běžně užívanými laboratorními ukazateli metabolismu železa. Popsány jsou též i jiné významné parametry, které jsou od ekvivalentu hemoglobinu v retikulocytech odvozené, čímž podporují jeho klinickou užitečnost.

Praktická část je zaměřena na laboratorní diagnostiku RET-He a vybraných hematologických a biochemických parametrů změřených ze vzorku krve na automatickém analyzátoru Sysmex XN-1000, Sysmex XN-1500 DI a cobas® pro.

Naměřené výsledky 979 pacientů jsou zpracovány pomocí deskriptivní statistiky a prezentovány formou tabulek a grafů porovnávajících soubory dat jednotlivých parametrů. K posouzení jejich vzájemného vztahu byly použity Spearmanovy korelace, které ukazují, že existuje statisticky významná korelace RET-He s MCV a MCH, ale pro vztah těchto parametrů nelze v naší směsné populaci vyvodit obecně platná pravidla. Získané závěry jsou porovnány s údaji publikovanými v dostupné literatuře.

### **Klíčová slova**

Ekvivalent hemoglobinu v retikulocytech (RET-He); retikulocyty; sideropenická anémie; železo; diagnostika anémií; fluorescenční průtoková cytometrie

## **ABSTRACT**

The aim of this bachelor thesis is the determination of a new extended blood count parameter RET-He (reticulocyte haemoglobin equivalent) and its possible benefit for the diagnosis of iron deficiency anemia.

The theoretical part begins with a description of anemias, especially their definition, diagnosis and classification. The physiological metabolism of iron in the human body and the associated iron deficiency, which impairs erythropoiesis and may result in the development of sideropenic anemia, are also presented. Furthermore, the theoretical part deals with the RET-He parameter. The advantages and disadvantages of its determination compared to commonly used laboratory indicators of iron metabolism are discussed. Other important parameters that are derived from the reticulocyte haemoglobin equivalent are also described, supporting its clinical utility.

The practical part is focused on laboratory diagnosis of RET-He and selected hematological and biochemical parameters measured from blood sample on automatic analyzer Sysmex XN-1000, Sysmex XN-1500 DI and cobas® pro.

The measured results of 979 patients are processed using descriptive statistics and presented in the form of tables and graphs comparing data sets of individual parameters. Spearman's correlations were used to assess their relationship, showing that there is a statistically significant correlation of RET-He with MCV and MCH, but no generally valid rules can be derived for the relationship of these parameters in our mixed population. The obtain conclusions are compared with data published in the available literature.

## **Keywords**

Reticulocyte haemoglobin equivalent (RET-He); reticulocytes; sideropenic anemia; iron; diagnosis of anemia; fluorescence flow cytometry

## Obsah

1	Úvod.....	10
2	Cíle práce .....	11
3	Přehled současného stavu.....	12
3.1	Anémie .....	12
3.1.1	Diagnostika anémií.....	12
3.1.2	Etiopatogenetická klasifikace.....	16
3.2	Metabolismus železa .....	17
3.2.1	Absorpce .....	17
3.2.2	Recirkulace železa.....	19
3.2.3	Transport .....	19
3.2.4	Úložiště .....	20
3.2.5	Regulace metabolismu železa .....	20
3.3	Sideropenická anémie.....	21
3.3.1	Příčiny vzniku .....	22
3.3.2	Stupně nedostatku železa .....	23
3.3.3	Klinické příznaky .....	24
3.3.4	Diagnostika .....	24
3.3.5	Léčba .....	26
3.4	Ekvivalent hemoglobinu v retikulocytech (RET-He).....	27
3.4.1	Retikulocyty .....	28
3.4.2	Stanovení RET-He.....	30
3.4.3	Výhody a nevýhody .....	30
3.4.4	Absolutní a funkční nedostatek železa .....	31
3.4.5	ICIS .....	32
3.4.6	Delta-He .....	32
4	Metodika .....	34

4.1	Definice souboru .....	34
4.2	Preanalytická fáze.....	34
4.2.1	Příprava pacienta před vyšetřením .....	34
4.2.2	Odběr krve.....	35
4.2.3	Transport .....	36
4.2.4	Příjem vzorku do laboratoře a prvotní zpracování .....	37
4.2.5	Uchovávání před analýzou.....	37
4.3	Použitá přístrojová technika .....	37
4.3.1	Sysmex XN-1000 a Sysmex XN-1500 DI.....	37
4.3.2	Cobas® pro .....	39
4.4	Měření na analyzátoru Sysmex XN-1000 a Sysmex XN-1500 DI .....	39
4.4.1	Princip měření .....	39
4.4.2	Stanovení potřebných hematologických parametrů .....	41
4.4.3	Reagencie .....	42
4.4.4	Kontrola kvality laboratorního procesu .....	42
4.4.5	Postup vlastního měření .....	44
4.4.6	Referenční rozmezí .....	45
4.5	Měření na analyzátoru cobas® pro.....	46
4.5.1	Stanovení železa.....	47
4.5.2	Stanovení feritinu.....	47
4.5.3	Stanovení transferinu .....	48
4.5.4	Výpočet saturace transferinu železem.....	48
4.5.5	Referenční rozmezí .....	49
5	Výsledky .....	50
5.1	Statistické zpracování souboru naměřených dat.....	50
5.1.1	Ověření normality pomocí histogramů .....	52
5.1.2	Statistické srovnání RET-He a MCHC.....	57



5.1.3	Statistické srovnání RET-He a HGB.....	58
5.1.4	Statistické srovnání RET-He a MCV .....	59
5.1.5	Statistické srovnání RET-He a MCH .....	60
5.1.6	Statistické srovnání RET-He a Fe .....	61
5.1.7	Statistické srovnání RET-He a saturace transferinu .....	62
5.1.8	Statistické srovnání RET-He a transferinu .....	63
5.1.9	Statistické srovnání RET-He a feritinu.....	64
5.1.10	Spearmanovy korelace .....	65
6	Diskuze.....	67
7	Závěr .....	73
8	Seznam použitých zkratk .....	74
9	Seznam použité literatury.....	77
10	Seznam použitých obrázků .....	89
11	Seznam použitých tabulek .....	91

# 1 ÚVOD

Anémie představuje jeden z nejrozšířenějších zdravotních problémů, který postihuje až jednu třetinu světové populace a její nejčastější příčinou je nedostatek železa. Sideropenická anémie ohrožuje především ženy ve fertlním věku, těhotné ženy, děti, starší lidi a obyvatele rozvojových zemí.

Železo je mimo jiné stěžejní pro syntézu hemoglobinu. Vyčerpání zásob železa v organismu tedy omezuje erytropoézu, a to v konečném důsledku snižuje schopnost krve okysličovat tkáně a orgány. Vznikající hypoxie zásadně ovlivňuje nejen kvalitu života, ale také vede k závažným následkům ohrožující postiženého a v případě gravidity i plod. Z tohoto důvodu je důležité anémii včas diagnostikovat a léčit.

V současnosti se diagnostika anémie z nedostatku železa ve většině laboratoří zakládá na vyhodnocení několika hematologických a biochemických parametrů, které poskytují informace o erytropoéze a metabolismu železa. Avšak tyto testy mají svá úskalí. Některé z nich mají příliš dlouhou dobu odezvy, protože obrat erytrocytů v krvi je příliš pomalý a vypovídají tedy o erytropoetické aktivitě před několika měsíci. Jiné testy jsou finančně náročné pro rutinní měření a u některých z nich mohou být výsledné hodnoty ovlivněny i zcela jinými stavy (např. zánětem). Další možností je vyšetření kostní dřeně, ale tento způsob je vysoce invazivní.

V posledních letech se stále častěji začíná využívat ekvivalent hemoglobinu v retikulocytech (RET-He), což je rozšířený parametr krevního obrazu, který je součástí novějších hematologických analyzátorů výrobce Sysmex. Retikulocyty za 1–3 dny po svém vzniku opouštějí kostní dřeň a v periferní krvi cirkulují ještě 1–2 dny, než dozrají v červenou krvinku. Retikulocyt je navíc posledním vývojovým stádiem erytropoézy, který je schopen syntetizovat hemoglobin, a proto stanovení RET-He odráží dostupnost železa pro tvorbu hemoglobinu v posledních 3–4 dnech. Jedná se tedy o ukazatel hemoglobinizace nově vzniklých erytrocytů, který navíc není ovlivněn přítomností infekce v organismu.

RET-He má díky své rychlé odezvě potenciál být nejen časným ukazatelem sideropenie a markerem vhodným k diagnostice sideropenické anémie, ale i parametrem vhodným ke sledování úspěšnosti feroterapie.

## 2 CÍLE PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je pokusit se najít a ověřit vztahy RET-He k vybraným laboratorním parametrům (tj. HGB, MCV, MCH, MCHC, železo, transferin, saturace transferinu a feritin) měřených pomocí hematologických analyzátorů Sysmex XN-1000 a Sysmex XN-1500 DI a biochemického a imunochemického analyzátoru cobas® pro. Získané vztahy graficky zpracovat, vyvodit z nich možná pravidla a vyhodnocené závěry následně porovnat s dostupnou literaturou.

## **3 PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU**

### **3.1 Anémie**

Anémie neboli chudokrevnost se považuje za jeden z nejčastějších patologických stavů, který postihuje jednu třetinu světové populace. Dochází při něm k poklesu koncentrace hemoglobinu a hematokritu pod dolní hranici referenčního rozmezí a s tím je spojena snížená schopnost krve zásobovat tkáně a orgány kyslíkem [1; 2].

Referenční mez se odvíjí od konkrétního věku a pohlaví. U dospělých mužů je optimální koncentrace hemoglobinu 135–175 g/l a u dospělých žen 120–160 g/l. Menší význam se přikládá stanovení počtu erytrocytů, protože u některých typů anémií se jejich počet nesnižuje [1; 2; 3].

Pro definici anémie je také potřeba zohlednit množství cirkulující plazmy, které může uvedené parametry zkreslit změněním svého objemu. Příkladem může být pacient po akutní ztrátě velkého množství krve. Z počátku jsou hodnoty hemoglobinu a hematokritu nezměněné. Po doplnění chybějící plazmy dochází k jejich postupnému snížení vlivem naředění buněčné složky krve. Zdánlivě normální hodnoty nacházíme u dehydratované osoby s chudokrevností. U těhotných žen se naopak množství plazmy v průběhu prvního a druhého trimestru zvyšuje, čímž koncentrace hemoglobinu přirozeně klesá. Tento stav se označuje jako tzv. relativní anémie [1; 2; 4].

U některých skupin obyvatelstva je potřeba nahlížet na referenční meze individuálně. Lidé žijící ve vysokých nadmořských výškách mají vyšší koncentraci hemoglobinu než lidé, kteří žijí v přímořských oblastech. Podobný efekt způsobuje také kouření cigaret [4; 5].

#### **3.1.1 Diagnostika anémií**

Anémie ve většině případech vzniká pouze jako projev jiného onemocnění. Pro zahájení adekvátní léčby anemického pacienta je nutná správná diagnostika, která tudíž nezávisí pouze na laboratorních výsledcích, ale stanovuje se na základě jejich kombinace s fyzikálním vyšetřením, informacemi z anamnézy a příznaky pacienta [5].

- **Klinické příznaky**

Nedostatečné okysličování tkání v důsledku sníženého množství hemoglobinu přímo souvisí s klinickými příznaky chudokrevnosti. Ty se mohou projevovat mírnými změnami v organismu, ale i život ohrožujícími stavy. Mezi klíčové faktory, které ovlivňují intenzitu projevu příznaků, řadíme stupeň a dobu trvání anémie, rychlost jejího vzniku, schopnost organismu se adaptovat, stav organismu (především respiračního a kardiovaskulárního systému), požadavky jedince na kyslík, přítomnost jiného onemocnění a v neposlední řadě věk [1; 5].

Dochází-li k akutnímu krvácení, závisí klinické projevy na množství ztraceného objemu krve. Pokud přesáhne akutní ztráta 30–40 % z celkového objemu, nastává oběhový kolaps. Při poklesu celkového objemu krve pod 50 % hrozí smrt [5].

Ačkoliv je pomalu vznikající anémie stejně závažná jako akutní krvácení, organismus má možnost pomocí adaptačních mechanismů potlačit vyvíjející se anemický syndrom. Vlivem těchto mechanismů zůstávají projevy anémie i při relativně nízkých koncentracích hemoglobinu skryté [1; 5; 6].

Jedním z důležitých kompenzačních mechanismů odpovídajících na hypoxii je vzestup hladiny 2,3-difosfoglycerátu v červených krvinkách, čímž se usnadňuje uvolňování kyslíku. Dále organismus začíná dodávat méně kyslíku do tkání, které jsou na nedostatečné prokrvení méně citlivé (např. kůže, ledviny) a upřednostní zásobení životně důležitých orgánů. V důsledku zvýšení produkce erythropoetinu ledvinami dochází ke stimulaci erythropoézy v kostní dřeni. Dalším obranným mechanismem je hyperventilace neboli zrychlené dýchání, ale i snížení viskozity krve v důsledku poklesu množství erytrocytů. To urychluje cirkulaci krve v krevním oběhu, a tím i dodání kyslíku do tkání [1; 5].

Anemický syndrom se může projevit únavou, hučením v uších, svalovou slabostí, závratěmi, bolestí hlavy, dušností, palpitací a synkopou, což jsou obecné subjektivní příznaky chudokrevnosti vznikající hypoxií. Na základě fyzikálního vyšetření mohou být zjištěny objektivní symptomy, mezi které spadá bledost kůže a sliznic, hypotenze, otoky, splenomegalie a zrychlené dýchání. U některých typů anémií se mimo obecných příznaků

vyskytují také specifické. Příkladem je vznik neuropatie vlivem anémie z nedostatku vitamínu B12 nebo vznik žloutenky u hemolytické anémie ze zvýšené destrukce erytrocytů [1; 7].

- **Anamnéza**

Kromě klinických příznaků mohou k odhalení anémie výrazně přispět i informace získané z anamnézy. Jedná se nejčastěji o informace spojené se stravovacími návyky, jež lékaře informují o potencionálních nutričních nedostatcích pacienta. Tyto nedostatky mohou vést až k nutriční anémii způsobené sníženým množstvím některé z hematopoetických živin. Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) trpí nutriční anémií 30 % lidstva. Ohroženou skupinou jsou např. vegetariáni, jejichž strava je více zatížena karencí hematopoetických živin [1; 2; 5; 8].

Nedostatek živin nemusí nutně poukazovat jen na jejich nedostatečný přísun do organismu, ale i na jejich zvýšenou ztrátu, která může být doprovázena jiným onemocněním, jako jsou např. malignity, parazitární infekce a onemocnění ledvin. V potaz je nutné brát také zvýšenou potřebu živin jedince v období růstu, těhotenství a laktace. Z tohoto důvodu je důležité, aby lékař věděl o zdravotním stavu pacienta [2; 5; 9].

Zjištění rodinné anamnézy napomáhá k definování některých dědičných typů chudokrevnosti, jako je srpkovitá anémie a talasémie. V neposlední řadě je nezbytné poskytnout lékaři informace o medikaci nebo vystavení organismu chemickým látkám a toxinům [5].

Přestože anamnéza a klinické příznaky dávají velké množství informací o stavu pacienta, jejich schopnost odhalit anémii je omezená, a proto při podezření může lékař nařídít laboratorní testy, které případnou chudokrevnost odhalí [2; 5].

- **Laboratorní diagnostika**

V první řadě se provádí vyšetření krevního obrazu, což je běžné screeningové vyšetření realizované ze vzorku nesrážlivé krve. Přestože stanovení koncentrace

hemoglobinu z hlediska definování chudokrevnosti spadá mezi nejdůležitější parametry, doporučuje se vyšetřit kompletní krevní obraz, čímž vznikne soubor výsledků, které spolu navzájem úzce souvisí [10; 11].

Klesne-li koncentrace hemoglobinu u mužů pod 135 g/l a u žen pod 120 g/l, hovoříme o anémii. Za těžkou formu se považuje nález menší než 80 g/l. Důležitým indikátorem je také pokles hematokritu pod 40 % u mužů a pod 35 % u žen [3; 12; 13].

Pro diferenciální diagnostiku anémií, která je poměrně komplikovaná, je potřeba znát nejen koncentraci hemoglobinu (HGB), hematokrit (HCT) či počet erytrocytů (RBC), ale i další parametry. V roce 1934 bylo zavedeno morfologické dělení anemických syndromů, jež se stalo užitečným především po zavedení krevních analyzátorů. Ty nám dávají informaci o jednotlivých parametrech červené krevní řady, které jsou mimo těch nejzákladnějších nezbytné k určení příčiny vzniku chudokrevnosti a její adekvátní léčbě [14].

Jedním z nejdůležitějších znaků je střední objem erytrocytu (MCV), jenž vypovídá o velikosti červené krvinky. Právě podle tohoto parametru se provádí morfologické dělení anémií na mikrocytární, normocytární a makrocytární. Střední množství hemoglobinu v erytrocytech (MCH) a střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytech (MCHC) poskytují informace, díky kterým může být anémie dělena na hypochromní a normochromní. Anizocytózu populace červených krvinek lze zjistit vyšetřením distribuční šíře erytrocytů (RDW), což je parametr, který popisuje heterogenitu červených krvinek z hlediska jejich MCV. Čím vyšší je hodnota RDW, tím více je populace erytrocytů heterogenní z hlediska jejich velikosti. V neposlední řadě je důležitý i počet retikulocytů. Jejich zvýšená produkce (retikulocytóza) vypovídá o zachování kompenzační schopnosti kostní dřeně [13; 14; 15].

Pozornost by měla být věnována také změnám v počtu leukocytů (WBC) a počtu trombocytů (PLT). Taktéž mohou poskytnout důležité informace o příčině vzniku anémie [15].

Na základě přítomnosti anemického syndromu a nálezu v krevním obraze mohou být provedeny další hematologické, biochemické a genetické laboratorní testy, jež jsou specifické pro jednotlivé typy anémií [15].

Příkladem základního hematologického testu je vyšetření krevního obrazu a mikroskopického nátěru periferní krve, který je používán při podezření na přítomnost abnormálních tvarů červených krvinek a přítomnost erytrocytárních inkluzí. K nejčastěji měřeným složkám séra patří hladina bilirubinu, kyseliny močové, laktátdehydrogenázy (LD), haptoglobinu, sérového železa, transferinu, feritinu, vitamínu B12 a folátů. K dalšímu vyšetření nemusí být využívána pouze krev pacienta, ale i moč, stolice nebo kostní dřeň [15; 16].

Pro určení příčiny anémie ve většině případech není vyšetření kostní dřeně nutné, avšak někdy může poskytnout cenné informace, které není možné běžnými laboratorními testy prokázat. Jejím testováním lze za některých patologických stavů odhalit myelodysplazii či infiltraci kostní dřeně maligními buňkami [15].

### **3.1.2 Etiopatogenetická klasifikace**

Ač je morfologická klasifikace praktická a hojně využívaná, její klinické využití je nedostatečné. Důvodem je převážně to, že využívá parametrů, které jsou výsledkem prvotních laboratorních testů. Pro zahájení cílené léčby nemocného je nezbytné zjistit příčinu a způsob vzniku, čímž se zabývá etiopatogenetická klasifikace. Podle převažující příčiny vzniku lze anémie rozdělit do tří skupin [6; 14; 16].

První skupinou jsou anémie z nedostatečné tvorby erytrocytů. K této poruše dochází při absolutním nebo relativním nedostatku látek potřebných pro tvorbu erytrocytů a hemoglobinu, jako je železo, kyselina listová, vitamin B12, B6, C, případně i E. Nedostatek regulačních sloučenin též ovlivňuje vznik červených krvinek. Důležitými regulačními sloučeninami jsou např. androgeny, erythropoetin či hormony štítné žlázy. K nedostatečné erythropoéze může docházet také vlivem poruchy kmenové buňky, což je způsobeno například myelodysplazií, dřevným útlumem či malignitami postihující kostní dřeň. Poslední skupinou, která svým působením ovlivňuje tvorbu červených krvinek, jsou dědičná onemocnění krvetvorby. Mezi nejčastější zástupce patří



sideropenická anémie, anémie z deficitu vitamínu B12 a anémie z nedostatku kyseliny listové [6; 16].

Další skupinou jsou anémie ze zvýšené ztráty erytrocytů. Ty vznikají jejich předčasným zánikem. V závislosti na tom, zda ke zkrácenému přežívání erytrocytu dochází vlivem vnějšího prostředí či problém souvisí přímo s krvinkou, rozlišujeme korpuskulární a extrakorpuskulární hemolytické anémie [16].

Posledním souborem onemocnění vycházejícím z etiopatogenetické klasifikace jsou akutní posthemoragické anémie, které vznikají nadměrným krvácením [16].

## **3.2 Metabolismus železa**

Železo je biogenní stopový prvek, který je v organismu nezbytnou součástí mnohých procesů zásadních pro život. Prostřednictvím hemoglobinu, kde se nachází největší část železa, přenáší kyslík po celém těle. Kromě toho je dále stavebním kamenem myoglobinu, cytochromů a dalších enzymů. Svou přítomností umožňuje syntézu bílkovin a nukleových kyselin. Dále se účastní např. proliferace, diferenciace, regulace genové exprese a apoptózy. Důležitou roli hraje také v normálním vývoji imunitního systému. Přibližný obsah vázaného dvojmocného železa v těle se u mužů pohybuje okolo 45 mg/kg a u žen okolo 35 mg/kg. Přestože je jeho úloha pro správné fungování organismu klíčová, může být železo i potenciálně toxické – zejména volné nebo uložené v játrech apod. [17; 18; 19].

### **3.2.1 Absorpce**

Železo se v potravě vyskytuje ve dvou formách – hemové a nehemové. Nehemové železo ( $\text{Fe}^{3+}$ ) je součástí rostlinné stravy, kde je obsažené především v zelenině, obilovinách, luštěninách a ovoci. Hemové železo ( $\text{Fe}^{2+}$ ) je přijímáno konzumací živočišné potravy, přičemž nejvíce se ho nachází v červeném mase, mořských plodech a drůbeži [18; 19; 20].

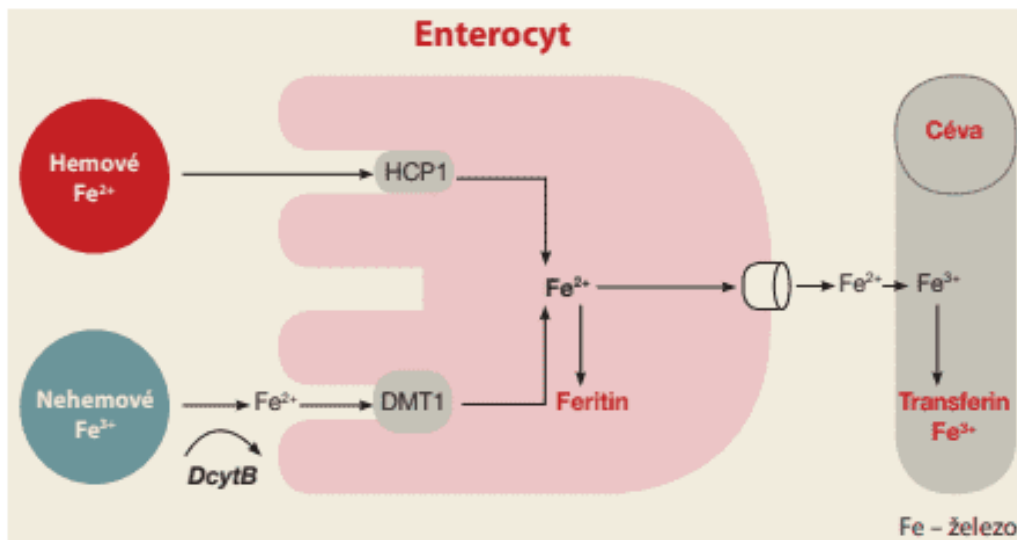
Primárním místem vstřebávání železa je duodenum, ale u malého podílu k němu dochází i v distálních částech tenkého střeva. U jeho jednotlivých forem probíhá absorpce

odlišně, protože enterocyt je schopen vstřebávat pouze  $\text{Fe}^{2+}$  formu. Následkem toho je absorpce hemového železa pro tělo snadnější [18; 19; 20].

Před samotnou absorpcí železitých iontů musí dojít k jejich redukci, což je zajištěno duodenálním cytochromem b (Dcytb), který se nachází na apikální straně střevních buněk. Působením transportéru DMT1 (divalent metal transporter 1) je následně dvojmocná forma železa absorbována do enterocytu. Konzumací stravy bohaté na hemoglobin se do trávicího traktu dostává hem. Po jeho vstupu do enterocytu vlivem transportéru HCP (heme carrier protein) dochází k degradaci hemu hemoxygenázou 1 [19; 20; 21].

Existuje velké množství faktorů, které ovlivňují vstřebávání železa z potravy. Mezi biologické faktory spadá věk, pohlaví, ale také zdravotní stav. Nepříznivě na absorpci může působit např. resekce žaludku a tenkého střeva, ale především příjem některých chemických látek. Příkladem jsou fytyáty, taniny a polyfenoly. Tyto látky se spolu s nehemovým železem nachází v rostlinné stravě a tvoří s  $\text{Fe}^{3+}$  nerozpustné komplexy, což způsobí neschopnost organismu toto železo využít. Jejich vlivem se snižuje resorpce o 10–15 %. Podobný důsledek vzniká i konzumací mléčných výrobků. Naopak mnoho faktorů příznivě ovlivňuje biologickou využitelnost železa z potravy. Mezi tyto látky patří vitamin C, kyselina citrónová, alfa a beta karoteny, vitamin A, bílkoviny masa a sacharidy (zvláště fruktóza a sorbitol) [20; 22].

Další osud železa se odvíjí podle aktuální potřeby organismu. Pokud má organismus dostatek železa, je inhibován jeho transport z enterocytu, přičemž dojde k jeho vazbě s apoferitinem za vzniku feritinu, kde je přebytečné železo uloženo v trojmocné formě. Takto uskladněné železité ionty se z organismu postupně ztrácí odlučováním enterocytů do gastrointestinálního traktu s následným vyloučením stolicí. Naopak při nedostatečném množství železa v těle se uplatňuje bílkovina feroportin, která umožňuje přenos  $\text{Fe}^{2+}$  z enterocytu do krevního oběhu, kde ihned dochází k oxidaci a vzniklé železo se v  $\text{Fe}^{3+}$  formě váže na transferin. Tímto způsobem se z potravy denně vstřebá 1–2 mg železa, čímž se za fyziologického stavu vyrovná jeho denní ztráta [18; 19; 20; 21].



Obrázek 1 – Schéma vstřebávání železa [23]

### 3.2.2 Recirkulace železa

K zániku starých červených krvinek dochází cca po 120 dnech jejich života, a to působením retikuloendotelového systému. Uvnitř makrofágů je hemoglobin rozložen a ze vzniklého hemu je vlivem hemoxygenázy 1 uvolněno železo v  $\text{Fe}^{2+}$  formě. K tomuto procesu dochází převážně ve slezině. Pokud k hemolýze dojde v krevním oběhu, uvolňuje se z červených krvinek do krve hemoglobin, který se váže s haptoglobinem. Komplex vstupuje do makrofágů prostřednictvím receptoru CD163, kde je působením hemoxygenázy uvolněno z hemu železo, které je následně exportováno feroportinem ven z buňky a vázáno na transportní protein [18; 19].

Recirkulací železa z červených krvinek je zajišťováno 10–20krát více železa, než kolik ho je schopné tělo absorbovat z potravy [18].

### 3.2.3 Transport

Transport železa po těle je zajišťován jeho vazbou s transportní bílkovinou, která je označována jako transferin. Tento glykoprotein je tvořen dvěma vazebnými místy, jimiž je umožněn přenos dvou atomů trojmocného železa. Transferin je syntetizován především v játrech, ale částečně ho produkují i vaječníky, varlata, mléčná žláza, makrofágy a submaxilární slinná žláza. Právě podle místa vzniku rozdělujeme transferin na podskupiny [19; 21; 24].

Sérový transferin, který je produkován hepatocyty jater, cirkuluje v krevní plazmě. Po vytvoření komplexu železa s transferinem dochází k transportu směrem k cílové buňce, kde se tento komplex váže na tzv. transferinové receptory (TfR), jež se nachází na povrchu buněk [19; 24].

Železo je transferinem přenášeno do kostní dřeně, kde je jeho velké množství spotřebováváno pro erythropoézu. Z toho důvodu se na povrchu erytroblastů nachází velké množství receptorů TfR1. Po vazbě receptoru s transferinem dochází k vytvoření endozomu, který přenáší vzniklý komplex. Po snížení pH se transferinový receptor a transferin vrací zpět na povrch buňky.  $\text{Fe}^{3+}$  uvnitř erytroblastu redukuje ferireduktáza na  $\text{Fe}^{2+}$ . Vlivem mitoferinů je železo přesunuto do mitochondrií a následně využito pro tvorbu hemu [19; 21].

#### **3.2.4 Úložiště**

Na povrchu hepatocytu se mimo TfR1 nacházejí také TfR2, které sice vážou transferin s menší afinitou, ale mechanismus transportu do buňky je stejný. Po využití absorbovaného železa pro buněčné pochody se jeho nadbytek ukládá v játrech ve formě feritinu a hemosiderinu. Feritin je složen z 24 podjednotek, přičemž existují dva typy – H (heavy) a L (light). H podjednotka se hojně vyskytuje v srdci a L podjednotka v játrech, avšak obě jsou nezbytné pro správnou funkci feritinu. Hemosiderin je oproti feritinu v organismu obsažen ve velmi malém množství. Tato nerozpustná bílkovina vzniká pravděpodobně částečnou degradací feritinu [19].

V případě potřeby organismu může být zásobní železo opět uvolněno z jater do krve, což zajišťuje feroportin. Samotná vazba s transportním proteinem je umožněna díky ceruloplasminu, který dvojmocné železo oxiduje na trojmocné [19].

#### **3.2.5 Regulace metabolismu železa**

Udržení rovnováhy železa je pro organismus zásadní, a proto je železo přísně regulováno kombinací systému na úrovni buňky se systémem na úrovni celého organismu [19].

- **Buněčná úroveň regulace metabolismu železa**

Tento systém je založen na interakci tzv. Iron responsive proteins (IRPs) s Iron responsive elements (IREs). IRPs jsou bílkoviny, které se mohou do homeostázy železa zapojit vazbou s nekódujícími úseky mRNA (IREs), čímž se usměřňuje tvorba proteinů, které jsou spojené s metabolismem železa [19; 25].

*„Regulace železa na úrovni buňky je založena hlavně na stupni exprese genu pro feritin a transferinový receptor 1 (TfR1), které regulují rovnováhu železa“ [25, s. 345].* Při snížené koncentraci železa v organismu se IRPs vážou k IREs s větší afinitou, což způsobuje zvýšení syntézy TfR1 a blokaci syntézy feritinu. Naopak jsou-li zásoby železa vysoké, snižuje se afinita a zvyšuje se syntéza feritinu, který přebytečné množství železa ukládá [19; 25].

- **Systémová regulace metabolismu železa**

Nejdůležitější roli hraje v systémové regulaci metabolismu železa hepcidin, což je peptid složený z 20, 22 či 25 aminokyselin, který ovlivňuje vstřebávání železa. Nachází-li se železo v organismu v nadbytku, zvyšuje se sekrece hepcidinu, což má za následek jeho navázání na ferroportin. Tímto spojením dochází k internalizaci a degradaci ferroportinu, což vede k blokaci absorpce železa z gastrointestinálního traktu. Podnětem pro zvýšenou syntézu hepcidinu může být také zánět. Naopak následkem nedostatečného množství železa se produkce hepcidinu potlačuje, což znamená, že ferroportin může exportovat železo ze střevních buněk do krevního oběhu, kde se váže na transportní bílkovinu a je využito dle potřeb organismu. Útlum produkce hepcidinu nastává také v důsledku anémie a hypoxie. Podobným způsobem reguluje hepcidin i uvolňování „recyklovaného“ železa z makrofágů [19].

### **3.3 Sideropenická anémie**

Anémie z nedostatku železa, která bývá označována také jako sideropenická anémie, vzniká následkem toho, že organismus nemá dostatek železa, které je nutné pro syntézu hemu. Právě nedostatek železa je celosvětově nejčastější příčinou anémie. Mezi nejvíce

ohrožené skupiny obyvatel patří lidé žijící v rozvojových zemích, ženy v plodném věku, kojenci, batolata, starší lidé a těhotné ženy [26; 27; 28].

### 3.3.1 Příčiny vzniku

- **Nadměrné ztráty**

Nejčastěji za vznikem sideropenické anémie stojí déletrvající ztráty krve, které tělo nezvládá přívodem železa z potravy vyrovnat. Mezi hlavní zdroje krvácení patří urogenitální a gastrointestinální trakt [28].

Ženy jsou v průběhu fertilního věku ohroženy následkem fyziologických ztrát krve (menstruace). Pro udržení rovnováhy železa v organismu je zapotřebí regulačních mechanismů, které malé úbytky krve kompenzují zvýšenou absorpcí z potravy, ale při větších ztrátách tělo nezvládá nedostatek vyrovnat, což může vést ke vzniku anémie. Další příčinou mohou být malignity v urogenitálním traktu, přítomnost konkrementů v močovém ústrojí a záněty močových cest a ledvin. U mužů a u žen po menopauze jsou častým podnětem pro krvácení léze v trávicím traktu. Mezi obvyklé nálezy patří např. peptické vředy, nádory, hemeroidy, brániční kýla s refluxní ezofagitidou či divertikly. Gastrointestinální krvácení také může vznikat důsledkem užívání některých léčiv (kyselina salicylová, kumariny atd.). V neposlední řadě může sideropenie doprovázet hemodialýzu a časté odběry krve, což znamená, že při nedodržování stanovených zásad narůstá riziko také u pravidelných dárců krve [28; 29; 30].

- **Nedostatečný přívod**

Nedostatečný obsah železa ve stravě postihuje nejvíce rozvojové země. Ve většině vyspělých zemích se objevuje vzácně, a to např. u veganů a vegetariánů, kteří konzumují převážně rostlinnou stravu, kde se mohou objevovat látky snižující absorpci železa [28; 29].

Je nutno zdůraznit, že existují onemocnění trávicího ústrojí, která zamezují vstřebávání živin ze stravy jako důsledek malabsorpce. Mezi tyto poruchy řadíme např. celiakii, Crohnovu chorobu a resekci žaludku a střeva. Dále mají značný vliv na

stav železa v organismu i příp. parazitů, kteří nejen zamezují jeho vstřebávání ze střeva, ale také způsobují jeho ztrátu krvácením [28; 29].

- **Zvýšená spotřeba**

Fyziologicky se zvyšují požadavky na železo u těhotných a kojících žen, které jsou díky tomu vystavené značnému riziku jeho nedostatku. Podobně tomu je i u dětí, kdy jejich rychlý růst vyžaduje vyšší přísun železa [29].

### **3.3.2 Stupně nedostatku železa**

Z nedostatku železa dochází k rozvoji chudokrevnosti postupně v průběhu tří fází, které rozlišujeme pomocí laboratorních výsledků. Stádia označujeme jako prelatentní sideropenie, latentní sideropenie a sideropenická anémie [31; 32].

První stádium je charakterizované negativní bilancí železa, čímž dochází k postupnému vyčerpávání jeho zásob v organismu. Následkem toho klesá hladina sérového feritinu a může se zvyšovat RDW, ale prozatím nedochází ke změně morfologie erytrocytů. Do procesu se začínají zapojovat regulační mechanismy, které se svým působením snaží zamezit rozvoji anémie [30; 31; 32].

Prelatentní sideropenie přechází v latentní v momentě, kdy se zásoby železa v těle vyčerpají, což signalizuje pokles koncentrace sérového feritinu. Přestože saturace transferinu klesá, jeho koncentrace v krvi stoupá. Současně se zvyšuje protoporfyrin červených krvinek. Navzdory narušení erythropoézy odpovídá koncentrace hemoglobinu fyziologickému rozmezí, což svědčí o tom, že ve druhém stádiu stále není přítomna anémie [30; 31; 33].

Ve třetí fázi nedostatku železa klesá koncentrace hemoglobinu a hematokritu pod normu a výsledkem je vznik sideropenické anémie, pro kterou jsou typickým nálezem hypochromní mikrocyty [30; 33].

### 3.3.3 Klinické příznaky

Zásadní problém nedostatku železa v organismu spočívá v tom, že se jeho časná stádia obvykle nijak neprojevují, a tudíž se karence železa může vyvíjet měsíce až roky bez jakéhokoliv náznaku. Většinou se první symptomy objevují až s rozvojem chudokrevnosti a mezi nejčastější řadíme únavu, závratě, dušnost, bolest hlavy a palpitaci. Avšak tyto příznaky bývají popisované i u anémií vyvolaných jinou příčinou. Se sideropenickou anémií je spojena také celá řada specifických symptomů, které zahrnují vyšší lomivost nehtů, poruchu polykání (Kellyho-Petersonův nebo Plummerův-Vinsonův syndrom), pálení jazyka, svalovou dysfunkci, selhání obranyschopnosti, koilonychii (lžičkovité nehty) a cheilózu (praskliny v koutku úst). Dále pacienti mohou trpět syndromem pica, což je stav popisovaný jako touha po požití neobvyklých věcí, mezi kterými se nejčastěji objevuje led, hlína, škrob nebo popel [30; 31; 32; 33].

Vzhledem k tomu, že jsou vysokému riziku nedostatku železa vystaveny těhotné a kojící ženy, může mít jeho karence negativní vliv na vývoj plodu či kojence [30; 31].

### 3.3.4 Diagnostika

Jako u každé anémie je potřeba klinický obraz doplnit laboratorními testy, které jsou pro spolehlivou diagnózu anémie klíčové [30].

Z definice anémie vyplývá, že základem diagnostiky jakéhokoliv jejího typu je pokles koncentrace hemoglobinu a hematokritu pod fyziologickou mez. V důsledku toho klesají i hladiny MCH a MCHC, což je známkou hypochromie. Další změnou doprovázející sideropenickou anémii je snížení MCV, což poukazuje na vznik mikrocytů. Avšak ke zmenšování krvinek nedochází vždy, protože asi 20 % pacientů má velikost erytrocytů v normě. Současně je prokazována i anizocytóza, která vypovídá o tom, že erytrocyty v krvi jsou nesterjné velikosti. Tuto nesterjnorodost zjišťujeme pomocí RDW při hodnotách vyšších než 15,2 %. Je nutno poznamenat, že v některých případech můžou být typické výsledky krevního obrazu zkreslené jinými patologiemi. Příkladem je kombinace nedostatku železa s nedostatkem vitamínu B12 a folátů, jejichž snížené množství v organismu běžně stojí za rozvojem makrocytární anémie. Množství retikulocytů bývá normální nebo mírně snížené. Změny mohou zasáhnout i počet leukocytů v závislosti na



příčině vzniku chudokrevnosti. Obvykle jejich množství zůstává v normě, ale např. chronickou stimulací kostní dřeně může dojít i k leukocytóze. Počet trombocytů často dosahuje hodnot překračující horní hranici normy, ale současně s manifestním nedostatkem železa lze prokázat i trombocytopenii [30; 31].

Významně k diagnostice přispívá vyhotovení nátěru z periferní krve, kterým lze zaznamenat odchylky ve tvaru a velikosti krvinek. Nejčastějším nálezem bývá poikilocytóza s hypochromními mikrocyty. V pozdějších fázích onemocnění se mohou objevovat až anulocyty. Dále v krevním nátěru lze zpozorovat, že se populace erytrocytů mezi sebou liší svou velikostí, což opět poukazuje na anizocytózu [30; 31].

Pro diagnostiku sideropenické anémie nejsou výsledky krevního obrazu dostatečné, protože nález mírnějších forem může odpovídat i jiným patologickým stavům. Podobné nálezy se vyskytují u talasémie nebo anémie chronických onemocnění a pro jejich odlišení je nezbytné doplnit krevní obraz dalšími testy [29; 33; 34].

Měření koncentrace sérového feritinu patří mezi nejučinnější markery, které mohou pomoci určit správnou diagnózu, protože jeho koncentrace v krvi odpovídá zásobám železa v organismu. Při snižování těchto zásob množství sérového feritinu klesá. Právě tento parametr pomáhá odlišovat sideropenickou anémii od jiných mikrocytárních onemocnění. Feritin je také reaktant akutní fáze, což znamená, že při zánětlivých stavech, onemocněních jater a malignitách se jeho koncentrace navyšuje. To může následně skrývat karenci železa a ovlivnit interpretaci výsledků. Dále zaznamenáváme pokles plazmatického železa. Podobně jako u prelatentní sideropenie je stále zvýšená koncentrace sérového transferinu a jeho saturace bývá naopak snížena na méně než 15 %. Dále má diagnostický význam vyšetření solubilních transferinových receptorů, které bývají zvýšené. Pokud vydělíme koncentraci solubilních transferinových receptorů dekadickým logaritmem hladiny feritinu, získáme tzv. feritinový index, který odráží vyčerpání železa v těle při hodnotách vyšších než 1,8. Důležitá je také vysoká hladina volného protoporphyrinu, který se důsledkem absence železa hromadí v erytrocytech [30; 31; 33; 34; 35].

Kombinací všech výše zmíněných testů lze získat spolehlivý soubor dat, s jehož pomocí je možné stanovit diagnózu bez nutnosti vyšetření kostní dřeně. Jedná se

o invazivní a drahý zákrok, který se z těchto důvodů provádí jen zřídka. Nejčastějším důvodem odběru jsou případy, kdy výsledky laboratorních testů nejsou jednoznačné. Velkou výhodou jejího vyšetření je, že na rozdíl od markerů, které jsou pro diagnostiku sideropenické anémie běžně využívané, není ovlivněna infekcí, což je užitečné zejména u pacientů se zánětlivými stavy. Barvením vzorku kostní dřevě se prokazují snížené nebo chybějící zásoby železa v makrofázích. Také je odhalen pokles či úplné vymizení sideroblastů. Hodnocena je i změna morfologie, která se při těžkém nedostatku železa projevuje plazmojadernou asynchronií v normoblastech [26; 31; 35].

Jakmile je stanovena diagnóza, následuje určení příčiny vzniku. Tento krok je nezbytný především pro správnou léčbu, ale i k případnému odhalení základního onemocnění. V případě, kdy není patogeneze zjevná, je zapotřebí nemocného podrobit dalšímu testování, které nejčastěji zahrnuje instrumentální vyšetření gastrointestinálního traktu, vyšetření moči včetně močového sedimentu a testování vzorku stolice na okultní krvácení. U žen může být zjištěno základní onemocnění podrobnou gynekologickou prohlídkou [29; 34].

### **3.3.5 Léčba**

Cílem léčby je doplnění zásob železa a zvýšení koncentrace hemoglobinu tak, aby se nacházela ve fyziologickém rozmezí. K tomu je v první řadě zapotřebí odstranit příčinu vzniku sideropenické anémie. Dalším krokem je podávání léčiv obsahujících železo po dostatečně dlouhou dobu. V průběhu této doby je nezbytné kontrolovat stav železa v organismu pomocí biochemických testů (množství sérového železa, saturace transferinu, solubilní transferinové receptory, případně i celková vazebná kapacita železa). Pravidelné kontrole by měly podléhat také indexy červených krvinek. S léčbou se pokračuje obvykle 3–6 měsíců po normalizaci koncentrace hemoglobinu, aby došlo k úplnému doplnění zásob železa [29; 34; 35; 36].

K dodání železa do organismu se využívá především perorální formy léčiv, ve kterých jsou obsaženy soli železa. Příkladem jsou preparáty Sorbifer Durules, Tardyferon, Aktiferrin aj. Nesmí být však opomíjen fakt, že některé látky vstřebávání železa zabraňují a některé ho naopak podporují. Výrobci využívají těchto znalostí a obohacují léčivé přípravky právě o látky, jež usnadňují absorpci železa, např. vitamin C. Účinnost léků ovlivňuje také doba jejich užívání, přičemž nejvhodnější je jejich podání půl hodiny před

jídlem nebo nejméně dvě hodiny po jídle. V neposlední řadě i některé léky mohou působit jako inhibitory vstřebávání. O všech těchto faktorech by měl být pacient informován, protože jeho spolupráce s lékařem má zásadní vliv na výsledek léčby. Feroterapie může být doprovázena vedlejšími projevy, kterými jsou nevolnost, bolesti břicha, zácpa, průjem apod. Doporučená denní dávka elementárního železa per os činí u dospělých pacientů nejméně 180–200 mg. U dětí je tato denní dávka 3–6 mg/kg [29; 33; 36; 37; 38].

Pokud nemocný trpí sideropenií v důsledku malabsorpce z gastrointestinálního traktu, je prokázána intolerance perorálního železa, nebo pokud pacient tuto léčbu nedodrží, lze železo podávat parenterálně. Přestože se tento druh suplementace vyznačuje rychlejší terapeutickou odpovědí, tak jako každá léčba s sebou i tato nese rizika. Nevýhodou je jednak celá řada nežádoucích účinků spojených s intravenózní aplikací účinné látky, ale i možné hromadění železa, které je způsobeno neschopností organismu vyloučit jeho nadbytek. Aby se předešlo předávkování, je nutné potřebné množství železa předem vypočítat [29; 33; 34; 37].

Adekvátní odpovědí na léčbu je nejen postupný vzestup koncentrace hemoglobinu a normalizace zásobního železa, která je charakterizovaná zvýšením koncentrace feritinu a saturace transferinu, ale i zvýšením hemoglobinu v retikulocytech. Avšak tento parametr reaguje rychleji než ostatní markery, což z něj dělá velmi časný indikátor správné léčby [36; 39].

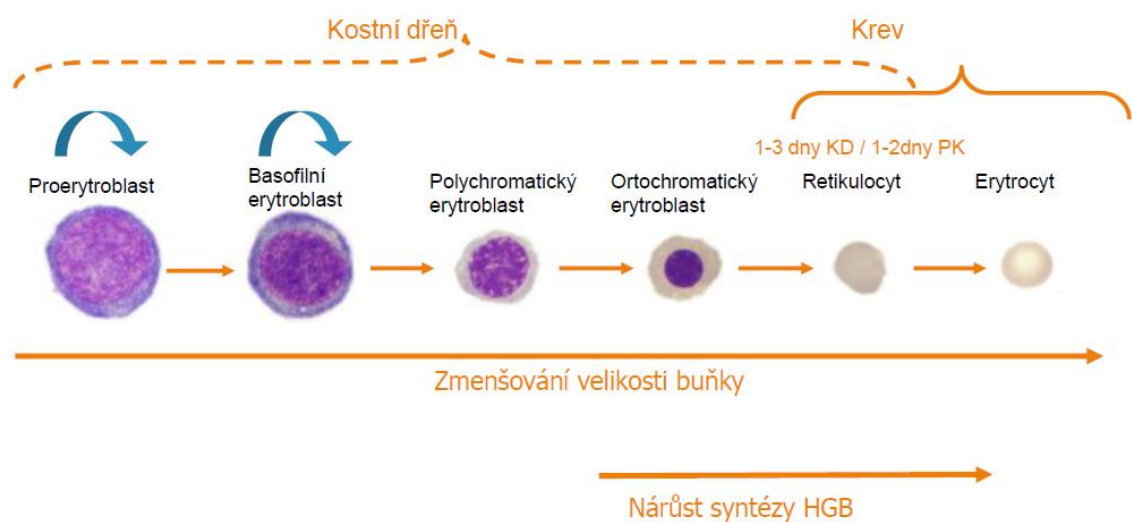
### **3.4 Ekvivalent hemoglobinu v retikulocytech (RET-He)**

Vzhledem k tomu, že sideropenická anémie zásadně ovlivňuje kvalitu života, je žádoucí zjistit úbytek železa co nejdříve, aby se zamezilo jejímu rozvoji. Avšak v dnešních dnech neexistuje ideální marker, který je bez dalších testů dostatečný k odhalení mizejících zásob železa v organismu, rychle reaguje na léčbu a není ovlivněn jinými patologickými stavy. Právě ekvivalent hemoglobinu v retikulocytech se svými vlastnostmi stává potencionálním parametrem vhodným k časně diagnostice a následnému sledování odpovědi na léčbu sideropenie [39].

### 3.4.1 Retikulocyty

Retikulocyty jsou bezjaderné, nezralé červené krvinky, které vznikají procesem zvaným erytropoéza. Základem tohoto procesu je kmenová buňka, ze které asymetrickým dělením vzniká jedna buňka totožná mateřské a jedna, jež se diferenciací přes několik dalších typů buněk stává erytrocytem. V průběhu tohoto vývoje přichází krvinka o většinu organel, a tím i schopnost se dělit [40].

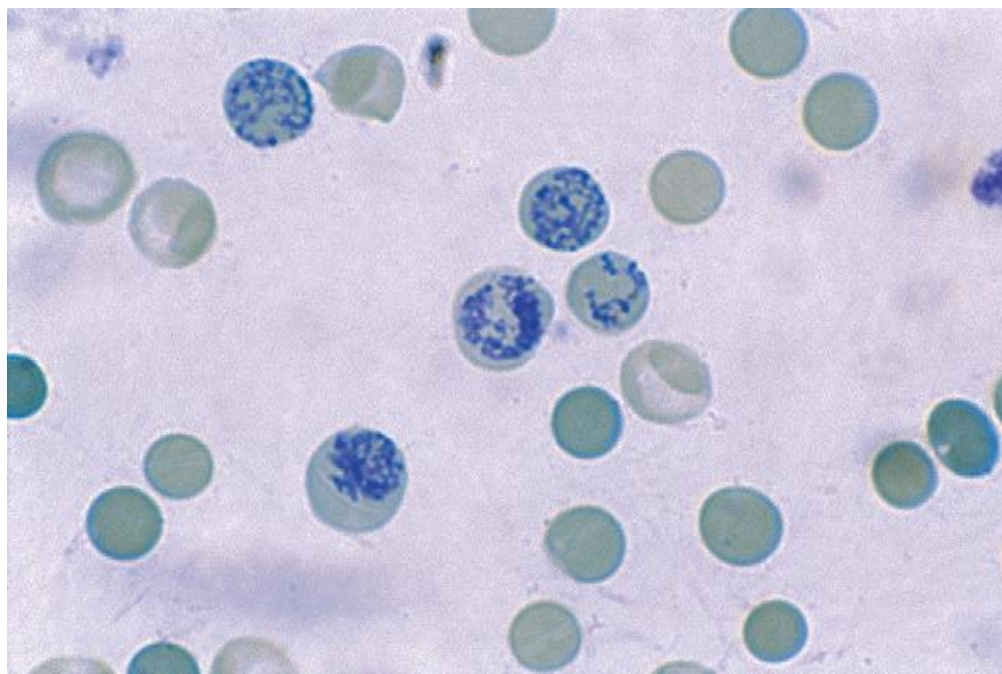
Retikulocyty jsou předposledním vývojovým stádiem erytropoézy. Za běžné situace jsou cca o 20 % větší než erytrocyty, což odpovídá průměru 7 až 9  $\mu\text{m}$ . Dále nejsou pravidelné a na rozdíl od normocytů v nich stále dochází k metabolickým pochodům a syntéze hemoglobinu. Po 1–3 dnech od svého vzniku opouští kostní dřeň. K tomuto přechodu do krevního řečiště skrz endoteliální póry dřevných sinusoid dochází 1–2 dny před dozráním v červenou krvinku. Retikulocyt během své maturace prochází řadou změn, mezi něž patří postupná ztráta organel a RNA, která je rozkládána pomocí ribonukleáz. Čím více je retikulocyt zralejší, tím méně RNA obsahuje. Na základě toho lze rozlišovat mladší retikulocyty s vyšším množstvím RNA od těch starších, které obsahují pouze část rRNA potřebné pro vznik erytrocytů [40; 41; 42; 43].



Obrázek 2 – Schéma erytropoézy. **KD** – kostní dřeň; **PK** – periferní krev [44]

Počet retikulocytů lze stanovit světelnou mikroskopií vzorku obarveného pomocí methylenové nebo brilantkresylové modři, již se vizualizují zbytky RNA v cytoplazmě buňky. Tento typ barvení bývá označován jako supravitální. Díky své nízké reprodukovatelnosti a nespolehlivosti výsledků byl tento postup nahrazen jiným.

V současnosti jsou k dispozici automatizované metody, které provádí počítání retikulocytů na základě průtokové cytometrie, což je přesnější a rychlejší. Detailněji lze retikulocyty pozorovat elektronovou mikroskopií, která nám umožňuje zobrazovat jednotlivé struktury retikulocytu [41].



*Obrázek 3 – Retikulocyty zvýrazněné supravitálním barvením [45]*

Počet retikulocytů odráží funkci kostní dřeně. Jejich fyziologické rozmezí v periferní krvi se u dospělého člověka pohybuje mezi 0,5 až 2,5 %. Retikulocytóza dokazuje zachování kompenzační schopnosti kostní dřeně zesílením krvetvorby, což je doprovázeno právě zvýšenou produkcí retikulocytů. Nejčastějšími příčinami bývá ztráta krve nebo hemolytická anémie. Naopak útlum krvetvorby, který se projevuje sníženou tvorbou krvinek nastává, pokud kostní dřeň není schopna správně plnit svou funkci. S retikulocytopenií se setkáváme při aplastické anémii, myelodysplastických syndromech nebo hypochromních anémiích, mezi které patří nejen sideropenická, ale i sideroblastická anémie,  $\beta$ -talasémie a anémie z chronických onemocnění. Snížení počtu retikulocytů může být způsobeno také nedostatkem některé z živin potřebných pro erythropoézu a mimo nedostatku železa může být příčinou i karence vitaminu B12 a folátů [41; 43].

### 3.4.2 Stanovení RET-He

Průměrná životnost červených krvinek je 120 dní a během této doby nesyntetizují nový hemoglobin. Pro udržování stále stejného počtu erytrocytů v krevním oběhu se za fyziologického stavu vytváří přibližně 1 % nových červených krvinek denně. To znamená, že změření koncentrace HGB v krvi nám poskytuje informace o erytropoetické aktivitě během několika předchozích měsíců. V případě anémie ji tedy není možné prokázat ihned po vzniku, ale až s odstupem času, kdy se do oběhu vyplaví dostatečné množství nových krvinek. Vzhledem k tomu, že retikulocyty v průběhu svého podstatně kratšího života stále syntetizují hemoglobin, vypovídá jeho množství o aktuální erytropoetické aktivitě a obsahu železa v organismu. V momentě, kdy organismus nemá dostatek železa pro erytropoézu, začne produkovat retikulocyty s menším obsahem hemoglobinu, což je možné zjistit ze vzorku krve ihned po jejich uvolnění z kostní dřeně [44; 46].

Hemoglobin v retikulocytech lze detekovat pomocí automatických přístrojů na měření krevního obrazu a v závislosti na výrobci analyzátoru existují dva odlišně pojmenované parametry pro jeho stanovení – RET-He a CHr. Ekvivalent hemoglobinu v retikulocytech (RET-He) byl vyvinut společností Sysmex a obsah hemoglobinu v retikulocytech (CHr) je využíván v některých přístrojích od společnosti Siemens Healthineers. Na základě několika studií, které se zabývaly mírou shody mezi RET-He a CHr se zjistilo, že oba markery korelují se sideropenií a jsou srovnatelnými ukazateli dostupnosti železa [43; 46; 47].

Normální referenční rozmezí RET-He je v literatuře obvykle uváděno v intervalu 28–35, resp. 38 pg. Hodnoty, které se nacházejí pod referenčním rozmezím, jsou považovány za projev nedostatku železa [48].

### 3.4.3 Výhody a nevýhody

Vyšetření RET-He je levné, rychlé a jednoduché. Svými výhodami má tento parametr potenciál nahradit jak vyšetření kostní dřeně, které je v některých případech nezbytné, tak i alternativní biochemické a hematologické testy, které doposud sloužily k prokazování funkce metabolismu železa a odhalování sideropenické anémie. Na rozdíl od těchto testů není možné výsledný obsah hemoglobinu v retikulocytech ovlivnit. Feritin, který je považován za nejúčinnější test demonstrující rezervy železa v těle, může být zkreslován

infekcí nebo malignitami, protože je reaktantem akutní fáze. Koncentrace sérového železa, která se také vyšetřuje při podezření na sideropenii, klesá i při anémii chronických onemocnění. Kromě toho se jeho množství v krvi mění během dne v závislosti na příjmu železa. V neposlední řadě je stanovení sérového železa základem výpočtu saturace transferinu, tudíž jeho zavádějící hodnoty mají vliv na výsledky dalších testů. Běžně používané hematologické testy také nejsou nejvhodnější pro posouzení aktuální krvetvorby, protože jak již bylo naznačeno, trvá poměrně dlouhou dobu, než rozvíjející se anémie ovlivní erytrocytární indexy. Navíc mohou být i výsledky těchto testů pozměněny jinou přítomnou patologií. Dalším úskalím je, že některá vyšetření bývají příliš drahá na to, aby se stala rutinním nástrojem, např. vyšetření solubilních transferinových receptorů [43; 46; 48; 49].

RET-He by mohl díky své rychlé odezvě být nejen časným ukazatelem sideropenie a markerem vhodným k diagnostice sideropenické anémie, ale i parametrem pro sledování úspěšnosti perorální nebo intravenózní terapie založené na podávání léčiv s obsahem železa. Nevýhodou jeho vyšetření je, že k poklesu hemoglobinu v retikulocytech nedochází pouze sideropenií, ale i hemoglobinopatií, jako je  $\alpha$ -talasemie a  $\beta$ -talasemie, což může být problém především v oblastech s vysokou prevalencí těchto onemocnění [43; 48; 49; 50].

#### **3.4.4 Absolutní a funkční nedostatek železa**

Přestože je ekvivalent hemoglobinu v retikulocytech sám o sobě klinicky užitečný, pro získání co nejvíce informací o diagnóze se vyšetřuje společně s feritinem. Jejich vzájemný vztah rozhoduje o tom, zda se v konkrétním případě jedná o absolutní či funkční deficit železa, což je důležité k odhalení a následnému odstranění příčiny vzniku [48].

Absolutní nedostatek je stav, kdy je množství železa v organismu sníženo nebo úplně vyčerpáno, přičemž většinou je zachována správná funkce erythropoézy a hemostázy železa. Nejčastěji absolutní nedostatek vzniká jako důsledek déletrvajících ztrát krve, sníženého množství železa v potravě, malabsorpce nebo menoragie. Naopak funkční deficit je charakterizován adekvátními zásobami železa, které jsou blokovány retikuloendotelovým systémem, což má za následek poruchu syntézy hemoglobinu v erytroidních prekurzorech. V obou případech dochází k omezení krvetvorby [51].

O absolutním nedostatku železa svědčí laboratorní nález nízkých hodnot RET-He a feritinu. Zatímco snížení RET-He s vysokou či fyziologickou hodnotou feritinu může být důkazem funkčního nedostatku železa při současně probíhajícím reaktivním stavu organismu [48].

### 3.4.5 ICIS

Důležitý je v souvislosti s RET-He výpočtový parametr ICIS. Sepse představuje velmi závažný stav, a z toho důvodu je její časná diagnostika a okamžitá léčba pro pacienty naprosto zásadní. Na základě kombinace několika parametrů získaných při měření krevního obrazu, rozšířeného diferenciálního rozpočtu leukocytů a retikulocytů lze stanovit tzv. Intensive Care Infection Score (ICIS). Výpočtem tohoto parametru lze časně odlišit tento stav od neinfekční zánětlivé odpovědi organismu. Jeden z použitých parametrů pro jeho stanovení je právě RET-He [52].

### 3.4.6 Delta-He

Vhodné je také zmínit nový diagnostický parametr vyvinutý společností Sysmex, který s RET-He úzce souvisí. Tímto parametrem je Delta-He. Popisuje rozdíl mezi ekvivalentem hemoglobinu v retikulocytech a obsahem hemoglobinu ve zralých červených krvinkách, což nám umožňuje srovnávat stupeň hemoglobinizace retikulocytů a erytrocytů. V průběhu stárnutí normocytů dochází k přirozenému snižování koncentrace hemoglobinu, což znamená, že za fyziologických podmínek mají retikulocyty oproti červeným krvinkám vyšší stupeň hemoglobinizace. To je doprovázeno kladnými hodnotami Delta-He, kterými může být sledována např. úspěšnost terapie železem. Záporné hodnoty Delta-He naopak vypovídají o tom, že je obsah hemoglobinu v retikulocytech menší než v erytrocytech, což může svědčit o rozvíjející se anémii [53; 54].

Časopis *Clinical Kidney Journal* zveřejnil v roce 2014 článek s názvem *Delta-He: a novel marker of inflammation predicting mortality and ESA response in peritoneal dialysis patients* (v překladu „Delta-He: nový marker zánětu předpovídající mortalitu a odpověď na ESA u pacientů na peritoneální dialýze“), kde autorka Kristin Danielson se svými kolegy jako první potvrzuje prospěšnost sledování parametru Delta-He jako markeru vhodného pro předpověď reakce na léčbu přípravky stimulujícími



erytropoézu v dialyzované populaci. Vzhledem k tomu, že základem tohoto parametru je ekvivalent hemoglobinu v retikulocytech, podporuje tato studie nejen klinickou užitečnost Delta-He, ale i RET-He [54].

## **4 METODIKA**

### **4.1 Definice souboru**

Veškeré vzorky, jejichž analýzou byla získána data pro účely této bakalářské práce, byly vyšetřeny v Ústřední vojenské nemocnici – Vojenské fakultní nemocnici Praha (ÚVN) na Oddělení hematologie a krevní transfuze (OHKT) a Oddělení klinické biochemie (OKB). Vzorky krve pacientů bez rozdílu pohlaví, věku a diagnózy byly podrobeny analýze v období od 11.1.2023 do 28.2.2023 pracovníky výše zmíněných oddělení.

Sběr dat se zaměřoval na parametry krevního obrazu (RET-He, HGB, MCV, MCH, MCHC) a některých biochemických ukazatelů metabolismu železa (feritin, transferin, saturace transferinu, sérové železo). Výsledkem je soubor dat od 979 pacientů.

### **4.2 Preanalytická fáze**

Laboratorní proces lze rozdělit na tři části a ty jsou označovány jako preanalytická, analytická a postanalytická fáze. Aby bylo dosaženo co nejspolehlivějšího výsledku, což je cílem celého laboratorního vyšetřování, musí být splněna široká škála podmínek. Naopak jejich nedodržení může vést k chybnému výsledku. Přestože chyba může vzniknout v kterémkoliv kroku celého procesu, původem převážné většiny z nich je preanalytická fáze. Podle některých zdrojů představuje 70–80 % všech chyb laboratorního vyšetřování. Součástí preanalytické fáze je výběr a objednání testu, příprava pacienta na odběr, samotný odběr biologického materiálu s jeho následným transportem a příjmem do laboratoře a prvotní zpracování vzorku včetně skladování před analýzou [55; 56; 57].

#### **4.2.1 Příprava pacienta před vyšetřením**

Na výsledek, mimo celé řady neovlivnitelných faktorů, působí také faktory ovlivnitelné. O jejich vlivu by měl být pacient před plánovaným odběrem vzorku krve dostatečně poučen. Pro diagnostiku a sledování léčby sideropenické anémie se vyšetřují některé biochemické a hematologické parametry, pro jejichž stanovení není za normálních okolností nutné dodržovat dietní opatření, jako je tomu u jiných vyšetření

krve. Přesto by se měl pacient před odběrem vyhýbat konzumaci tučné stravy, která může způsobit nežádoucí chylozitu krevní plazmy. Zároveň je nezbytné v den odběru doplnit dostatečné množství tekutin (neslazený čaj, voda). Tímto krokem se zvyšuje objem cirkulující plazmy, což umožňuje naředit zahuštěnou krev a eliminovat naměření falešně zvýšené koncentrace vyšetřovaných analytů [56; 58; 59].

#### 4.2.2 Odběr krve

Pro vyšetření potřebných parametrů (tj. HGB, MCV, MCH, MCHC, RET-He, feritin, transferin, saturace transferinu a sérové železo) se odebírá venózní krev obvykle z loketní žíly. Před samotným odběrem materiálu se nejprve dezinfikuje místo vpichu a může být přiložen turniket. Avšak při jeho použití je nezbytné mít na paměti, že stažení paže po jedné minutě doprovází hemokoncentrace v oblasti odběru, což zkresluje celou řadu parametrů. Mírné zaškrcení je z tohoto důvodu využíváno jen v případě nutnosti. Ihned po zavedení jehly do žíly by měl být turniket uvolněn. Cvičení se zataženou paží (tzv. „pumpování“) je před odběrem naprosto nevhodné [55; 58].

V ÚVN se používá uzavřený odběrový systém VACUETTE od firmy Greiner Bio-One International GmbH.

Pro biochemická vyšetření séra se krev odebírá do plastových zkumavek s červeným uzávěrem o objemu 6 ml. Vnitřní stěna zkumavky je potažena aktivátory koagulace, což tento proces výrazně urychluje [60].



Obrázek 4 – Zkumavka VACUETTE pro přípravu séra [60]

Po odběru srážlivé krve do zkumavky bez aditiv následuje naplnění zkumavky s fialovým uzávěrem o objemu 2 ml, což je určené pro hematologické vyšetření. Tyto

odběrové nádoby obsahují antikoagulační činidlo, které váže vápenaté ionty v krvi, čímž zabraňuje její koagulaci. Obvykle jsou tyto látky nanесeny v pevné formě na vnitřním povrchu zkumavky. Používaným protisrážlivým prostředkem jsou soli kyseliny ethylendiamintetraoctové, které běžně označujeme pomocí zkratky EDTA, přičemž v ÚVN se jako aditivum využívá  $K_3EDTA$  [56; 61].



Obrázek 5 – Zkumavka VACUETTE s  $K_3EDTA$  [61]

Zásadní je dodržet správný poměr mezi množstvím činidla a přidaným objemem krve, což zajišťuje vakuum v odběrovém systému. Pro obě odběrové nádoby dále platí, že musí být ihned po naplnění dostatečně promíchány opatrným otáčením zkumavky dnem vzhůru (minimálně pětkrát) [56; 58].

#### 4.2.3 Transport

Není-li uvedeno jinak, jsou před transportem zkumavky uchovávány v kolmé poloze při pokojové teplotě. Doba mezi náběrem vzorků a příjmem do laboratoře by měla být co nejkratší. Pokud není možné zajistit okamžitou přepravu, uskladňují se vzorky v chladu [58].

Při transportu biologického materiálu do laboratoře je potřeba dodržet několik zásad, které vzorky chrání před znehodnocením. Především se v průběhu přepravy musí předejít teplotním výkyvům a přílišným pohybům, které způsobují rozpad krevních elementů. V areálu nemocnice je možné využít nejen osobní donášky zdravotnickým personálem, ale i validované potrubní pošty [56; 58].

#### **4.2.4 Příjem vzorku do laboratoře a prvotní zpracování**

Ke správně označeným vzorkům musí být vždy přiložena řádně vyplněná žádanka. Pracovníci laboratoře při příjmu biologického materiálu kontrolují uvedené informace a jejich nesprávné či neúplné vyplnění může být důvodem k odmítnutí vyšetření. Po vložení veškerých informací do laboratorního informačního systému (LIS) je vzorku krve přidělen čárový kód, který je vytištěn a následně jím je zkumavka polepena [57; 58].

Zkumavka srážlivé krve pro biochemické vyšetření je před samotným měřením centrifugována 10 minut při 2000 g, a tím dojde k oddělení krevní sraženiny od séra.

Vzorek krve odebraný pro vyšetření krevního obrazu není nijak upravován a je připraven k analýze.

#### **4.2.5 Uchovávání před analýzou**

Vyšetření nesrážlivé krve by mělo být provedeno maximálně do čtyř hodin po odběru, protože stabilita jednotlivých parametrů krevního obrazu je při teplotě 15–20 °C maximálně 5 hodin. Námi sledované biochemické parametry v séru mají při stejné teplotě delší stabilitu a může být ještě prodloužena uchováním při nižších teplotách [59].

### **4.3 Použitá přístrojová technika**

K vypracování této bakalářské práce byly změřeny jednotlivé parametry krevního obrazu pomocí hematologického analyzátoru Sysmex XN-1000 a Sysmex XN-1500 DI. Pro stanovení biochemických parametrů bylo využito automatického analyzátoru cobas® pro.

#### **4.3.1 Sysmex XN-1000 a Sysmex XN-1500 DI**

Oba přístroje jsou výkonné automatické hematologické analyzátory japonského výrobce Sysmex Corporation využívané k vyšetření krevního obrazu, normoblastů a 5-ti populačního diferenciálu. Dále je možné využít optického měření retikulocytů, trombocytů včetně jejich nezralé frakce a vyšetření tělních tekutin. Analyzátory tedy rozlišují jednotlivé druhy a počet krvinek včetně jejich parametrů v periferní krvi. Přestože jsou oba přístroje plně automatizované a spolehlivě pracují v uzavřeném modulu

zpracování, ve kterém jsou schopny za hodinu zpracovat až 100 vzorků, je možné využít i manuálního neboli otevřeného modulu zpracování [62; 63].

Navíc je na Sysmex XN-1500 DI připojen nátěrový a barvicí automat SP-50 a digitální zobrazovací zařízení morfologie buněk Cella Vision DI-60, které u vzorků označených analyzátořem za pozitivní (tj. patologický nález) vytvoří barvený nátěr krve a ten je automaticky mikroskopován. Následně jsou vytvořeny scany jednotlivých nalezených buněk, které jsou dále předběžně klasifikovány [63].

Na obrázku 6 a 7 je možné pozorovat využití hematologické analyzátořy.



*Obrázek 6 – Analyzátoř Sysmex XN-1000 [vlastní zdroj]*



*Obrázek 7 – Analyzátor Sysmex XN-1500 DI [vlastní zdroj]*

Fotografie obou hematologických analyzátorů pořízené na OHKT ÚVN jsou publikované se souhlasem primáře oddělení.

#### **4.3.2 Cobas® pro**

Cobas® pro (výrobce Roche s.r.o.) je plně automatizovaný modulární analyzátor, který poskytuje širokou škálu testů umožňující kvalitativní a kvantitativní analýzu in vitro. Skládá se z přístrojové a softwarové části, která po zařazení vzorků do stojánku a následného průchodu vstupní jednotkou řídí chod vzorků jednotlivými analytickými moduly analyzátoru, což umožňuje v krátkém čase provést velké množství testů [64].

### **4.4 Měření na analyzátoru Sysmex XN-1000 a Sysmex XN-1500 DI**

#### **4.4.1 Princip měření**

Ke stanovení parametrů krevního obrazu jsou využívány různé technologie. Základním principem obou analyzátorů je fluorescenční průtoková cytometrie s použitím laseru ve spojení s impedanční metodou, při které se využívá hydrodynamické fokusace. Dále analyzátor obsahuje pulsní detektor, který měří hematokrit a v neposlední řadě je fotometricky stanovován hemoglobin [65; 66].

Krev je s antikoagulantem po nasátí ze zkumavky separována do tzv. alikvot, což jsou menší části vzorku určené pro různé měřicí kanály. Následuje kombinace vzorku s reagensy, které se zaměřují na specifické vlastnosti krevních elementů. Poté jsou tyto směsi přenášeny do měřících komůrek [66].

- **Fluorescenční průtoková cytometrie**

Fluorescenční průtoková cytometrie je technologie, která umožňuje ve velmi krátkém čase analyzovat jednotlivé buňky nebo částice na základě jejich fyzikálních a chemických vlastností. Po nasátí vzorku krve, jeho rozdělení a nařazení jsou krvinky vystaveny fluorochromům, což jsou speciální fluorescenční barviva, která se specificky vážou na nukleové kyseliny. Suspenze takto fluorescenčně označených buněk prochází úzkou průtokovou komůrkou, kde jsou jednotlivé buňky ozařovány polovodičovým laserovým paprskem. Interakce krvinek s laserem je detekčním zařízením měřena jako přední rozptýlené, boční rozptýlené a boční fluorescenční světlo. Tyto signály nám poskytují informace o množství RNA a DNA v krvince a o velikosti a struktuře buňky. Na základě těchto znalostí lze krvinky třídit. Analyzátoři následně umožňují prezentaci dat pomocí tzv. scattergramů, kde jsou v podobě shluku bodů zaznamenány krvinky s podobnými vlastnostmi. Použité hematologické analyzátoři tuto technologii využívají pro stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů, počtu retikulocytů a normoblastů [67].

Naprosto zásadním použitým hematologickým parametrem pro uskutečnění této bakalářské práce je RET-He, který se stanovuje právě na základě fluorescenční průtokové cytometrie v kanálu RET analyzátorů Sysmex. Působením lyzačního činidla dochází k perforaci buněčné membrány všech krevních elementů, díky čemuž do retikulocytů proniká fluorescenční polymethinové barvivo, které je specifické pro obsažené nukleové kyseliny. Po ozáření retikulocytu paprskovým laserem je měřena míra fluorescenčního signálu, která odpovídá zralosti krvinky. Nezralá krvinka obsahuje oproti zralému erytrocytu vyšší množství RNA, a proto poskytuje vyšší fluorescenční signál. Ekvivalent hemoglobinu v retikulocytech je odvozován z intenzity předního rozptýleného světla této populace buněk, se kterým koreluje [68; 69].



- **Impedanční metoda s hydrodynamickou fokusací**

Tento typ technologie je v analyzátorech od společnosti Sysmex využíván k měření počtu erytrocytů a trombocytů. Metoda hydrodynamické fokusace zajišťuje přívod částic unášených tekutinou do tenkého laminárního toku. Poté jsou jednotlivé krvinky suspenze při průchodu aperturou (tj. otvor o malém průměru) vystaveny elektrickému odporu mezi dvěma elektrodami, čímž se odpor změní. Tato změna je úměrná objemu buňky. Následně je výsledek interpretován ve formě histogramu [70].

- **SLS detekční metoda**

Dnes je stanovení koncentrace hemoglobinu v moderních analyzátorech standardně uskutečňováno pomocí SLS detekční metody využívající analýzy bez kyanidu, který byl dříve součástí reagentů, ale kvůli své toxicitě byl pro rutinní analýzy nahrazen. Mezinárodní výbor pro standardizaci v hematologii (ICSH) doporučuje nyní tuto kyanmethemoglobinovou metodu pouze jako metodu referenční. Současná činidla obsahují laurylsulfát sodný (SLS), což je látka, která lyzuje leukocyty a erytrocyty ve vzorku krve. Nejprve SLS naruší membránu erytrocytu, poté se změní globinová skupina a zoxiduje hem skupina, se kterou sodiumlaurylsulfát vytváří fotometricky detekovatelný komplex [71].

#### 4.4.2 Stanovení potřebných hematologických parametrů

Mimo výše zmíněného HGB a RET-He je nutné získat některé další parametry krevního obrazu, které jsou analyzátozem automaticky odvozeny od těch, co jsou měřeny přímo. Mezi počítané veličiny patří MCV, MCH a MCHC (viz tabulka 1).

*Tabulka 1 – Principy měření použitých hematologických parametrů, převzato a upraveno z [65; 69]*

<b>Parametr</b>	<b>Princip stanovení</b>
HGB	Fotometrické měření
MCV	Výpočet: $MCV = HCT/RBC$
MCH	Výpočet: $MCH = HGB/RBC$
MCHC	Výpočet: $MCHC = HGB/HCT$
RET-He	Fluorescenční průtoková cytometrie

#### 4.4.3 Reagencie

Součástí obou analyzátorů jsou diagnostická činidla, díky kterým je možné provést měření hematologických parametrů. Naprosto nezbytné pro získání kvalitních výsledků je zajištění stability reagensů správným uskladněním a jejich použitím do dosažení data expirace uvedené přímo na originálním obalu činidla. Skladovací teplota se v ÚVN pohybuje v rozsahu od 15 °C do 25 °C, což odpovídá doporučeným předpisům výrobce. Pro měření vzorků krve na Sysmex XN-1000 a Sysmex XN-1500 DI je zapotřebí:

- **CellPack DCL**, což je diluent vhodný k naředění vzorku plné krve pro následné stanovení krevního obrazu, retikulocytů, diferenciálního rozpočtu leukocytů, trombocytů a analýzu tělních tekutin.
- **Fluorocell RET** je fluorescenční barvivo využívané nejen k označení a následnému stanovení retikulocytů, ale i měření počtu trombocytů.
- **Fluorocell PLT** slouží k označení krevních destiček pro následné počítání.
- **Fluorocell WNR** je reagent, která po fluorescenčním označení určuje počet leukocytů, normoblastů a bazofilů.
- **Fluorocell WDF** se používá ke stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů.
- **WNR Lysercell** a **WDR Lysercell** jsou lyzační činidla pro WNR a WDF kanály obou analyzátorů.
- **CellPack DFL** je diluent využívaný společně s činidlem Fluorocell RET pro analýzu retikulocytů nebo v kombinaci s činidlem Fluorocell PLT pro stanovení krevních destiček.
- **Sulfolyser** se používá k automatickému měření koncentrace HGB.
- **CellClean** je prostředek pro očistu analyzátoru.

Veškeré reagenty dodává společnost SYSMEX CZ s.r.o.

#### 4.4.4 Kontrola kvality laboratorního procesu

Lékaři se při diagnostice a sledování léčby onemocnění spoléhají na přesnost a správnost (pravdivost) laboratorních testů. Z tohoto důvodu je povinností každé laboratoře zajistit analytickou spolehlivost laboratorních výsledků, což je ověřováno kontrolou kvality. Interní kontrola kvality spočívá v pravidelném kontrolování preciznosti a pravdivosti analýz a je zajišťována personálem laboratoře. Parametry krevního obrazu

jsou procesem externí kontroly kvality laboratoře kontrolovány dvakrát ročně nezávislou akreditovanou společností k tomu pověřenou – SEKK s.r.o. [72; 73].

#### **4.4.4.1 Interní kontrola kvality**

Pro posouzení přesnosti slouží u obou použitých hematologických analyzátorů referenční vzorky krve XN CHECK od firmy Sysmex, jejichž rozmezí hodnot je výrobcem deklarované. Jsou označeny jako L1, L2 a L3, což odlišuje tři různé koncentrační hladiny měřených parametrů – normální, sníženou a zvýšenou hladinu [73].

Tyto standardizované vzorky krve jsou uchovávány v chladničce při 2–8 °C, což udržuje stabilitu jednotlivých parametrů neotevřeného kontrolního materiálu do data expirace. Vždy před prvotním použitím nové šarže XN CHECK se do přístroje nahrává aktualizované referenční rozmezí odpovídající novému balení.

Kontrola se provádí minimálně jednou denně proměřením alespoň dvou hladin referenčních vzorků za pomoci obou náběrových systémů analyzátoru. Mezi jejich vyndáním z chladničky a samotným měřením musí být minimálně 10 minut temperovány při laboratorní teplotě. Aby bylo možné dosáhnout co nejpřesnějších výsledků, je potřeba jemným převrácením zkumavek promíchat jejich obsah, čímž dochází k homogenizaci stabilizované suspenze krvinek. Po tomto kroku může být uskutečněna samotná analýza kontrolních vzorků, které jsou součástí rutinního provozu a změřeny spolu s běžnými patientskými vzorky.

Výsledky jsou následně přeneseny do regulačních diagramů a softwarem automaticky vyhodnoceny porovnáním s nastavenou povolenou mezí pro daný kontrolní vzorek. Tato maximální přípustná chyba se odvozuje z doporučení Systému externí kontroly kvality (SEKK) a České hematologické společnosti České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně (ČHS ČLS JEP). Nachází-li se některá z hodnot měření mimo tuto povolenou mez, rozhoduje analytik laboratoře o dalších krocích. Veškeré vyhodnocené a vytištěné výsledky interní kontroly kvality podepsané analytikem uchovává laboratoř 5 let od provedení.

Tímto měřením referenčního materiálu je analytikem sledována kontrola správnosti stanovovaných parametrů a kontrola mezilehlé preciznosti, která nám vypovídá

o preciznosti analýzy v čase. Dále dochází k pravidelnému mezipřístrojovému porovnávání výsledků analyzátoru Sysmex XN-1000 a Sysmex XN-1500 DI proměřováním stejných komerčních či patientských vzorků krve. Pro jednotlivé stanovované analyty jsou spočítány průměry, směrodatné odchylky a variační koeficienty, což je následně srovnáváno a vyhodnocováno dle požadavků WHO a ČHS ČLS JEP. V neposlední řadě se jednou ročně v rámci verifikace nebo při nějakém problému vyhodnocuje opakovatelnost analýzy neboli preciznost měření v sérii, což je založeno na opakovaném automatickém změření jednoho vzorku 10krát za sebou během krátkého intervalu [72; 73].

#### 4.4.5 Postup vlastního měření

Před vlastní analýzou patientských vzorků je vždy nejprve potřeba zkontrolovat, zda množství reagentů napojených na analyzátory odpovídá denní potřebě a v případě jejich nedostatku musí být činidla doplněna. Za tímto krokem následuje provedení kontroly čistoty pozadí, což je také označováno jako backgroundcheck test. Jedná se o testování tlaku a vakua v přístrojích a kontrolu užívaných roztoků, čímž se detekuje či vylučuje kontaminace použitých reagentů a měřících komůrek. Testování provádí oba analyzátory automaticky vždy při spuštění. Monitorované maximální přípustné limity jsou:

- WBC do  $0,10 \times 10^9$  l;
- RBC do  $0,02 \times 10^{12}$  l;
- PLT do  $10,00 \times 10^9$  l;
- HGB do 1,0 g/l.

Pokud jsou tyto meze překročeny, kritéria nejsou splněna a analyzátory promývají systém automaticky znovu, protože příliš vysoké hodnoty kontrolovaných parametrů falešně zvyšují tyto hodnoty i při měření biologického materiálu. Po úspěšně provedené kontrole čistoty pozadí jsou přístroje připraveny k analýze kontrolních a patientských vzorků.

Vzorky po přijetí do laboratoře a přidělení čárových kódů měříme pomocí jednoho ze dvou způsobů, které přístroje poskytují. Oba analyzátory mohou pracovat

v manuálním (otevřeném) a automatickém (uzavřeném) režimu. Pro účely této bakalářské práce bylo využito obou způsobů. Aspirovaný objem vzorku se pohybuje kolem 88  $\mu$ l.

Manuální zpracování využíváme především z důvodu malého množství vzorku, kdy je např. při kapilárním odběru odebrán malý objem krve do mikrokepu. Samotnému měření z uzavřené zkumavky předchází desetiminutové míchání pomocí valivé třepačky, což zajišťuje homogenizaci celého obsahu zkumavky. Poté pomocí symbolu **dvou šipek** otevíráme ruční podavač. Na obrazovce dále zaklikneme symbol **dvou zkumavek** a ikonu **Whole Blood**. Náš výběr odsouhlasíme kliknutím na nápis **OK**. Čekáme, dokud analyzátor není připraven na další kroky, což signalizuje zastavení blikání světelné diody. Stisknutím symbolu **ruky držící zkumavku** nastavíme ruční měření a zmáčknutím nápisu **Read ID** umožníme sejmutí čárového kódu analyzátozem automaticky po vložení vzorku nebo tak učiníme sami pomocí ruční čtečky. Po zaškrtnutí nápisu **CAP OPEN** a stisknutí ikony **OK** naposledy jemně promícháváme obsah zkumavky. Následně ji otevíráme a umístíme do aspirační části určené pro otevřený mód. Posledním krokem je stisknutí modrého tlačítka na analyzátoru, čímž je zahájena aspirace.

Standardně je většina vzorků analyzována v automatickém režimu. Nejprve zkumavky manuálně promícháváme jejich jemným obracením dnem vzhůru a poté je zařazujeme do jednotlivých pozic speciálního stojánku označovaného jako rack, který vkládáme do podavače. Vzorky analyzátor automaticky dopravuje a opětovně promíchává. Zkumavka je následně umístěna pod aspirační jehlu, kterou je po propíchnutí uzávěru zahájeno nasávání vzorku.

Po provedení analýzy krve se naměřené hodnoty zobrazují na obrazovce počítače. Poté jsou automaticky přeneseny do IPU Extended (tj. řídicí informační systém od společnosti Sysmex), kde dochází k jejich kontrole a propuštění do LIS. Patologické nálezy systém vyhodnocuje jako pozitivní a obsluha rozhoduje o uvolnění takového výsledku či zopakování měření. Výsledky jsou dále přenášeny do nemocničního informačního systému (NIS).

#### 4.4.6 Referenční rozmezí

Veškeré parametry krevního obrazu, které byly pro vypracování této bakalářské práce použity, jsou spolu se svým referenčním rozmezím uvedeny v tabulce 2. Rozmezí

odpovídají fyziologickým hodnotám dospělých mužů a žen. Informace v této tabulce byly čerpány z laboratorní příručky Oddělení hematologie a krevní transfuze (OHKT) a Oddělení klinické biochemie (OKB) ÚVN, která je v souladu s doporučeným referenčním rozmezím pro krevní obraz ČHS ČLS JEP.

*Tabulka 2 – Referenční rozmezí vybraných parametrů krevního obrazu, převzato a upraveno z [59]*

Parametr krevního obrazu	Zkratka	Referenční rozmezí		Jednotky
		Muži	Ženy	
Hemoglobin	HGB	135–175	120–160	g/l
Střední obsah hemoglobinu v erythrocytech	MCH	28–34	28–34	pg
Střední koncentrace hemoglobinu v erythrocytech	MCHC	320–360	320–360	g/l
Střední objem erythrocytu	MCV	82–98	82–98	fl
Ekvivalent hemoglobinu v retikulocytech	RET-He	28–36	28–36	pg

#### 4.5 Měření na analyzátoru cobas® pro

Analyzátor cobas® pro umožňuje stanovovat výsledky analýzy na základě fotometrie, turbidimetrie, heterogenní imunoanalýzy a iontově selektivních elektrod [64].

Před samotnou analýzou patientských sér laboratorní personál kontroluje a doplňuje reagentie pro denní potřebu. Dále musí být před uvedením přístroje do činnosti provedena denní údržba. Po těchto krocích následuje proměření a zhodnocení výsledků kontrolního materiálu, čímž se ověřuje spolehlivost analýzy. Pokud se hodnoty pohybují ve stanovených mezích, může být započato měření. Výsledky systém analyzátoru automaticky odesílá do LIS, kde jsou poté pověřeným pracovníkem schváleny a předány k distribuci.

Jednotlivé biochemické parametry byly pro účely této bakalářské práce zjištěny proměřeními patientských sér pomocí principů uvedených v tabulce 3.

Tabulka 3 – Principy stanovení použitých biochemických parametrů, převzato a upraveno z [59]

<b>Parametr</b>	<b>Princip stanovení</b>
Železo	Fotometrické měření
Feritin	ECLIA
Transferin	Imunoturbidimetrie
Saturace transferinu železem	Výpočet

#### 4.5.1 Stanovení železa

K fotometrickému určení koncentrace železa ve vzorku lidského séra se využívá souprava IRON2 cobas® Roche/Hitachi.

Princip testu se zakládá na reakci železa s FerroZinem. Před samotným fotometrickým stanovením je vzorek vystaven nízkému pH, čímž se přeruší vazba mezi transferinem a  $\text{Fe}^{3+}$ . Trojmocné železo je následně redukováno askorbátem na železo dvojmocné. To tvoří s FerroZinem barevný komplex, jehož intenzita zabarvení je přímo úměrná množství železa ve vzorku. Komplex je vhodný k fotometrickému stanovení při vlnové délce 570 nm. Z výsledné absorbance systém poté automaticky vypočítá koncentraci stanovovaného analytu [74].

Metoda je kalibrována dvoubodovou lineární kalibrací. Rozsah měření je výrobcem stanoven od 0,90 do 179,0  $\mu\text{mol/l}$ . Pokud hodnota železa ve vzorku převyšuje toto rozmezí, je měření automaticky opakováno se sníženým množstvím vzorku. Tato funkce se nazývá Rerun [74].

#### 4.5.2 Stanovení feritinu

Ke stanovení koncentrace sérového feritinu se využívá souprava Elecsys Ferritin cobas® Roche/Hitachi. Vyšetření je založeno na elektrochemiluminiscenční imunoanalýze (ECLIA) sendvičového typu.

Nejprve antigen ve vzorku reaguje s biotinylovanou monoklonální protilátkou proti feritinu a rutheniovým komplexem označenou monoklonální protilátkou proti feritinu, čímž během první inkubace dochází k vzniku sendvičového komplexu. Přidáním

mikročástic potažených streptavidinem je v průběhu druhé inkubace docíleno vazby mezi komplexem a pevnou fází, což umožňuje interakce mezi streptavidinem a biotinem. Magnetické pole uvnitř měřicí cely zachytává mikročástice s navázanými komplexy a systémový roztok následně všechny nenavázané složky z reakční směsi vyplavuje. Poté přivedené napětí podněcuje chemiluminiscenční emisi fotonů na pracovní elektrodě, což je detekováno fotonásobičem [75].

K vyhodnocení výsledků analýzy se používá master křivka uvedená v čárovém kódu činidla a kalibrační křivka vytvořená pomocí dvoubodové kalibrace. Výrobce definuje rozsah měření mezi 0,5 a 2000  $\mu\text{g/l}$ . Pokud je koncentrace ve vzorku vyšší, analyzátor vzorek pomocí diluentu naředí a změří znovu [75].

#### **4.5.3 Stanovení transferinu**

Hmotnostní koncentrace transferinu se v lidském séru stanovuje imunoturbidimetricky pomocí soupravy TRSF2 cobas® Roche/Hitachi.

Princip měření se zakládá na tom, že lidský transferin vytváří precipitát se specifickou protilátkou. Následně je vzniklý imunoprecipitát stanovován turbidimetricky při vlnové délce 505 nm [76].

Metoda je kalibrována nelineární kalibrací, kterou vyjadřuje exponenciální funkce. Výrobce uvádí, že rozsah testu je od 0,10 do 5,20 g/l. Vzorky s vyšší koncentrací transferinu jsou automaticky ředěny a měřeny znovu [76].

#### **4.5.4 Výpočet saturace transferinu železem**

Saturace železa není měřena přímo, ale její hodnota se stanovuje na základě výpočtu, k jehož uskutečnění je zapotřebí znát hodnotu koncentrace sérového železa ( $\mu\text{mol/l}$ ) a sérového transferinu (g/l). Výpočet saturace transferinu se generuje automaticky, pokud byly tyto k tomu potřebné parametry změřeny [77].



Vzorec saturace transferinu železem:

$$\text{Transferin saturovaný} = 3,98 \cdot S_{Fe}/S_{\text{Transferin}}$$

Výslednou jednotkou tohoto vzorce jsou procenta [77].

#### 4.5.5 Referenční rozmezí

Referenční rozmezí všech biochemických parametrů použitých pro účely této bakalářské práce jsou uvedené v tabulce 4. Zdrojem těchto informací je laboratorní příručka OHKT a OKB ÚVN. Rozmezí odpovídají fyziologickým hodnotám dospělých mužů a žen a jsou v souladu s doporučeným referenčním rozmezím České společnosti klinické biochemie České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně (ČSKB ČLS JEP) a výrobce Roche. Dále je v tabulce zohledněno i to, že se u žen referenční hodnoty feritinu v průběhu života mění.

*Tabulka 4 – Referenční rozmezí použitých biochemických parametrů, převzato a upraveno z [59]*

Biochemický parametr	Referenční rozmezí		Jednotky
	Muži	Ženy	
Železo	7,2–29,0	6,6–28,0	μmol/l
Feritin	30–400	13–150 (15–50 let) 20–400 (nad 50 let)	μg/l
Transferin	2,0–3,6	2,0–3,6	g/l
Saturace transferinu	16–45	16–45	%

## 5 VÝSLEDKY

Výsledky této bakalářské práce vycházejí z devíti měřených hematologických a biochemických parametrů, které byly získány proměřením patientských vzorků pomocí analyzátorů Sysmex XN-1000, Sysmex XN-1500 DI a cobas® pro. Těmi vyšetřovanými parametry jsou:

- RET-He (ekvivalent hemoglobinu v retikulocytech);
- MCHC (střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytech);
- HGB (hemoglobin);
- MCV (střední objem erytrocytu);
- MCH (střední obsah hemoglobinu v erytrocytech);
- sérové železo;
- saturace transferinu;
- transferin;
- feritin.

Získaná data byla statisticky zpracována a vyhodnocena pomocí programu Statistica 12 (StatSoft-Dell, Tulsa, USA) a Microsoft Office EXCEL (Microsoft, USA).

### 5.1 Statistické zpracování souboru naměřených dat

Součástí vyhodnocení byla využita deskriptivní (popisná) statistika, která slouží k numerickému nebo grafickému shrnutí vlastností souboru dat, což jsou v našem případě naměřená primární data.

V tabulce 5 je předložen počet platných proměnných ( $n$ ) statistického souboru. Dále jsou zde uvedena data, která byla získána statistickými výpočty z naměřeného souboru dat. Konkrétně byl pro popisnou statistiku využit průměr, medián, minimum (Min), maximum (Max), dolní kvartil, horní kvartil, rozptyl a směrodatná odchylka (SD).

Tabulka 5 – Deskriptivní (popisná) statistika naměřených dat [vlastní zdroj]

Popisné statistiky									
Proměnná	n	Průměr	Medián	Min	Max	Dolní kvartil	Horní kvartil	Rozptyl	SD
RET-He	979	33,3767	34,8000	11,7000	46,1000	31,5000	36,6000	29,9	5,4639
MCHC (g/l)	1837	335,4023	336,0000	240,0000	396,0000	328,0000	345,0000	285,8	16,9060
HGB (g/l)	1836	127,3769	132,0000	38,0000	195,0000	112,0000	146,0000	674,7	25,9756
MCV (fl)	1841	87,7511	87,9000	53,2000	128,8000	84,3000	91,3000	56,0	7,4808
MCH (pg)	1846	29,4802	29,8000	12,7000	44,1000	28,2000	31,2000	10,7	3,2722
Fe (μmol/l)	338	13,8756	13,4500	1,1800	53,5000	7,8700	17,8000	69,2	8,3175
Saturace transferinu (%)	222	21,1673	18,4100	1,6500	85,6500	9,5500	28,2700	242,0	15,5569
Transferin (g/l)	223	2,7508	2,7100	0,8900	4,5600	2,2700	3,2700	0,5	0,6837
Feritin (μg/l)	283	201,0552	67,9000	2,1000	3828,0000	20,2000	211,0000	172558,4	415,4015

Před použitím samotného statistického testu musí být posouzena normalita rozdělení hodnot souboru. K ověření normality naměřených dat bylo využito K-S (Kolmogorov-Smirnov) testu a Lillieforsova testu. K vizuálnímu rozložení všech hodnot daného souboru slouží jejich zobrazení pomocí histogramu, který je proložen červeně vyznačenou Gaussovou křivkou.

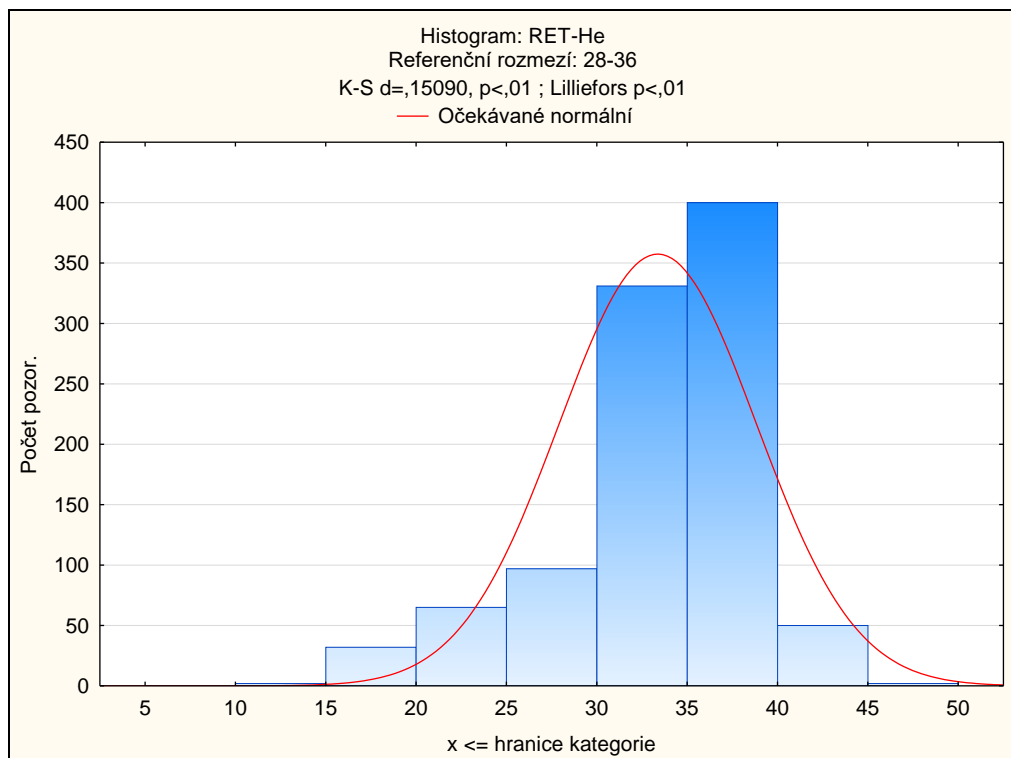
Histogramy pro ověření normality jsou uvedeny v podkapitole 5.1.1.

Pro interpretaci rozložení dat byly dále použity box-ploty neboli krabicové grafy, které nám názorně graficky zobrazují numerická data – minimum, maximum, horní a dolní kvartil, medián a případné extrémní hodnoty. Na rozdíl od histogramu nám jejich grafické rozložení umožňuje porovnávat několik sad dat najednou, což je využito v kapitole 5.1.2

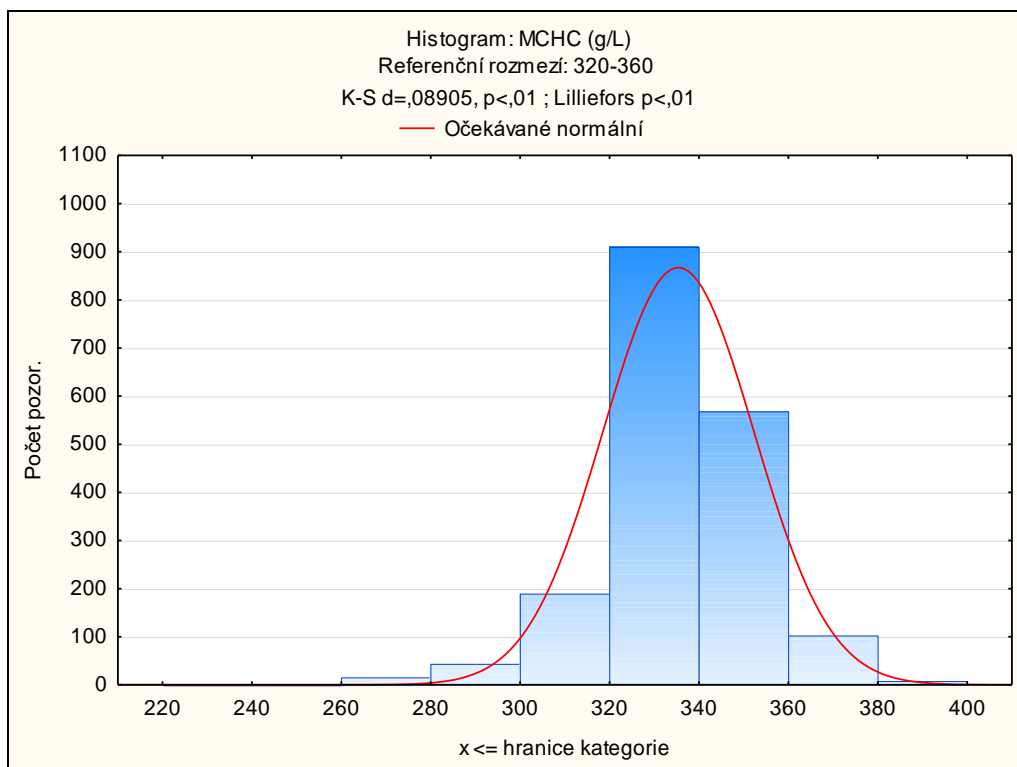
až 5.1.9 při porovnávání RET-He s výše zmíněnými parametry. Ve stejných kapitolách bylo také pro posouzení párových vztahů mezi RET-He a výše zmíněnými parametry využito bodových grafů neboli korelačních diagramů, které popisují statistickou závislost proměnných a zobrazují jejich korelaci (vzájemný vztah).

### 5.1.1 Ověření normality pomocí histogramů

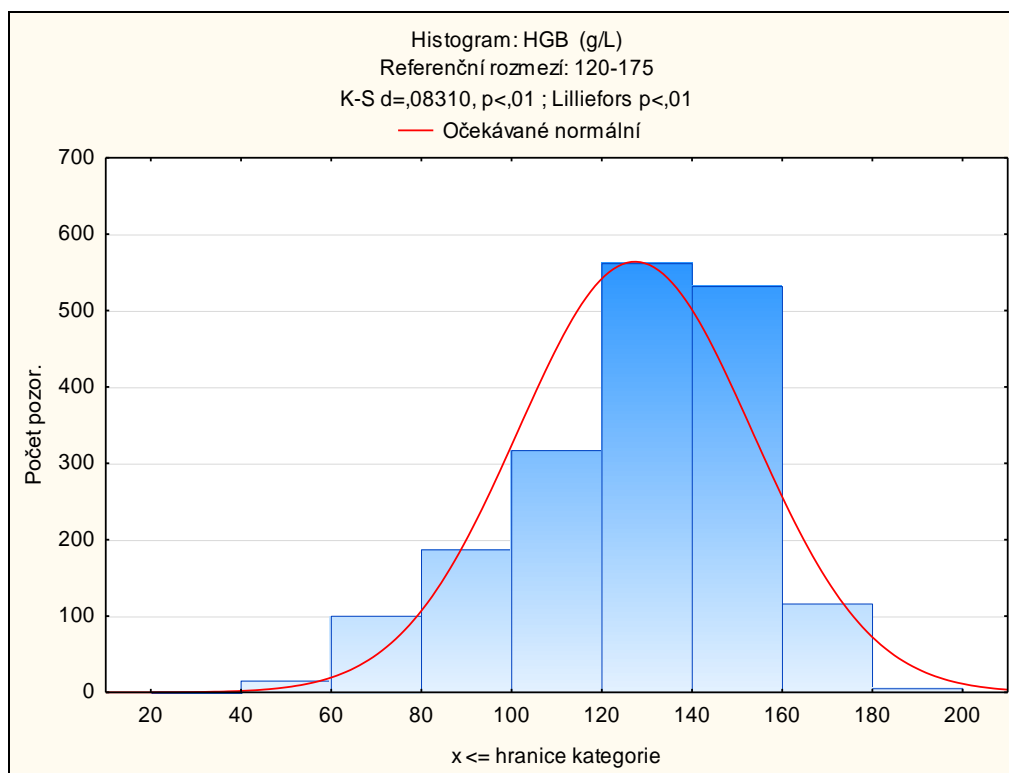
V této podkapitole jsou na obrázcích 8 až 16 histogramy, které byly využity k posouzení normálního rozložení dat jednotlivých naměřených souborů. Každý histogram je proložen Gaussovou křivkou, která znázorňuje normální rozložení hodnot. Většina p-hodnot je menších než 0,05. Jedinou výjimkou je histogram z naměřených dat transferinu (obrázek 15), kde je p-hodnota vyšší než 0,05.



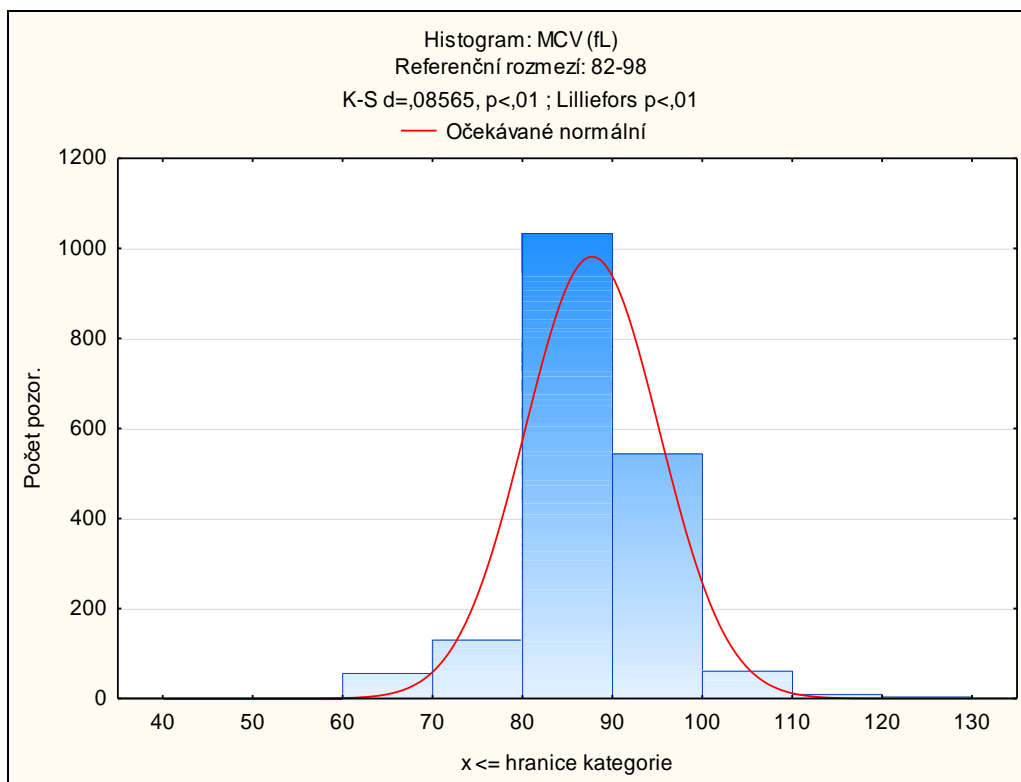
Obrázek 8 – Histogram RET-He [vlastní zdroj]



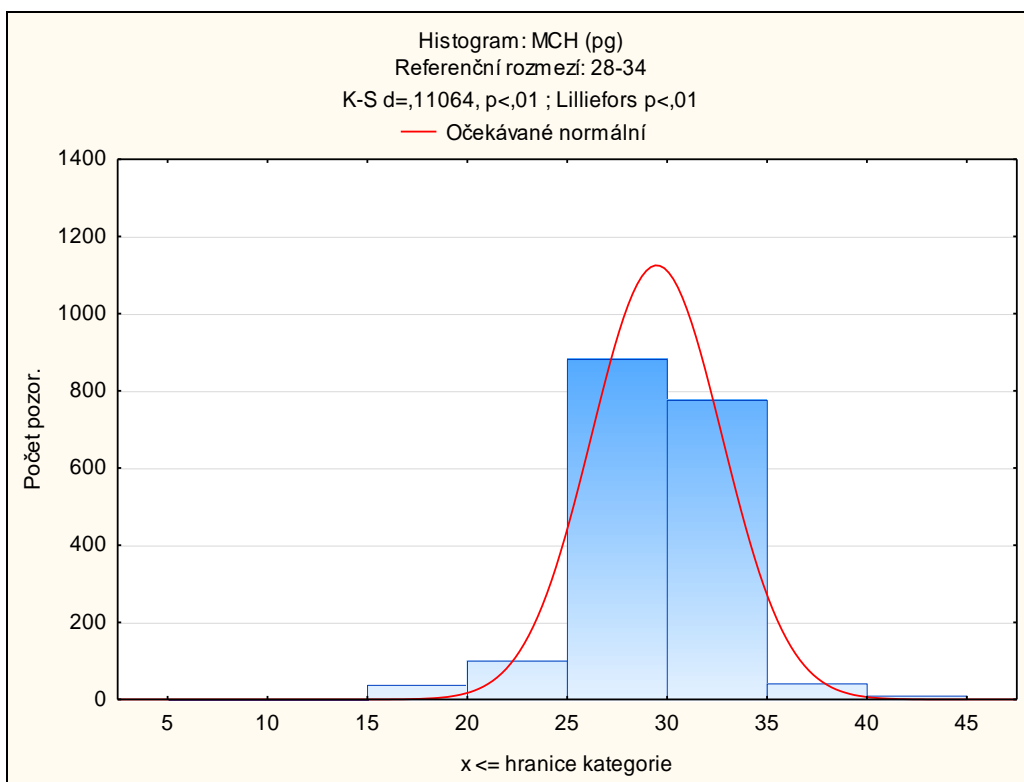
Obrázek 9 – Histogram MCHC [vlastní zdroj]



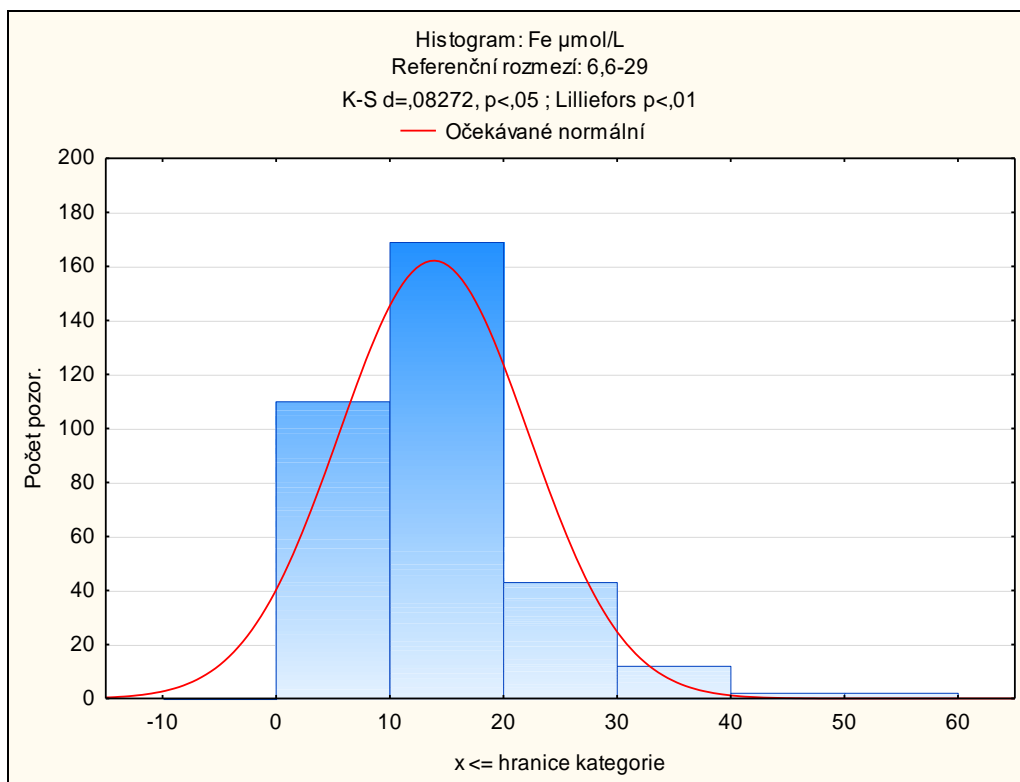
Obrázek 10 – Histogram HGB [vlastní zdroj]



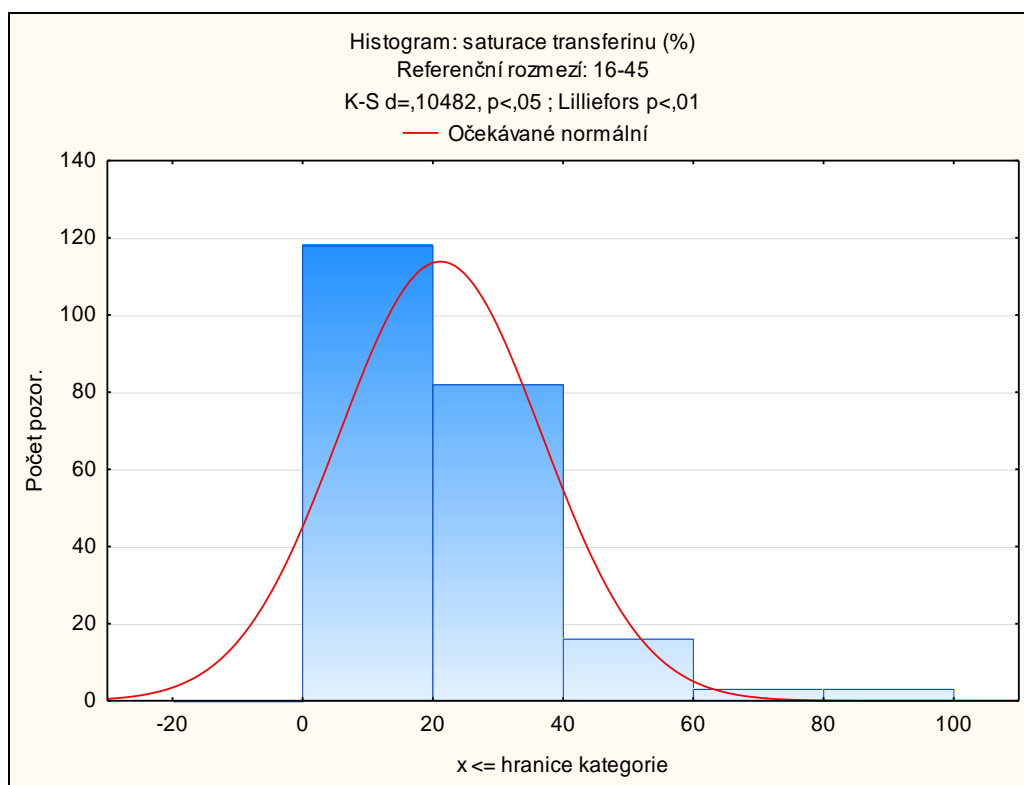
Obrázek 11 – Histogram MCV [vlastní zdroj]



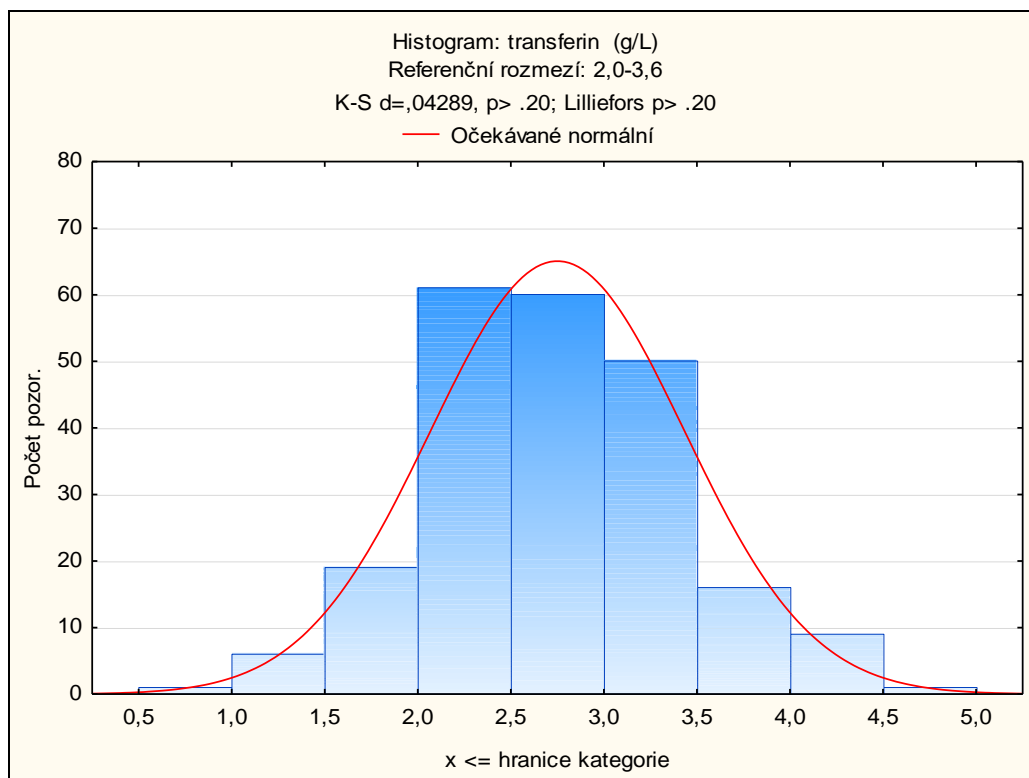
Obrázek 12 – Histogram MCH [vlastní zdroj]



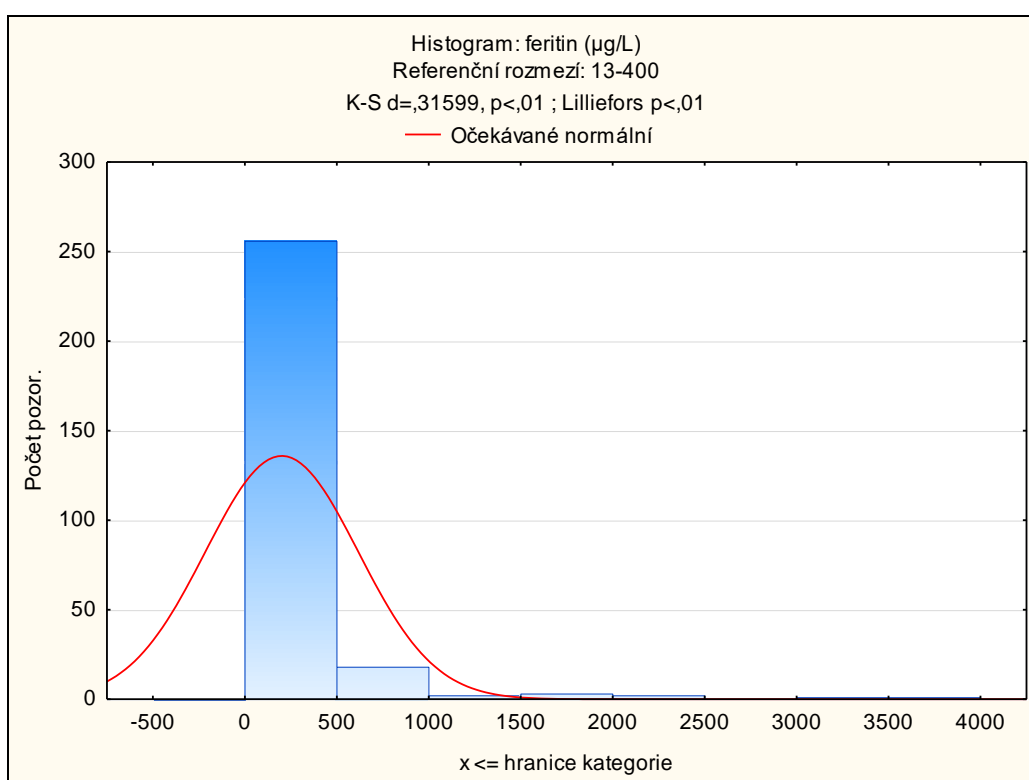
Obrázek 13 – Histogram Fe [vlastní zdroj]



Obrázek 14 – Histogram saturace transferinu [vlastní zdroj]



Obrázek 15 – Histogram transferinu [vlastní zdroj]

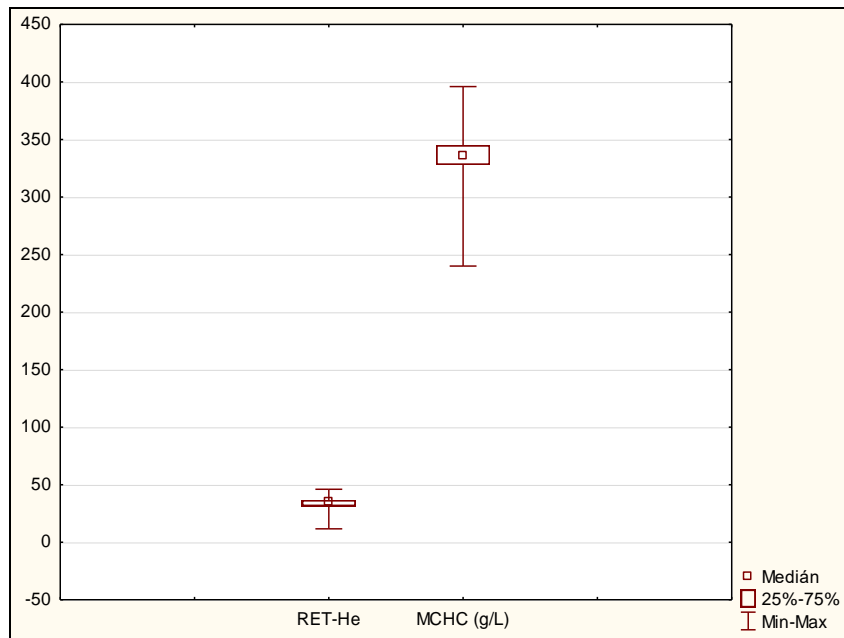


Obrázek 16 – Histogram feritinu [vlastní zdroj]

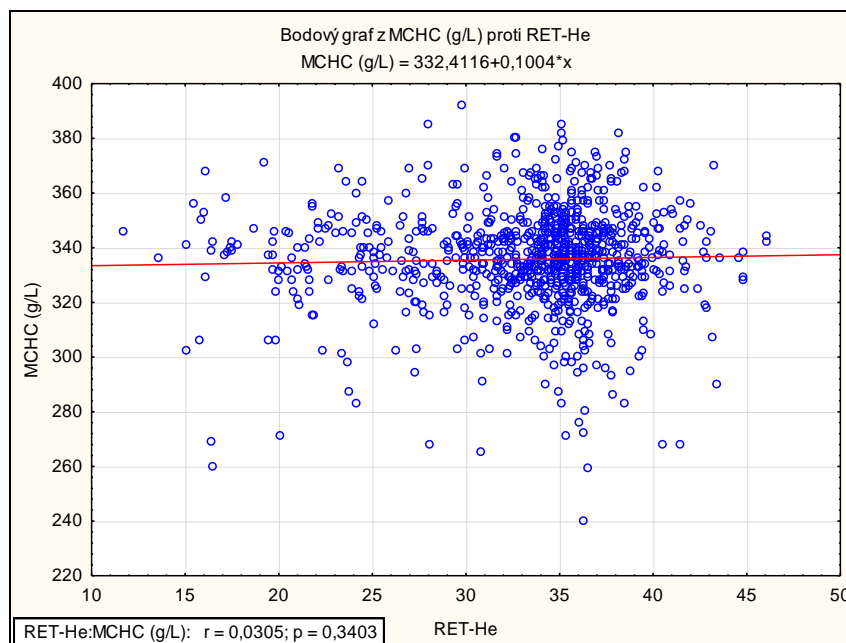


### 5.1.2 Statistické srovnání RET-He a MCHC

Na obrázku 17 jsou box-ploty znázorňující rozložení hodnot parametrů RET-He a MCHC. Výsledky MCHC jsou oproti RET-He daleko více rozptýlené, což vizualizuje číselný údaj o rozptýlení dat v tabulce 5. Na obrázku 17 je zobrazen vztah mezi RET-He a MCHC pomocí bodového grafu, který ukazuje slabou kladnou korelaci mezi soubory.



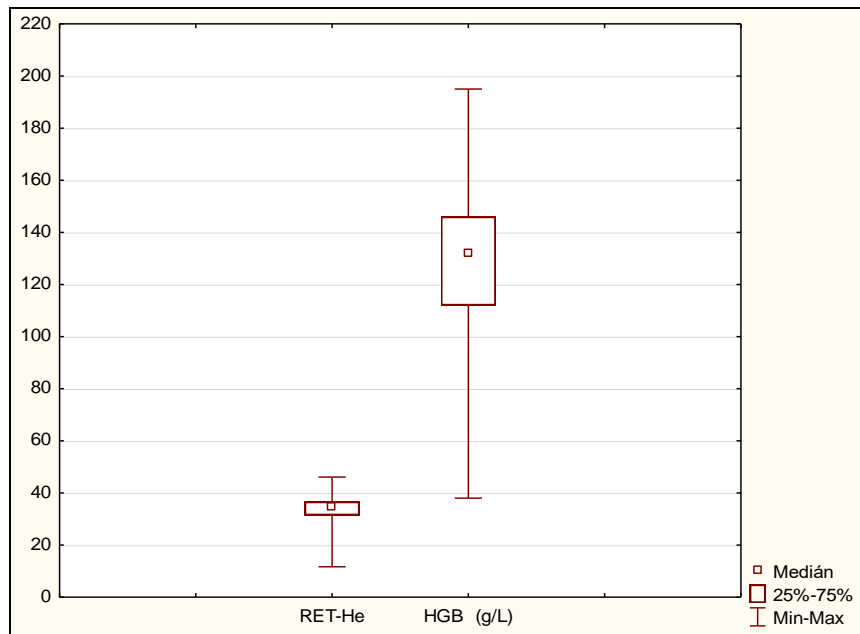
Obrázek 17 – Srovnání box-plotů RET-He a MCHC [vlastní zdroj]



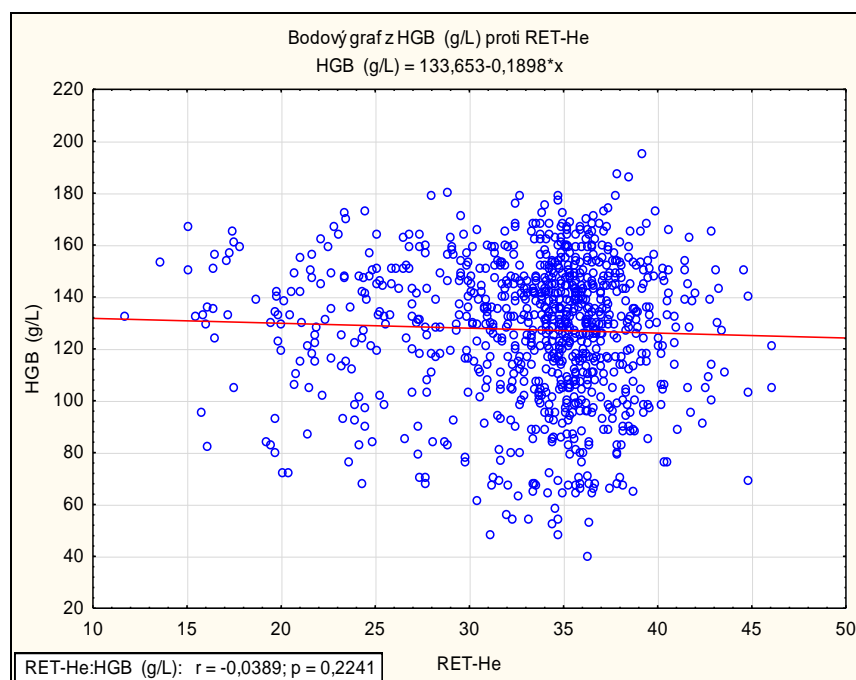
Obrázek 18 – Bodový graf z MCHC proti RET-He [vlastní zdroj]

### 5.1.3 Statistické srovnání RET-He a HGB

Na obrázku 19 jsou vyobrazeny box-ploty, u kterých je jako v předchozí podkapitole opět zřetelný rozdíl rozptýlů mezi souborem RET-He a HGB. Obrázek 20 interpretuje rozptýlenost dat korelačním diagramem z HGB proti RET-He. Mezi soubory je přítomná slabá záporná korelace.



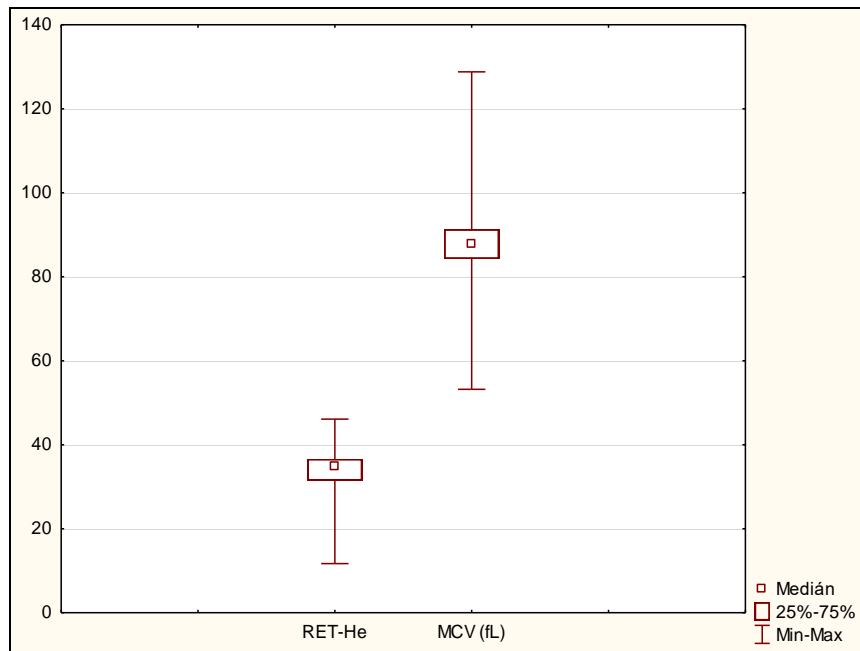
Obrázek 19 – Srovnání box-plotů RET-He a HGB [vlastní zdroj]



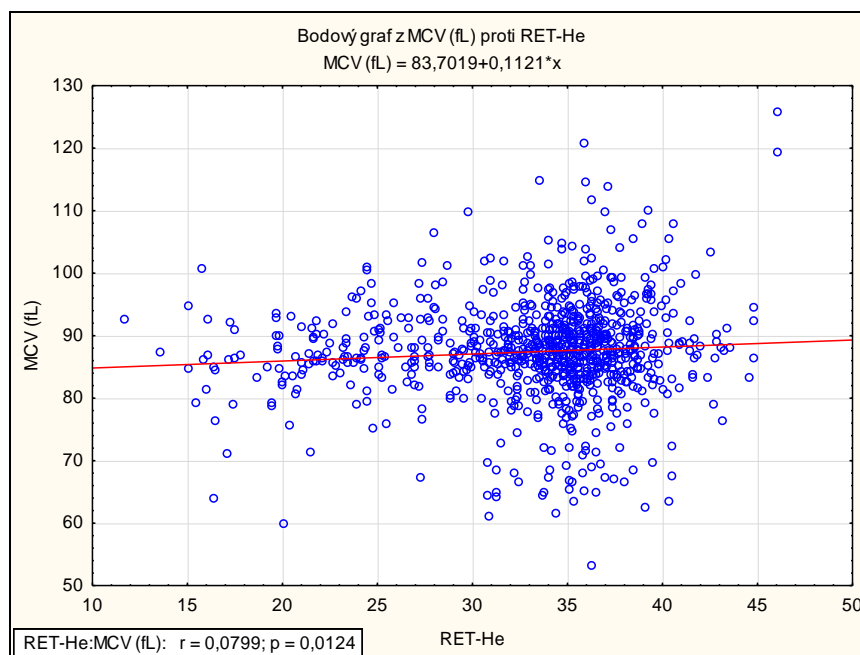
Obrázek 20 – Bodový graf z HGB proti RET-He [vlastní zdroj]

### 5.1.4 Statistické srovnání RET-He a MCV

Následující obrázky 21 a 22 rozebírají parametry RET-He a MCV. Na obrázku 21 je distribuce dat prezentována pomocí krabicových grafů, na kterých je možné spatřit, že rozptyl souboru hodnot MCV je menší než u MCHC či HGB. Bodový graf z MCV proti RET-He na obrázku 22 zobrazuje statisticky významnou kladnou korelaci.



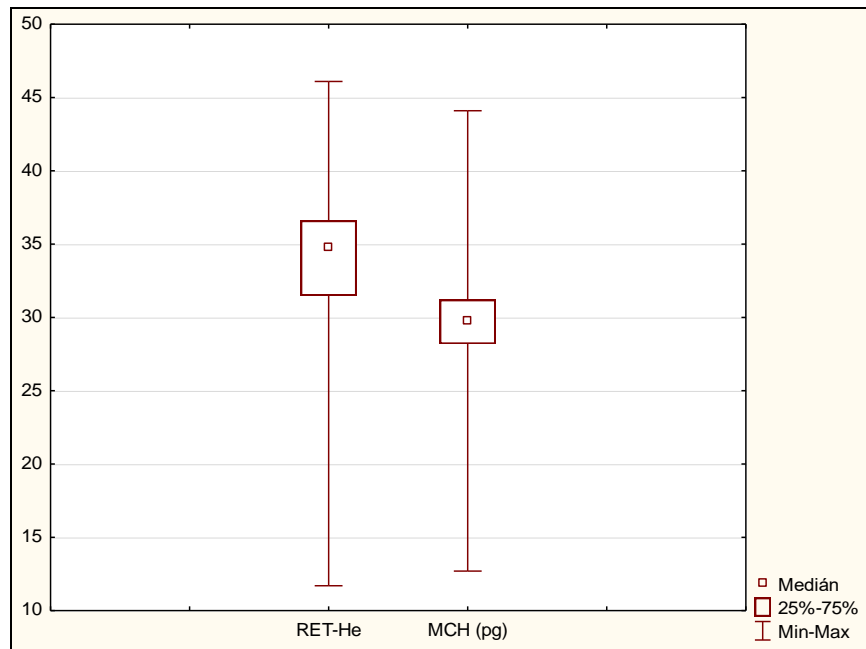
Obrázek 21 – Srovnání box-plotů RET-He a MCV [vlastní zdroj]



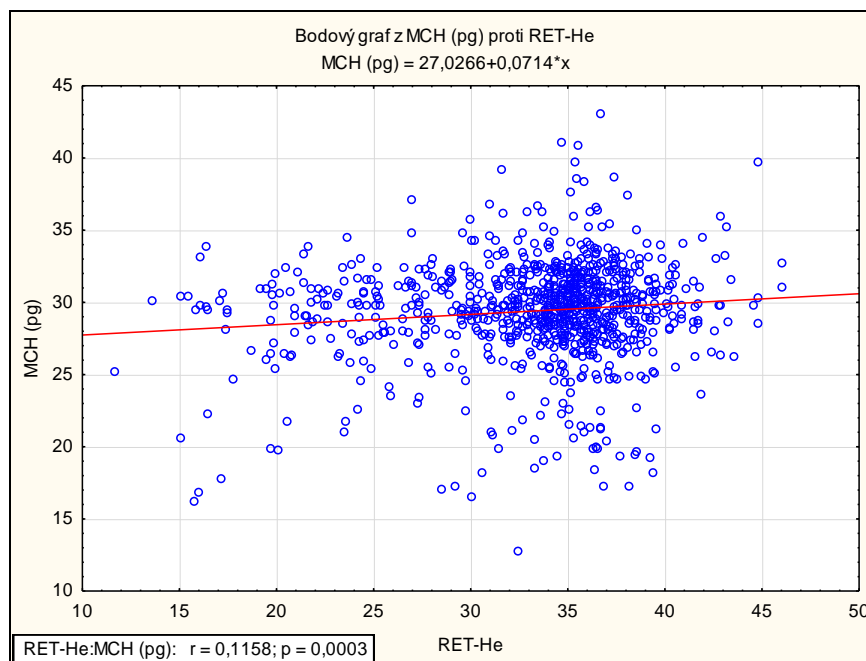
Obrázek 22 – Bodový graf z MCV proti RET-He [vlastní zdroj]

### 5.1.5 Statistické srovnání RET-He a MCH

Obrázek 23 srovnává box-ploty získaných dat parametrů RET-He a MCH. Je zde graficky znázorněno, že rozptyl hodnot MCH je menší než u parametru RET-He, což potvrzuje číselné údaje v tabulce 5. Pomocí bodového grafu z MCH proti RET-He na obrázku 24 zjišťujeme, že je mezi soubory statisticky významná kladná korelace.



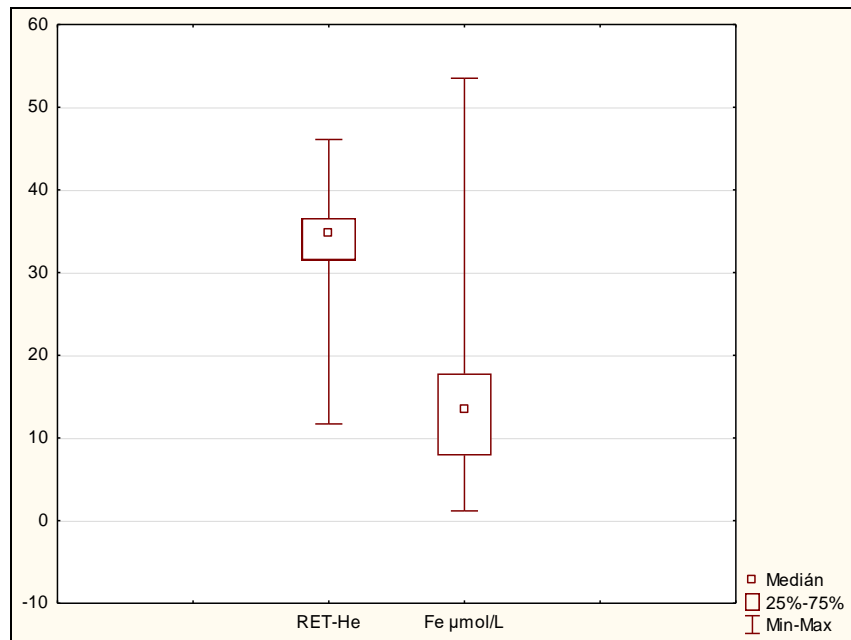
Obrázek 23 – Srovnání box-plotů RET-He a MCH [vlastní zdroj]



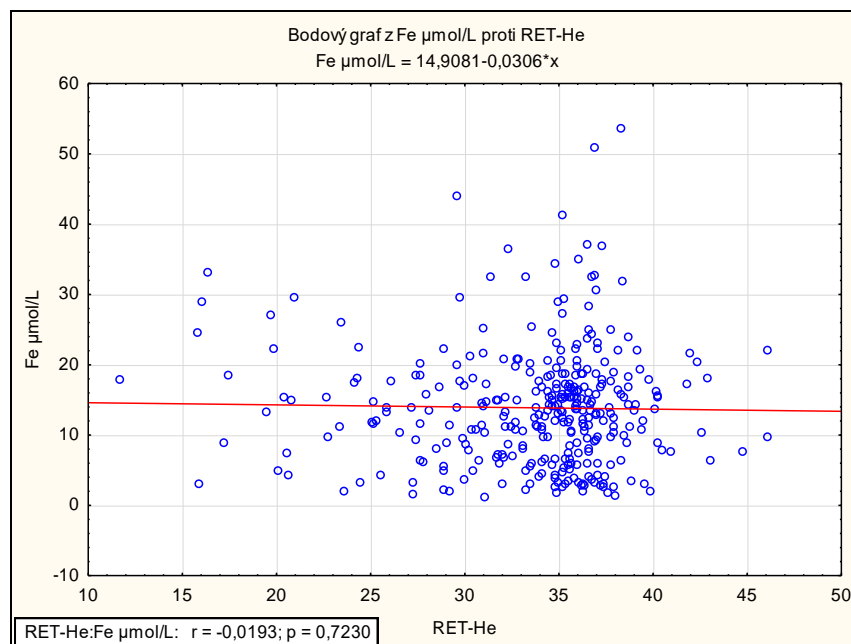
Obrázek 24 – Bodový graf z MCH proti RET-He [vlastní zdroj]

### 5.1.6 Statistické srovnání RET-He a Fe

Obrázek 25, kde jsou srovnávány box-ploty pro soubory dat RET-He a sérového železa, ukazuje, že rozptyl hodnot Fe je širší než u RET-He a je široký především díky hodnotám, které se nacházejí nad horním kvantilem souboru. Na obrázku 26 je znázorněn bodový graf z Fe proti RET-He, kde je možné vidět pouze slabou zápornou korelaci.



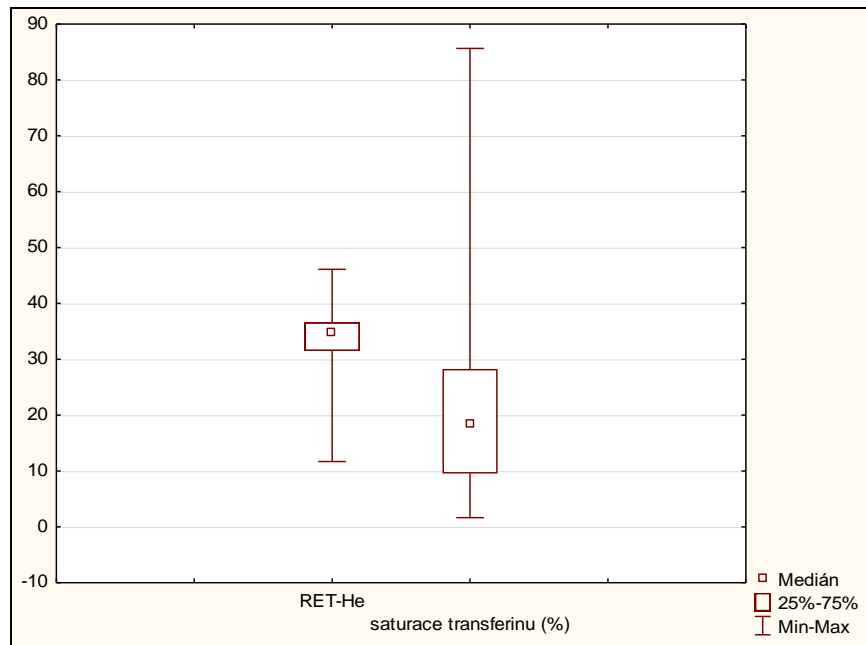
Obrázek 25 – Srovnání box-plotů RET-He a Fe [vlastní zdroj]



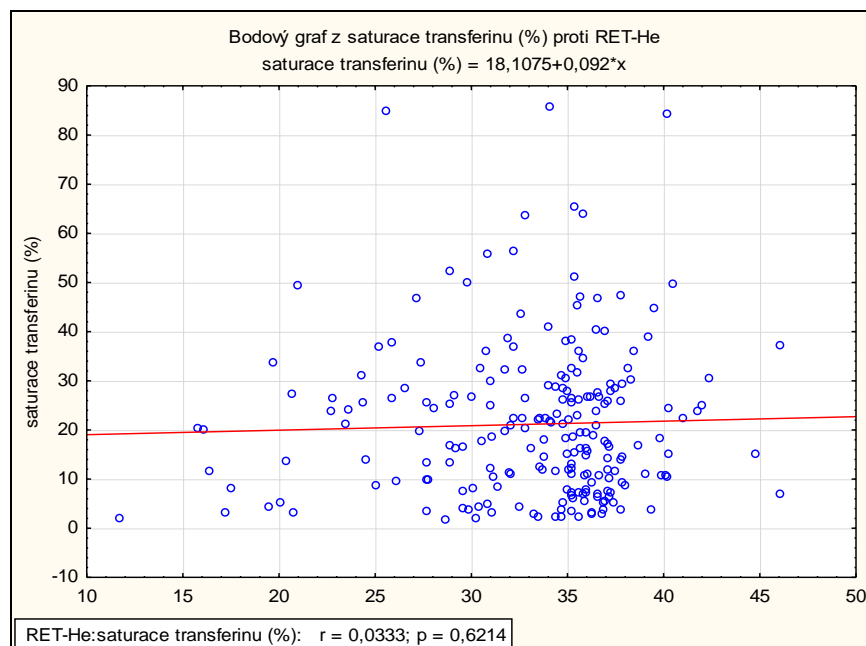
Obrázek 26 – Bodový graf z Fe proti RET-He [vlastní zdroj]

### 5.1.7 Statistické srovnání RET-He a saturace transferinu

Na obrázku 27 jsou pomocí box-plotů graficky rozloženy soubory RET-He a saturace transferinu. Hodnoty saturace transferinu jsou více rozptýlené, a to opět především díky hodnotám nacházejících se nad horním kvartilem. Obrázek 28 zobrazuje bodový graf ze saturace transferinu proti RET-He, kde je viditelná pouze slabá kladná korelace.



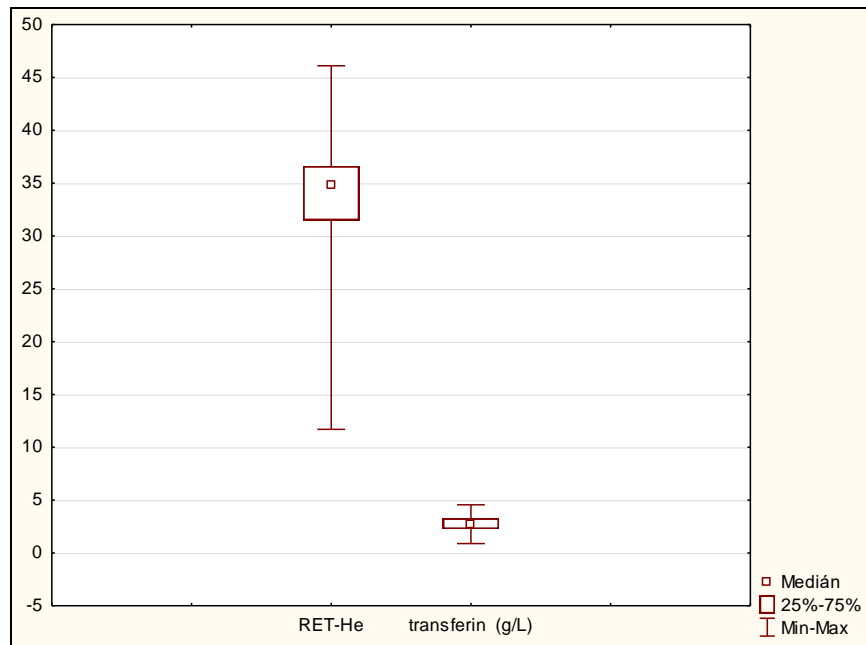
Obrázek 27 – Srovnání box-plotů RET-He a saturace transferinu [vlastní zdroj]



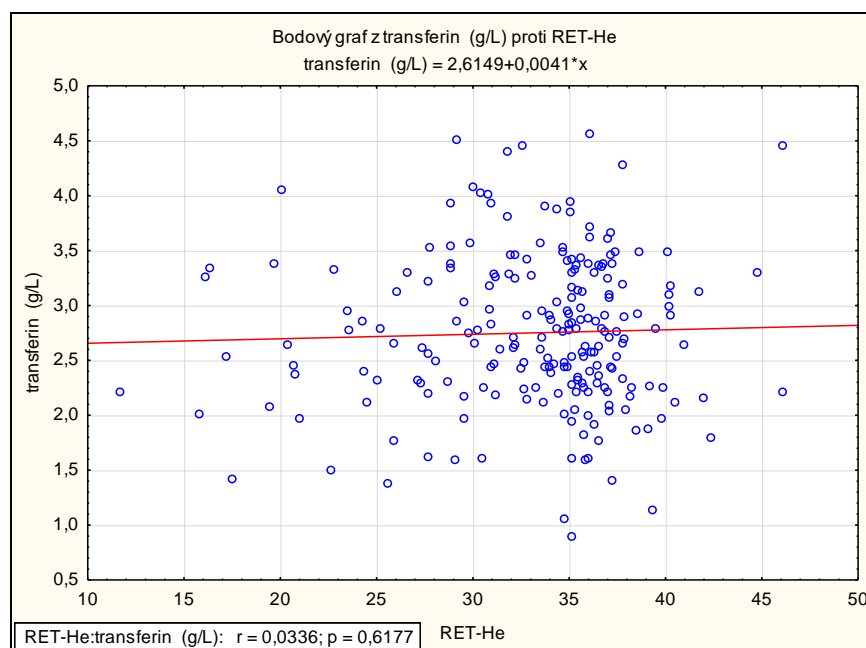
Obrázek 28 – Bodový graf ze saturace transferinu proti RET-He [vlastní zdroj]

### 5.1.8 Statistické srovnání RET-He a transferinu

Krabicové grafy proměnných transferinu a RET-He jsou uvedeny na obrázku 29. Box-plot transferinu ukazuje velmi úzký rozptyl naměřených hodnot. Korelačním diagramem z transferinu proti RET-He na obrázku 30 prokazujeme slabou kladnou korelaci, která není příliš statisticky významná.



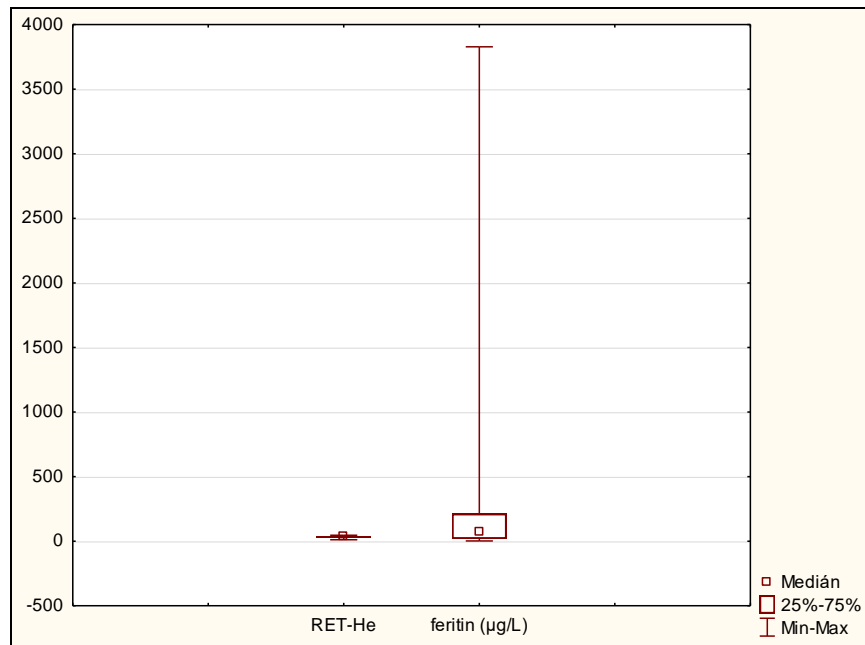
Obrázek 29 – Srovnání box-plotů RET-He a transferinu [vlastní zdroj]



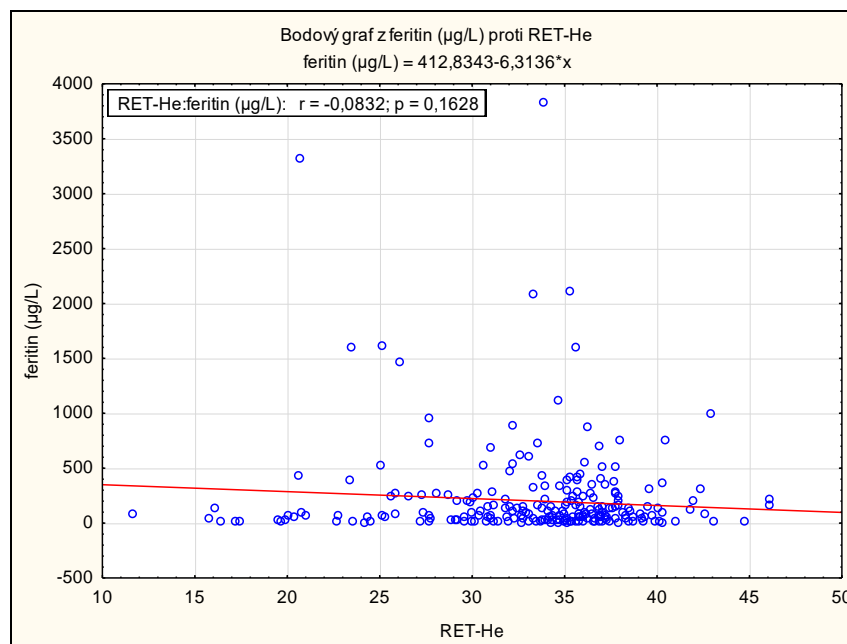
Obrázek 30 – Bodový graf z transferinu proti RET-He [vlastní zdroj]

### 5.1.9 Statistické srovnání RET-He a feritinu

Posledním statisticky srovnávaným parametrem s RET-He je feritin. U feritinu bylo naměřené široké rozmezí proměnných, které se nacházely především nad horním kvantilem hodnot. Box-ploty je možné hodnotit na obrázku 31. Bodový graf z feritinu proti RET-He na obrázku 32 ukazuje nepříliš statisticky významnou slabou zápornou korelaci.



Obrázek 31 – Srovnání box-plotů RET-He a feritinu [vlastní zdroj]



Obrázek 32 – Bodový graf z feritinu proti RET-He [vlastní zdroj]



### 5.1.10 Spearmanovy korelace

V dalším kroku analýzy dat jsem použila Spearmanovy korelace. Jedná se o neparametrickou metodu, pomocí které jsem vyhodnotila statistickou závislost (korelaci) mezi RET-He a zbylými proměnnými. Tyto korelace jsou velmi odolné vůči odchýlkám od normality, a to bylo hlavním důvodem jejich použití v této práci.

K hodnocení těsnosti shody proměnných je potřeba Spearmanova pořadového korelačního koeficientu, u kterého není nutné znát naměřené hodnoty, ale stačí určit jejich pořadí. Je označován pomocí řeckého písmena  $\rho$  (rho) nebo  $r_s$  a může nabývat hodnot od -1 do +1, přičemž čím blíže je hodnota nule, tím slabší je vztah mezi proměnnými. Pozitivní korelace vypovídají o tom, že se proměnné paralelně snižují nebo zvyšují a negativní korelace ukazuje, že jedna proměnná klesá, zatímco druhá stoupá.

V tabulce 6 jsou uvedeny Spearmanovy korelační koeficienty pro všechny proměnné našeho souboru, které vypočítal software statistického programu Statistica 12. Zároveň s tím byl automaticky proveden test statistické významnosti, který určil, zda spolu proměnné na hladině významnosti  $p < 0,05000$  korelují či nikoliv. Pokud byl test programem vyhodnocen za signifikantní, tak byla výsledná hodnota Spearmanova korelačního koeficientu v tabulce zvýrazněna červeně. Statisticky nevýznamné korelace jsou označeny černě. Naše pozornost je v této práci zaměřena především na vztah mezi RET-He s dalšími parametry, které jsou uvedené v tabulce. Zkoumání vztahů těchto ostatních parametrů mezi sebou není cílem této bakalářské práce, a proto nebudou dále rozebírány. Z tabulky 6 je tedy patrné, že s RET-He významně koreluje MCV a MCH. Tyto statisticky významné korelace jsou v tabulce 6 zvýrazněny červeným tučným písmem.

Tabulka 6 – Spearmanovy korelace [vlastní zdroj]

Spearmanovy korelace ChD vynechány párově Označ. korelace jsou významné na hl. $p < 0,05000$									
Proměnná	RET-He	MCHC (g/l)	HGB (g/l)	MCV (fl)	MCH (pg)	Fe ( $\mu\text{mol/l}$ )	Saturace transferinu (%)	Transferin (g/l)	Feritin ( $\mu\text{g/l}$ )
RET-He	1,000000	0,018460	-0,045480	<b>0,067691</b>	<b>0,069718</b>	0,020186	-0,000102	-0,029869	0,005712
MCHC (g/l)	0,018460	1,000000	<b>0,094932</b>	0,028804	-0,016994	-0,046526	0,009206	-0,083735	-0,049418
HGB (g/l)	-0,045480	<b>0,094932</b>	1,000000	0,001865	-0,021331	-0,092306	<b>-0,155307</b>	-0,097900	-0,060729
MCV (fl)	<b>0,067691</b>	0,028804	0,001865	1,000000	0,000820	<b>0,110083</b>	-0,068838	-0,090878	0,053301
MCH (pg)	<b>0,069718</b>	-0,016994	-0,021331	0,000820	1,000000	0,049030	0,076779	-0,003212	-0,092379
Fe ( $\mu\text{mol/l}$ )	0,020186	-0,046526	-0,092306	<b>0,110083</b>	0,049030	1,000000	-0,019081	-0,085772	0,045717
Saturace transferinu (%)	-0,000102	0,009206	<b>-0,155307</b>	-0,068838	0,076779	-0,019081	1,000000	-0,114263	0,069378
Transferin (g/l)	-0,029869	-0,083735	-0,097900	-0,090878	-0,003212	-0,085772	-0,114263	1,000000	-0,084650
Feritin ( $\mu\text{g/l}$ )	0,005712	-0,049418	-0,060729	0,053301	-0,092379	0,045717	0,069378	-0,084650	1,000000

## 6 DISKUZE

RET-HE je rozšířený parametr krevního obrazu, který informuje o obsahu hemoglobinu v retikulocytech. Vzhledem k tomu, že se jedná o poslední vývojové stádium červené krvinky, které je ještě schopné syntetizovat hemoglobin, tak stanovení RET-He vypovídá o erytropoéze v posledních 3–4 dnech. Z tohoto důvodu by podle nejnovějších studií mohl být i ideálním časným markerem k diagnostice sideropenické anémie, při které dochází k porušení erytropoézy vlivem nedostatku železa nebo ukazatelem správné léčby tohoto onemocnění.

V současné době se laboratorní diagnostika sideropenické anémie opírá především o parametry krevního obrazu spolu s kombinací parametrů monitorující metabolismus železa.

Jak již bylo výše zmíněno, cílem této bakalářské práce bylo posoudit hypotetický vztah mezi běžně užívanými hematologickými a biochemickými parametry pro diagnostiku sideropenické anémie s ekvivalentem hemoglobinu v retikulocytech. Následující odstavce jsou věnovány zhodnocení statistického souboru naměřených dat a porovnání našich závěrů s dostupnou literaturou.

Pro zhodnocení našich dat byla využita deskriptivní (popisná) statistika. Její vyhodnocení v podobě číselných údajů pro jednotlivé parametry je možné zhodnotit v tabulce 5 v kapitole 5.1. V tabulce jsou popsány míry polohy a variability naměřených dat jednotlivých parametrů, kterými jsou RET-He, MCHC, HGB, MCV, MCH, Fe, saturace transferinu, transferin a feritin. Je možné zde posoudit minimální a maximální naměřené hodnoty jednotlivých parametrů. Z těchto hodnot je patrná vysoká variabilita měřeného souboru. Tu je možné posoudit i z výsledných rozptylů, které například u feritinu dosahují velmi vysoké hodnoty. Z dat v tabulce lze také vyčíst, že soubory se mediánem a průměrem většinou nacházely ve fyziologickém rozmezí.

Číselné údaje byly interpretovány v podobě grafů, které jsou na obrázcích 8 až 16 v podkapitole 5.1.1. Výsledné histogramy na obrázcích ukazují nejen rozložení naší populace, ale je podle nich i možno určit, jedná-li se o normální rozdělení či nikoliv. Jediným parametrem, jehož hodnoty odpovídaly normálnímu rozdělení, byl transferin

(obrázek 15). Z tohoto důvodu byly využity Spearmanovy korelace, které jsou vůči odchylkám od normality odolné.

Následně jsme v podkapitolách 5.1.2 až 5.1.9 statisticky porovnali RET-He s ostatními parametry pomocí box-plotů. Krabicové grafy jsou vždy ohraničeny dolním a horním kvantilem a v boxu je symbolem čtverce znázorněn medián. Pomocí tzv. „vousů“ je možno zobrazit rozsah hodnot daného souboru. Jedná se tedy o vizualizaci číselných údajů v tabulce 5. Pomocí box-plotů byly naměřené hodnoty jednotlivých parametrů porovnány s RET-He. Například na obrázku 29 je možné pozorovat, že rozptyl dat transferinu je oproti RET-He užší. Ovšem většinou tomu bylo naopak. Největší rozptyl byl zaznamenán u feritinu, který byl tak velký, že jednotlivé části box-plotu parametru RET-He nejsou rozpoznatelné (viz obrázek 31). Také bylo využito bodových grafů, pomocí kterých jsme zjistili vzájemný vztah obou parametrů. Většina parametrů s RET-He korelovala jen slabě, což je statisticky nevýznamné. Výjimku tvoří srovnání RET-He s MCV a RET-He s MCH, což jsme zjistili podle výsledných p-hodnot, která při srovnání RET-He s MCV byla 0,0124 a u srovnání RET-He s MCH tato hodnota činila 0,0003. V obou případech jsou p-hodnoty menší než 0,05, a proto je nalezená korelace mezi soubory statisticky významná.

Tento závěr potvrzují i Spearmanovy korelace, které jsou prezentované v tabulce 6. Obsahuje korelační koeficienty vypočítané programem Statistica 12. Na základě statistické významnosti určil také, zda spolu proměnné na hladině významnosti ( $p < 0,05000$ ) korelují. V našem případě byla opět zaznamenána statisticky významná korelace mezi RET-He a MCV, kde korelační koeficient odpovídá hodnotě 0,067691 a mezi RET-He a MCH, kde je korelační koeficient 0,069718.

Závěrem našeho statistického srovnání tedy je, že byl nalezen vzájemný vztah mezi námi sledovaným ekvivalentem hemoglobinu v retikulocytech a středním objemem erytrocytu a zároveň byl nalezen i vztah mezi ekvivalentem hemoglobinu v retikulocytech a středním množstvím hemoglobinu v erytrocytech.

V současné době v souvislosti s RET-He existuje poměrně velké množství studií, které se snaží různými způsoby prokázat užitečnost tohoto parametru. Příkladem takové literatury je článek z roku 2017, kde se autor Yasumichi Toki s kolektivem zaměřil na

využití RET-He při diagnostice anémie z nedostatku železa. V dalším článku z roku 2019 se autor Mehmet Ali Uçar se svými kolegy pokusil prokázat užitečnost RET-He nejen při diagnostice nedostatku železa a sideropenické anémie, ale také při hodnocení jeho odpovědi na perorální léčbu železem. Tyto studie a většina dalších se zaměřily především na vyhledávání korelací mezi parametry konkrétních skupin populace. Nejčastěji byli pacienti tříděni do čtyř skupin – kontrolní skupina, pacienti s nedostatkem železa, pacienti s anémií z nedostatku železa a pacienti s jiným typem anémie. Toto rozdělení bylo provedeno na základě výsledků laboratorních testů. Stěžejní pro tyto studie bylo vyšetření RET-He a HGB, pomocí kterého bylo možné skupiny rozdělit na anemické a neanemické. Dále byli pacienti tříděni podle toho, zda u nich byl laboratorně prokázán nedostatek železa. Nejčastěji se k tomuto roztrídění využíval feritin. Po rozdělení do skupin byla zjišťována korelace RET-He s ostatními parametry krevního obrazu a metabolismu železa, které se pro detekci anémie z nedostatku železa standardně vyšetřují [43; 46; 50].

V literatuře se shodně potvrzují statisticky významné korelace mezi RET-He a některými parametry metabolismu železa a krevního obrazu (nejčastěji feritin a HGB) u skupiny pacientů s nedostatkem železa. U pacientů se sideropenickou anémií koreluje více parametrů (např. feritin, HGB, MCV, Fe) a daleko silněji než v předchozí skupině. Obecně se autoři studií shodli na tom, že RET-He koreluje s mírou nedostatku železa. Naopak statisticky významný vztah mezi RET-He a ostatními parametry nebyl většinou nalezen u kontrolního souboru a pacientů s anémií způsobenou jinou příčinou.

Yasumichi Toki a jeho kolegové navíc zkusili všechny čtyři skupiny spojit a porovnat vztah směsných dat feritinu k RET-He, avšak nebyla analýzou prokázána statisticky významná korelace proměnných. U naší směsné populace byl výsledek podobný, protože výsledná korelace činila 0,005712, což je velmi blízko nule, a tudíž se nejedná o statisticky významnou korelaci [46].

Většina studií zabývající se danou problematikou odstranila ze statistického souboru pro lepší interpretaci některé skupiny pacientů – nejčastěji pacienty trpící chronickým onemocněním, těhotné ženy a ty, kteří byli v nedávné minulosti léčeni přípravky obsahujícími železo. Avšak tím byla odstraněna část populace, u které jsou znalosti o vztahu RET-He k ostatním parametrům omezené. Dále bych ráda zmínila studii z roku 2018, kde Aseem K Tiwari a kolektiv uvedli, že RET-He je ideálním markerem pro

indikaci latentního nedostatku železa u dárců krve. V tomto případě se ale opět setkáváme s eliminací chronicky nemocných pacientů, protože do sledování byli zapojeni pouze dárči krve, u kterých se na základě podrobného dotazníku, fyzikálního vyšetření a analýzy krve předpokládá, že jsou zdraví [78].

Při naší analýze dat jsme tímto způsobem skupiny pacientů neseparovali a pokusili se prokázat možné zákonitosti mezi RET-He s některými hematologickými a biochemickými parametry ve směsné populaci, která obsahovala jak zdravé a z případné anémie již vyléčené jedince, tak nemocné pacienty s různými diagnózami.

Přestože na našich datech nebyla prokázána příliš velká korelace RET-He s MCV a MCH, což může právě naznačovat, že stanovení RET-He nemusí být ideální pro všechny skupiny pacientů, existuje celá řada studií, které jeho užitečnost potvrzují. Také může nízká míra korelace našich výsledků být způsobena tím, že se v našem statistickém souboru nachází i poměrně velké zastoupení z případné anémie již vyléčených pacientů, u kterých dle dostupné literatury není zaznamenána příliš velká korelace. Z těchto důvodů nelze z našich populačních dat vyvodit žádné obecně platné pravidlo.

Na základě zjištěných výsledků se přikláním k názoru autorů výše zmíněného článku. Mehmet Ali Uçar se svými kolegy v závěru své práce zmínili, že ačkoliv se předpokládá, že ekvivalent hemoglobinu v retikulocytech není ovlivněn infekčními a chronickými stavy, jsou pro jeho bezpečné použití v klinické praxi nutné další studie, které zahrnou různé věkové skupiny, různé geografické oblasti a především pacienty s chronickým onemocněním [43].

Podobným názorem zakončili svou práci i v jiném již zmíněném článku. Yasumichi Toki s kolektivem prokázali, že RET-He je vhodným markerem sideropenické anémie a nedostatku železa a zároveň otestovali, zda v jejich statistickém souboru koreluje RET-He s CRP, což bylo vyvráceno. I přesto autoři doporučují další studium, a to zejména na pacientech trpících anémií chronických onemocnění [46].

S podobnými závěry o doplnění dosavadních studií se setkáváme napříč odbornou literaturou, přestože byla užitečnost parametru několikrát prokázána.

Ráda bych dále poznamenala to, že se Vanessa Neef se svými kolegy snažila prokázat, zda je RET-He vhodný jako screeningový marker nedostatku železa u dětí a v závěru své práce upozornila na to, že tento parametr nemusí být nízký pouze u nedostatku železa, ale i u hemoglobinopatií, jako je  $\alpha$ -talasémie a  $\beta$ -talasémie. Autoři článku taktéž doporučují další studie zohledňující pacienty s tímto onemocněním [50].

Nejspíše z těchto důvodů se RET-He v současnosti používá společně s jinými parametry krevního obrazu a biochemickými markery sledující metabolismus železa. Právě kombinací více testů získáváme spolehlivý soubor dat, protože stejně jako by sideropenická anémie mohla být při zánětem zvýšeném feritinu skrytá, tak i například MCV nemusí být při tomto onemocnění vždy snižené. Kombinace anémie z nedostatku vitamínu B12 a folátů, kdy MCV bývá zvýšené a anémie z nedostatku železa může způsobit, že výsledné MCV je normální. Z tohoto důvodu je vhodné parametry hodnotit v kombinaci a případně mohou být použita i další vyšetření (např. mikroskopie krevního nátěru). RET-He je navíc levný, rychlý a provedením jednoduchý test, který je dokonce vyšetřován ze stejné zkumavky a na stejném analyzátoru jako zbytek parametrů krevního obrazu. Navíc jeho využívání na pacientech s různými diagnózami v běžné praxi také testuje schopnost odhalit nedostatek železa a sideropenickou anémii, protože na každého pacienta je lékařem nahlíženo individuálně na základě fyzikálního vyšetření, laboratorních testů, příznaků a informací z anamnézy.

*„Pokud bychom při hodnocení léčby vycházeli pouze z oficiálně publikovaných klinických studií, pak by nám v celkové skládance chyběla až většinová kohorta pacientů a rizikových stavů, které do klinických studií nelze z různých důvodů zařadit“ [79].*

Nutno na závěr podotknout, že veškeré připomínky zmiňuji pouze na úrovni domněnky a získané výsledky by měly být hodnoceny s nadhledem. Přestože náš soubor proměnných obsahoval v porovnání s odbornou literaturou dostatečné množství výsledků, je třeba brát v potaz, že každá studie měla jiná kritéria pro výběr pacientů do statistického souboru. Z toho vyplývá, že náš výběr pacientů mohl výsledek ovlivnit. Avšak ráda bych v této souvislosti citovala větu, která zazněla v roce 2011 v rámci 35. ročníku Brněnských onkologických dnů a 25. ročníku Konference pro laboranty a sestry.

*„Populační data, jakkoli heterogenní a problematická, můžeme tedy považovat i za cenný nástroj korekce informační strategie diktované klinickými studiemi“ [79].*



## 7 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce je zaměřena na stanovení rozšířeného parametru krevního obrazu RET-He a hledání jeho vztahu s vybranými hematologickými a biochemickými parametry, mezi které byly zařazeny MCHC, HGB, MCV, MCH, Fe, saturace transferinu, transferin a feritin.

Z naměřených dat bylo potvrzeno, že u sledovaných osob směsné populace byla mezi RET-He a některými parametry nalezena korelace. Těmito parametry jsou MCV a MCH. Avšak nalezený vztah nebyl natolik statisticky významný, jako je tomu v dostupné literatuře, která se zabývá jeho analýzou u předem stanovených skupin pacientů. Tyto skupiny byly vybírány na základě laboratorních testů a diagnózy, a tudíž nebyla využita směsná data jako v případě této práce. Na základě výsledků není možné odvodit obecně platné pravidlo, které by platilo pro všechny pacienty.

Získané závěry tedy ukazují, že by vztah ekvivalentu hemoglobinu v retikulocytech k parametrům krevního obrazu a metabolismu železa v souvislosti s diagnózou měl být dále sledován.

I přes nesporné výhody laboratorní diagnostiky RET-He na některých pacientech klade tato práce důraz na jeho vyšetřování s již zavedenými laboratorními testy. Kombinace více výsledků laboratorní analýzy se zohledněním anamnézy a příznaků může sloužit jako cenný nástroj pro diagnostiku sideropenické anémie a případně i pro sledování léčby tohoto onemocnění.

Stanovený cíl práce byl tímto splněn.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CD163	diferenciační antigen 163 (cluster of differentiation 163)
CHr	obsah hemoglobinu v retikulocytech
ČHS ČLS JEP	Česká hematologická společnost České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně
ČSKB ČLS JEP	Česká společnost klinické biochemie České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně
Dcytb	duodenální cytochrom b
Delta-He	Rozdíl obsahu hemoglobinu v retikulocytech a erytrocytech
DMT1	divalent metal transporter 1
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECLIA	Elektrochemiluminiscenční imunoanalýza
ESA	látky stimulující erytropoézu
Fe	železo
Fe <sup>2+</sup>	železo ve dvojmocném stavu
Fe <sup>3+</sup>	železo v trojmocném stavu
HCP	heme carrier protein
HCT	hematokrit
HGB	hemoglobin

ICIS	Intensive Care Infection Score
ICSH	Mezinárodní výbor pro standardizaci v hematologii
IREs	iron responsive elements
IRPs	iron responsive proteins
KD	kostní dřeň
LD	laktátdehydrogenáza
LIS	laboratorní informační systém
Max	maximum
MCH	střední množství hemoglobinu v erythrocytech
MCHC	střední koncentrace hemoglobinu v erythrocytech
MCV	střední objem erythrocytu
Min	minimum
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
n	počet platných proměnných
NIS	nemocniční informační systém
OHKT	Oddělení hematologie a krevní transfuze
OKB	Oddělení klinické biochemie
PK	periferní krev

PLT	trombocyty
RBC	erytrocyty
RDW	distribuční šíře erytrocytů
RET-He	ekvivalent hemoglobinu v retikulocytech
RNA	ribonukleová kyselina
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
SD	směrodatná odchylka
SEKK	Systém externí kontroly kvality
SLS	sodiumlaurylsulfát
TfR	transferinový receptor (TfR1 a TfR2)
ÚVN	Ústřední vojenská nemocnice – Vojenská fakultní nemocnice Praha
WBC	leukocyty
WHO	Světová zdravotnická organizace (z anglického názvu World Health Organization)

## 9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BULIKOVÁ, Alena. In: PENKA, Miroslav a Eva TESAŘOVÁ. *Hematologie a transfuzní lékařství I: Hematologie*. 1. Praha: Grada, 2011, s. 163. ISBN 978-80-247-3459-0.
- [2] CHAPARRO, Camila a Parminder SUCHDEV. Anemia epidemiology, pathophysiology, and etiology in low- and middle-income countries. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 2019, **1450**(1), 15-31 [cit. 2022-10-08]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/nyas.14092>
- [3] *Referenční meze krevního obrazu, retikulocytů, normoblastů a diferenciálního počtu leukocytů dospělých* [online]. Česká hematologická společnost ČLS JEP, 2015, 18.6.2021 [cit. 2022-10-08]. Dostupné z: [https://labsekce.hematology.cz/wp-content/uploads/2021/08/Doporuceni\\_LS\\_CHS\\_CLS\\_JEP-Ref\\_meze\\_dospeli-KO\\_Diff\\_Ret\\_NRBC\\_v02\\_rev02.pdf](https://labsekce.hematology.cz/wp-content/uploads/2021/08/Doporuceni_LS_CHS_CLS_JEP-Ref_meze_dospeli-KO_Diff_Ret_NRBC_v02_rev02.pdf)
- [4] SPANGENBERGER, Holger a Ingo MEUTHEN. In: HANS-MICHAEL, STEFFEN. *Diferenciální diagnostika ve vnitřním lékařství*. 5. vyd. Praha: Grada, 2010, s. 59-60. ISBN 978-80-247-2780-6.
- [5] MCKENZIE, Shirlyn a Catherine OTTO. In: MCKENZIE, Shirlyn a Williams LYNNE. *Clinical Laboratory Hematology*. 3rd ed. United States of America: Pearson, 2014, s. 178-182. ISBN 978-0-13-307601-1.
- [6] STEINEROVÁ, Kateřina, Daniel LYSÁK a Pavel JINDRA. Nejběžnější typy anémií - diagnostika, klasifikace a léčba. *Medicina pro praxi* [online]. 2018, **15**(2), 80-83 [cit. 2022-10-15]. ISSN 1803-5310. Dostupné z: [doi:10.36290/med.2018.059](https://doi.org/10.36290/med.2018.059)

- [7] DOBROTOVÁ, Miroslava a Peter KUBISZ. *Hematológia a transfuziológia: učebnica*. 1.vyd. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-1779-4.
- [8] HRONEK, Miloslav a Miroslav KOVAŘÍK. Deficit příjmu železa - nutriční zdroje, doporučené denní dávky, suplementace železem. *Praktické lékařství*. 2021, **17**(4), 213-215. ISSN 1801-2434. Dostupné z: doi:10.36290/lek.2021.046
- [9] NOVOTNÝ, Jan. Sideropenická anémie. *Medicína pro praxi* [online]. 2007, **4**(11), 390-394 [cit. 2022-11-01]. ISSN 1803-5310. Dostupné z: [https://solen.cz/artkey/med-200710-0002\\_sideropenicka\\_anemie.php](https://solen.cz/artkey/med-200710-0002_sideropenicka_anemie.php)
- [10] BOURKOVÁ, Ludmila, Magdaléna JELÍNKOVÁ, Irena TRNAVSKÁ a Markéta SLÁNSKÁ. In: PENKA, Miroslav a Eva TESAŘOVÁ. *Hematologie a transfuzní lékařství I*. 1. Praha: Grada Publishing a.s., 2011, s. 62. ISBN 978-80-247-3459-0.
- [11] DVOŘÁK, Karel. In: LUKÁŠ, Karel a Aleš ŽÁK. *Chorobné znaky a příznaky: diferenciální diagnostika*. 1. Praha: Grada, 2014, s. 58. ISBN 978-80-247-5067-5.
- [12] NEUFELD, Lynnette, Leila LARSON, Anura KURPAD, Sheila MBURU, Reynaldo MARTORELL a Kenneth BROWN. Hemoglobin concentration and anemia diagnosis in venous and capillary blood: biological basis and policy implications. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 2019, **1450**(1), 172-189 [cit. 2022-10-19]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/nyas.14139>
- [13] VÁLKA, Jan a Jaroslav ČERMÁK. Diferenciální diagnostika anémie. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2018, **20**(5), 278-283 [cit. 2022-10-09]. ISSN 1803-5256. Dostupné z: doi:10.36290/int.2018.047

- [14] BULIKOVÁ, Alena. In: PENKA, Miroslav a Eva TESAŘOVÁ. *Hematologie a transfuzní lékařství I*. 1. Praha: Grada Publishing a.s., 2011, s. 164. ISBN 978-80-247-3459-0.
- [15] MCKENZIE, Shirlyn a Catherine OTTO. In: MCKENZIE, Shirlyn a Williams LYNNE. *Clinical Laboratory Hematology*. 3rd ed. United States of America: Pearson, 2014, s. 183-187. ISBN 978-0-13-307601-1.
- [16] PENKA, Miroslav a Alena BULIKOVÁ. *Neonkologická hematologie*. 2., dopl. a zcela přeprac. vyd. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2299-3.
- [17] NOVOTNÝ, Jan a Magdaléna JELÍNKOVÁ. In: PENKA, Miroslav a Eva TESAŘOVÁ. *Hematologie a transfuzní lékařství*. 1. Praha: Grada Publishing a.s., 2011, s. 19-20. ISBN 978-80-247-3459-0.
- [18] MCKENZIE, Shirlyn B. In: MCKENZIE, Shirlyn a Williams LYNNE. *Clinical Laboratory Hematology*. 3rd ed. United States of America: Pearson, 2014, s. 200-208. ISBN 978-0-13-307601-1.
- [19] SEDLÁČKOVÁ, Terezie a Jaroslav RACEK. Metabolismus železa a jeho regulace. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2009, **17**(1), 17-23. ISSN 1210-7921. Dostupné také z: <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2009/1-09/2009-1-Sedlackova.pdf>
- [20] HRONEK, Miloslav a Miroslav KOVAŘÍK. Iron intake deficit - nutritional resources, recommended daily allowances, iron supplementation. *Medicina pro praxi* [online]. 2022, **19**(2), 119-122 [cit. 2022-10-28]. ISSN 1803-5310. Dostupné z: doi:10.36290/med.2022.017
- [21] SLÍVA, Jiří. Železo a jeho využití v organismu. *Remedia* [online]. 2013, **23**(5), 354-357 [cit. 2022-10-29]. ISSN 2336-3541. Dostupné z:

<http://www.remédia.cz/Okruhy-temat/Farmakologie/Zelez-a-jeho-vyuziti-v-organismu/8-10-lyO.magarticle.aspx>

- [22] BRANČÍKOVÁ, Dagmar. Jak ovlivnit anémii stravováním?. *Interní medicína pro praxi*. 2012, **14**(5), 231-234. ISSN 1212-7299. Dostupné také z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2012/05/13.pdf>
- [23] KREMSA, Žaneta. *Metabolismus železa, projevy nedostatku a rizika s tím spojené* [online]. Institut funkční medicíny a výživy, 2021 [cit. 2022-11-04]. Dostupné z: <https://ifmv.cz/metabolismus-zeleza-projevy-nedostatku-a-rizika-s-tim-spojene/>
- [24] OGUN, Aminat a Adebayo ADEYINKA. *Biochemistry, Transferrin* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022 [cit. 2022-11-05]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532928/>
- [25] ŠIMEK, M. Nové poznatky o metabolismu železa. *Vnitřní lékařství* [online]. 2005, **51**(3), 345-353 [cit. 2022-11-07]. Dostupné z: <https://www.casopisvnitrnilekarstvi.cz/pdfs/vnl/2005/03/16.pdf>
- [26] WARNER, Matthew a Muhammad KAMRAN. *Iron Deficiency Anemia* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022 [cit. 2022-11-20]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448065/>
- [27] METZGEROTH, G. a J. HASTKA. Eisenmangelanämie und Anämie der chronischen Erkrankungen. *Der Internist* [online]. 2015, **56**(9), 978-988 [cit. 2022-11-20]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00108-015-3711-2>
- [28] BULIKOVÁ, Alena. In: PENKA, Miroslav a Eva TESAŘOVÁ. *Hematologie a transfuzní lékařství I*. 1. Praha: Grada Publishing a.s., 2011, s. 165. ISBN 978-80-247-3459-0.



- [29] ČERMÁK, Jaroslav. Léčba anémie a nedostatku železa z pohledu hematologa. *Kardiologická revue - Interní medicína* [online]. 2014, **16**(5), 359-363 [cit. 2022-11-27]. ISSN 2336-2898. Dostupné z: <https://www.kardiologickarevue.cz/casopisy/kardiologicka-revue/2014-5/lecba-anemie-a-nedostatku-zeleza-z-pohledu-hematologa-50142>
- [30] MCKENZIE, Shirlyn B. In: MCKENZIE, Shirlyn a Williams LYNNE. *Clinical Laboratory Hematology*. 3rd ed. United States of America: Pearson, 2014, s. 210-214. ISBN 978-0-13-307601-1.
- [31] BULIKOVÁ, Alena. In: PENKA, Miroslav a Eva TESAŘOVÁ. *Hematologie a transfuzní lékařství I*. 1. Praha: Grada Publishing a.s., 2011, s. 166. ISBN 978-80-247-3459-0.
- [32] BRAUNSTEIN, Evan M. *Iron Deficiency Anemia: Anemia of Chronic Blood Loss; Chlorosis* [online]. United States of America: MSD Manual: Professional Version, 2021 [cit. 2022-11-29]. Dostupné z: <https://www.msmanuals.com/professional/hematology-and-oncology/anemias-caused-by-deficient-erythropoiesis/iron-deficiency-anemia>
- [33] BARRAGÁN-IBAÑEZ, G., A. SANTOYO-SÁNCHEZ a C.O. RAMOS-PEÑAFIEL. Iron deficiency anaemia. *Revista Médica del Hospital General de México* [online]. 2016, **79**(2), 88-97 [cit. 2022-11-29]. ISSN 0185-1063. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.hgmx.2015.06.008>
- [34] BULIKOVÁ, Alena. In: PENKA, Miroslav a Eva TESAŘOVÁ. *Hematologie a transfuzní lékařství I*. 1. Praha: Grada Publishing a.s., 2011, s. 167. ISBN 978-80-247-3459-0.
- [35] SHORT, Matthew a Jason DOMAGALSKI. Iron Deficiency Anemia: Evaluation and Management. *Am Fam Physician* [online]. 2013, **87**(2), 98-104

- [cit. 2022-12-07]. Dostupné z: <https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/2013/0115/p98.html>
- [36] LUKÁŠ, Milan. Léčba sideropenní anémie v gastroenterologii. *Kardiol Rev Int Med* [online]. 2014, **16**(5), 370-373 [cit. 2022-12-17]. ISSN 2336-2898. Dostupné z: <https://www.kardiologickarevue.cz/casopisy/kardiologicka-revue/2014-5/lecba-sideropenni-anemie-v-gastroenterologii-50144>
- [37] ZAJÍCOVÁ, Marie. Farmaceutická péče u pacientů se substitucí železa při anémii. *Praktické lékařství* [online]. 2012, **8**(5), 225-226 [cit. 2022-12-17]. ISSN 1803-5329. Dostupné z: <https://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2012/05/05.pdf>
- [38] *SORBIFER DURULES - příbalový leták*. Maďarsko: EGIS PHARMACEUTICALS PLC, 2013.
- [39] CHINUDOMWONG, Pawadee, Aleeyas BINYASING, Rangiri TRONGSAKUL a Karan PAISOOKSANTIVATANA. Diagnostic performance of reticulocyte hemoglobin equivalent in assessing the iron status. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* [online]. 2020, **34**(6) [cit. 2022-12-23]. ISSN 1098-2825. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jcla.23225>
- [40] NOVOTNÝ, Jan a Magdaléna JELÍNKOVÁ. In: PENKA, Miroslav a Eva TESAŘOVÁ. *Hematologie a transfuzní lékařství I*. 1. Praha: Grada Publishing a.s., 2011, s. 15-21. ISBN 978-80-247-3459-0.
- [41] RAI, Dipti, Allecia WILSON a Leila MOOSAVI. *Histology, Reticulocytes* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022 [cit. 2022-12-26]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542172/>
- [42] BOURKOVÁ, Ludmila, Magdaléna JELÍNKOVÁ, Irena TRNAVSKÁ a Markéta SLÁNSKÁ. In: PENKA, Miroslav a Eva TESAŘOVÁ. *Hematologie a*

*transfuzní lékařství I. 1.* Praha: Grada Publishing a.s., 2011, s. 67. ISBN 978-80-247-3459-0.

- [43] UÇAR, Mehmet, Mesude FALAY, Simten DAĞDAS, Funda CERAN, Selin URLU a Gülsüm ÖZET. The Importance of RET-He in the Diagnosis of Iron Deficiency and Iron Deficiency Anemia and the Evaluation of Response to Oral Iron Therapy. *Journal of Medical Biochemistry* [online]. 2019, **38**(4), 496-502 [cit. 2022-12-30]. ISSN 1452-8266. Dostupné z: doi:10.2478/jomb-2018-0052
- [44] VYTISKOVÁ, Soňa. *Retikulocytární hemoglobin* [online]. Brno: Fakultní nemocnice Brno, 2016 [cit. 2022-12-30]. Dostupné z: <https://docplayer.cz/32406639-Retikulocytarni-hemoglobin-sona-vytiskova.html>
- [45] *Reticulocytes using vital stain* [online]. MEDICAL-LABS, 2013 [cit. 2023-01-02]. Dostupné z: <https://www.medical-labs.net/reticulocytes-using-vital-stain-451/>
- [46] TOKI, Yasumichi, Katsuya IKUTA a Yoshie KAWAHARA. Reticulocyte hemoglobin equivalent as a potential marker for diagnosis of iron deficiency. *International Journal of Hematology* [online]. 2017, **106**(1), 116-125 [cit. 2022-12-30]. ISSN 0925-5710. Dostupné z: doi:10.1007/s12185-017-2212-6
- [47] *Rozšířené parametry červené krevní řady v diferenciální diagnostice a léčbě anémií* [online]. Brno: Sysmex, 2021 [cit. 2022-12-30]. Dostupné z: <https://www.sysmex.cz/vzdelavani/odborne-clanky-a-studie/odborna-literatura/detail/rozsirene-parametry-cervene-krevni-rady-v-diferencialni-diagnostice-a-lecbe-anemii.html>
- [48] *Ekvivalent hemoglobinu v retikulocytech – RET-He* [online]. Brno: Sysmex [cit. 2023-01-02]. Dostupné z: <https://www.sysmex.cz/academy/klinicke->

informace/nadstavbove-parametry/ekvivalent-hemoglobinu-v-retikulocytech-ret-he.html

- [49] RUNGNGU, Susanti, Audrey WAHANI a Max MANTIK. Reticulocyte hemoglobin equivalent for diagnosing iron deficiency anemia in children. *Paediatrica Indonesiana* [online]. 2016, **56**(2), 90-94 [cit. 2023-01-01]. ISSN 2338-476X. Dostupné z: <https://www.paediatricaindonesiana.org/index.php/paediatricaindonesiana/article/view/115>
- [50] NEEF, Vanessa, Elke SCHMITT, Peter BADER, Frank ZIERFUß, Gudrun HINTEREDER, Andrea STEINBICKER, Kai ZACHAROWSKI a Florian PIEKARSKI. The Reticulocyte Hemoglobin Equivalent as a Screening Marker for Iron Deficiency and Iron Deficiency Anemia in Children. *Journal of Clinical Medicine* [online]. 2021, **10**(16), 3506 [cit. 2023-01-01]. ISSN 2077-0383. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/jcm10163506>
- [51] VÍTOVEC, Jiří, Jindřich ŠPINAR a Lenka ŠPINAROVÁ. Léčba anémie a nedostatku železa u chronického srdečního selhání. *Kardiologická revue – Interní medicína* [online]. 2014, **16**(5), 364-369 [cit. 2023-01-03]. Dostupné z: <https://www.kardiologickarevue.cz/casopisy/kardiologicka-revue/2014-5/lecba-anemie-a-nedostatku-zeleza-u-chronickeho-srdecniho-selhani-50143>
- [52] MAŠKOVÁ, Václava. *ICIs – (Intensive Care Infection Score)* [online]. Praha: OHKT ÚVN, 2023 [cit. 2023-01-15]. Dostupné z: <https://www.uvn.cz/cs/archiv-aktualit-uc/2172-icis-intensive-care-infection-score>
- [53] *Reticulocyte haemoglobin equivalent – RET-He* [online]. Norderstedt: Sysmex [cit. 2023-01-03]. Dostupné z: <https://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/sysmex-parameters/reticulocyte-haemoglobin-equivalent-ret-he.html>

- [54] DANIELSON, Kristin, Soheir BESHARA, Abdul QURESHI et al. Delta-He: a novel marker of inflammation predicting mortality and ESA response in peritoneal dialysis patients. *Clinical Kidney Journal* [online]. 2014, 7(3), 275–281 [cit. 2023-01-03]. Dostupné z: doi: 10.1093/ckj/sfu038
- [55] ŠPRONGL, Luděk. Chyby při odběru a odesílání biologického materiálu. *Medicina pro praxi* [online]. 2019, 16(1), 59-62 [cit. 2023-01-08]. ISSN 1803-5310. Dostupné z: doi: 10.36290/med.2019.010
- [56] RACEK, Jaroslav. *KAPITOLA 2: Preanalytické vlivy na výsledek laboratorního vyšetření* [online]. Ostrava: Střední zdravotnická škola a Vyšší odborná škola zdravotnická Ostrava, příspěvková organizace, 2019 [cit. 2023-01-08]. Dostupné z: <https://www.vovcr.cz/odz/zdrav/189/page07.html>
- [57] *Laboratorní příručka ÚVN: Preanalytické procesy v laboratoři* [online]. Praha [cit. 2023-01-11]. Dostupné z: <http://lavys.uvn.cz/index.php/laboratorni-prirucka/d-preanalyticke-procesy-v-laboratori>
- [58] *Laboratorní příručka ÚVN: Manuál pro odběry primárních vzorků* [online]. Praha [cit. 2023-01-11]. Dostupné z: <http://lavys.uvn.cz/index.php/laboratorni-prirucka/c-manual-pro-odbery-primarnich-vzorku/c-1-zakladni-informace>
- [59] *Laboratorní příručka ÚVN: Laboratorní vyšetření poskytovaná laboratoří* [online]. Praha [cit. 2023-01-11]. Dostupné z: <http://lavys.uvn.cz/index.php/laboratorni-prirucka/f-laboratorni-vysetreni-poskytovana-laboratori/f-1-biochemicka-vysetreni>
- [60] *Zkumavka Vacuette sérum 6 ml, bez závitů, červený uzávěr, 50 ks* [online]. Medplus s.r.o [cit. 2023-01-27]. Dostupné z: <https://www.medplus.cz/zkumavka-vacuette-serum-6-ml-bez-zavitu-cervenyy-uzaver-50-ks/>

- [61] *Zkumavka VACUETTE fialová, 2 ml EDTA K3* [online]. ArgoMed [cit. 2023-01-27]. Dostupné z: <https://www.argomed.cz/zkumavka-vacurette-fialova-2-ml-edta-k3.html>
- [62] *XN-1000* [online]. Norderstedt: Sysmex Europe SE [cit. 2023-02-02]. Dostupné z: <https://www.sysmex-europe.com/products/products-detail/xn-1000.html>
- [63] *XN-1500* [online]. Norderstedt: Sysmex Europe SE [cit. 2023-02-02]. Dostupné z: <https://www.sysmex-europe.com/products/products-detail/xn-1500.html>
- [64] *Cobas® modulární analyzátor: Technické parametry inteligentního a výkonného řešení laboratoře* [online]. Praha: Roche, 2010 [cit. 2023-02-02]. Dostupné z: <https://docplayer.cz/106692991-Cobas-8000-modularni-analyzator-technicke-parametry-inteligentniho-a-vykonneho-reseni-laboratore.html>
- [65] MAŠKOVÁ, Václava. *Analýza krevního obrazu, základy cytologie krevních tekutin, sedimentace ery: Přednáška k předmětu F7PBLHTS1 na ČVUT FBMI (2020-2021)*. ÚVN Praha.
- [66] *Technologie* [online]. Brno: Sysmex CZ s.r.o. [cit. 2023-02-02]. Dostupné z: <https://www.sysmex.cz/vzdelavani/technologie/technologie-mereni.html>
- [67] *Fluorescenční průtoková cytometrie* [online]. Brno: Sysmex CZ s.r.o. [cit. 2023-02-05]. Dostupné z: <https://www.sysmex.cz/vzdelavani/technologie/technologie-mereni/fluorescenci-prutokova-cytometrie.html>
- [68] MORKIS, Iuri, Mariela FARIAS a Luciana SCOTTI. Determination of reference ranges for immature platelet and reticulocyte fractions and reticulocyte hemoglobin equivalent. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*

- [online]. 2016, **38**(4), 310-313 [cit. 2023-02-03]. ISSN 1516-8484. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bjhh.2016.07.001>
- [69] *RET channel: The added value of the RET channel* [online]. Norderstedt: Sysmex Europe SE [cit. 2023-02-03]. Dostupné z: <https://www.sysmex-europe.com/academy/clinic-laboratory/analyser-channels/ret-channel.htm>
- [70] *Hydrodynamická fokusace* [online]. Brno: Sysmex CZ s.r.o. [cit. 2023-02-05]. Dostupné z: <https://www.sysmex.cz/vzdelavani/technologie/technologie-mereni/hydrodynamicka-fokusace.html>
- [71] *SLS detekční metoda* [online]. Brno: Sysmex CZ s.r.o. [cit. 2023-02-04]. Dostupné z: <https://www.sysmex.cz/vzdelavani/technologie/technologie-mereni/sls-detekcni-metoda.html>
- [72] RACEK, Jaroslav. *KAPITOLA 3: Analytické vlastnosti laboratorní metody* [online]. Ostrava: střední zdravotnická škola a Vyšší odborná škola zdravotnická Ostrava, příspěvková organizace, 2019 [cit. 2023-02-09]. Dostupné z: <https://www.vovcr.cz/odz/zdrav/189/page14.html>
- [73] MAŠKOVÁ, Václava. *Kvalita v hematologické laboratoři II.: Přednáška k předmětu F7PBLHTS1 na ČVUT FBMI (2020-2021)*. ÚVN Praha, 2020.
- [74] *Příbalový leták: IRON2 cobas®*. Roche Diagnostics, 2020.
- [75] *Příbalový leták: Elecsys Ferritin cobas®*. Roche Diagnostics, 2019.
- [76] *Příbalový leták: TRSF2 cobas®*. Roche Diagnostics, 2020.
- [77] *Saturovaný transferin* [online]. Praha: ÚVN [cit. 2023-02-20]. Dostupné z: <http://lavys.uvn.cz/index.php/laboratorni-prirucka/f-laboratorni-vysetreni-poskytovana-laboratori/f-1-biochemicka-vysetreni/344-saturovany-transferin>

- [78] TIWARI, Aseem K, Gunjan BHARDWAJ, Dinesh ARORA et al. Applying newer parameter Ret-He (reticulocyte haemoglobin equivalent) to assess latent iron deficiency (LID) in blood donors-study at a tertiary care hospital in India. *Vox Sanguinis*. 2018, **113**(7), 639-646. ISSN 0042-9007. Dostupné z: doi:10.1111/vox.12700
- [79] DUŠEK, Ladislav, Milan BLÁHA, Petr BRABEC, Jan MUŽÍK, Miloš SUCHÝ, Petr KLIKA a Dalibor JANČA. *Metodika HTA v onkologii z hlediska dostupnosti reálných klinických dat.: Konference: 2011 XXXV. Brněnské onkologické dny a XXV. Konference pro sestry a laboranty* [online]. Brno: Linkos, 2011 [cit. 2023-04-04]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/lekar-a-multidisciplinari-tym/kongresy/po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologickych-konferencnich-abstrakt/metodika-hta-v-onkologii-z-hlediska-dostupnosti-realnych-klinickych-dat/>



## 10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Schéma vstřebávání železa .....	19
Obrázek 2 – Schéma erytropoézy .....	28
Obrázek 3 – Retikulocyty zvýrazněné supravitálním barvením .....	29
Obrázek 4 – Zkumavka VACUETTE pro přípravu séra .....	35
Obrázek 5 – Zkumavka VACUETTE s K3EDTA .....	36
Obrázek 6 – Analyzátor Sysmex XN-1000 .....	38
Obrázek 7 – Analyzátor Sysmex XN-1500 DI .....	39
Obrázek 8 – Histogram RET-He .....	52
Obrázek 9 – Histogram MCHC.....	53
Obrázek 10 – Histogram HGB .....	53
Obrázek 11 – Histogram MCV .....	54
Obrázek 12 – Histogram MCH.....	54
Obrázek 13 – Histogram Fe .....	55
Obrázek 14 – Histogram saturace transferinu .....	55
Obrázek 15 – Histogram transferinu.....	56
Obrázek 16 – Histogram feritinu .....	56
Obrázek 17 – Srovnání box-plotů RET-He a MCHC .....	57
Obrázek 18 – Bodový graf z MCHC proti RET-He .....	57
Obrázek 19 – Srovnání box-plotů RET-He a HGB .....	58
Obrázek 20 – Bodový graf z HGB proti RET-He .....	58
Obrázek 21 – Srovnání box-plotů RET-He a MCV.....	59
Obrázek 22 – Bodový graf z MCV proti RET-He.....	59
Obrázek 23 – Srovnání box-plotů RET-He a MCH .....	60
Obrázek 24 – Bodový graf z MCH proti RET-He .....	60
Obrázek 25 – Srovnání box-plotů RET-He a Fe .....	61
Obrázek 26 – Bodový graf z Fe proti RET-He.....	61
Obrázek 27 – Srovnání box-plotů RET-He a saturace transferinu.....	62
Obrázek 28 – Bodový graf ze saturace transferinu proti RET-He .....	62
Obrázek 29 – Srovnání box-plotů RET-He a transferinu.....	63
Obrázek 30 – Bodový graf z transferinu proti RET-He .....	63

Obrázek 31 – Srovnání box-plotů RET-He a feritinu .....	64
Obrázek 32 – Bodový graf z feritinu proti RET-He .....	64

## 11 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1 – Principy měření použitých hematologických parametrů .....	41
Tabulka 2 – Referenční rozmezí vybraných parametrů krevního obrazu .....	46
Tabulka 3 – Principy stanovení použitých biochemických parametrů.....	47
Tabulka 4 – Referenční rozmezí použitých biochemických parametrů .....	49
Tabulka 5 – Deskriptivní (popisná) statistika naměřených dat .....	51
Tabulka 6 – Spearmanovy korelace .....	66