

**ČESKÉ VYSOKÉ
UČENÍ TECHNICKÉ
V PRAZE**

**FAKULTA
BIOMEDICÍNSKÉHO
INŽENÝRSTVÍ**



**BAKALÁŘSKÁ
PRÁCE**

2019

**RADKA
KOTVASOVÁ**



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

**Fakulta biomedicínského inženýrství
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**

Železo jako esenciální stopový prvek

Iron, Essential Trace Element

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví
Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: prof. MUDr. Jaroslav Racek, DrSc.

Radka Kotvasová

Kladno, květen 2019



ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Kotvasová** Jméno: **Radka** Osobní číslo: **469731**
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**
Garantující katedra: **Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**
Studijní program: **Specializace ve zdravotnictví**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**

II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

Železo jako esenciální stopový prvek

Název bakalářské práce anglicky:

Iron, Essential Trace Element

Pokyny pro vypracování:

Železo je pro organismus důležitým biogenním prvkem. Teoretická část práce bude pojednávat o výskytu a obecných vlastnostech prvku v organismu. Dále bude popsána úloha železa v organismu – transport, uskladnění, metabolismus železa a jeho regulace. Budou zmíněny možné zdroje a také ztráty prvku v organismu, s nimiž souvisejí poruchy metabolismu železa. Součástí práce bude tedy popis těchto poruch, které mohou být způsobeny v první řadě nedostatkem železa v organismu, jež může vyústit až v sideropenickou anémii a v řadě druhé neméně závažným nadbytkem železa a zatížením organismu. Praktickou část práce doplní kazuistiky ukazující pacienty se závažnou poruchou metabolismu železa.

Seznam doporučené literatury:

- [1] KODIČEK, Milan, Olga VALENTOVA a Radovan HYNEK, Biochemie: chemický pohled na biologický svět, ed. 2., Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2018, ISBN 978-80-7592-013-3
- [2] GANZ, Tomas, Systemic Iron Homeostasis, Physiological Reviews, ročník 93(4), 2013, 1721-41 s., ISSN 1522-1210
- [3] DOBROTA, Dušan a kol., Lékařská biochemie, ed. 2., Vydavatelství OSVETA, 2016, ISBN 978-80-8063-444-5

Jméno a příjmení vedoucí(ho) bakalářské práce:

prof. MUDr. Jaroslav Racek, DrSc.

Jméno a příjmení konzultanta(ky) bakalářské práce:

Datum zadání bakalářské práce: **28.09.2018**

Platnost zadání bakalářské práce: **18.09.2020**

prof. MUDr. Leoš Navrátil, CSc., MBA, dr.h.c.
podpis vedoucí(ho) katedry

prof. MUDr. Ivan Dylevský, DrSc.
podpis děkana(ky)

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem **Železo jako esenciální stopový prvek** 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).

V Kladně dne 13.05.2019

.....
podpis

Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucímu své bakalářské práce panu prof. MUDr. Jaroslavu Rackovi, DrSc. za odborné vedení práce, cenné rady, kritické a konstruktivní připomínky, vstřícný a trpělivý přístup a především za ochotu věnovat mé práci čas.

Abstrakt

Bakalářská práce pojednává o významném biogenním chemickém prvku s názvem železo. Teoretická část práce začíná popisem obecných fyzikálních a chemických vlastností prvku. V následujících kapitolách je charakterizována biologická stránka železa zahrnující vlastnosti, funkce, metabolismus a jeho regulaci v organismu, včetně léčby poruch metabolismu prvku.

Praktická část se zabývá vyšetřením poruch metabolismu železa. V metodice je uveden odběr a příprava vzorků pro analýzu a charakteristika hematologického a biochemického vyšetření laboratorních ukazatelů metabolismu železa v Ústavu klinické biochemie a hematologie Fakultní nemocnice Plzeň.

Výsledkem bakalářské práce jsou vybrané kazuistiky pacientů s poruchami metabolismu železa a jejich vyhodnocení. Dvě kazuistiky představují nedostatek prvku v organismu a jedna jeho nadbytek.

Klíčová slova

Metabolismus železa; nadbytek železa; nedostatek železa; poruchy metabolismu železa; regulace metabolismu železa; železo.

Abstract

The bachelor thesis deals with an important biogenic chemical element called iron. The theoretical part of the thesis begins with a description of general physical and chemical properties. In the following chapters, the biological aspect of iron is characterized, including properties, functions, metabolism and its regulation in the body, including metabolic disorders of the element and their treatment.

The practical part deals with the examination of iron metabolism disorders. The methodology includes sampling and sample preparation for analysis and characteristics of haematological and biochemical examination of laboratory indicators of iron metabolism at the Department of Clinical Biochemistry and Haematology, University Hospital in Pilsen.

In the result of the bachelor thesis are given case reports of patients with iron metabolism disorders and evaluation of them. Two case reports include iron deficiency and one case report describes iron overload.

Keywords

Iron metabolism; iron overload; iron deficiency; disorders of iron metabolism; regulation of iron metabolism; iron.

Obsah

1	Úvod	10
2	Současný stav	11
2.1	Železo	11
2.1.1	Chemické a fyzikální vlastnosti železa	11
2.1.2	Železo v organismu.....	12
2.1.3	Uskladnění železa v organismu	14
2.1.4	Transport železa v organismu.....	16
2.1.5	Metabolismus železa.....	20
2.1.6	Regulace metabolismu železa.....	25
2.2	Poruchy metabolismu železa	28
2.2.1	Laboratorní ukazatelé.....	28
2.2.2	Nedostatek železa	31
2.2.3	Nadbytek železa	33
2.2.4	Léčba	37
3	Cíl práce.....	39
4	Metodika	40
4.1	Odběr a příprava vzorků.....	40
4.1.1	Zkumavky pro vyšetření metabolismu železa.....	40
4.1.2	Zkumavky pro vyšetření krevního obrazu	41
4.1.3	Odběr žilní krve.....	41
4.2	Hematologické vyšetření.....	44
4.2.1	Stanovení červeného krevního obrazu.....	45
4.2.2	Manuální zhotovení a obarvení krevního nátěru.....	46

4.3	Biochemické vyšetření	50
4.3.1	Stanovení železa	51
4.3.2	Stanovení transferrinu	52
4.3.3	Stanovení solubilního transferrinového receptoru	52
4.3.4	Stanovení ferritinu	53
4.3.5	Stanovení saturace transferrinu	54
5	Výsledky.....	55
5.1	Kazuistika 1	55
5.2	Kazuistika 2	57
5.3	Kazuistika 3	61
6	Diskuze.....	64
7	Závěr	67
8	Seznam použitých zkratek.....	68
9	Seznam použité literatury.....	70
10	Seznam použitých obrázků	75
11	Seznamu použitých tabulek	76

1 ÚVOD

Železo je neušlechtilý přechodný kov s hojným výskytem v zemské kůře a širokým spektrem využití. V živých organismech se nachází pouze ve stopovém množství. Esencialita železa spočívá v účasti na procesech nezbytných pro život a neschopnosti organismu prvek syntetizovat, čímž dochází k závislosti na jeho recyklaci a exogenním příjmu [1, 2].

Metabolismus železa je velice složitý proces fungující prostřednictvím několika mechanismů, jejichž cílem je udržení homeostázy mezi příjmem a ztrátami prvku. Pro správnou funkci metabolismu železa jsou důležité buňky a molekuly podílející se na jeho transportu, skladování, recyklaci, absorpci a regulaci. Pokud nějaký z mechanismů nefunguje správně nebo vůbec, dochází ke vzniku poruch metabolismu železa [3].

Poruchy jsou způsobené buď nedostatkem železa v organismu nebo jeho nadměrným hromaděním. Pro diagnostiku těchto poruch je důležité laboratorní vyšetření. Mezi hlavní ukazatele patří sérové železo, transferrin, ferritin, solubilní transferrinový receptor, krevní obraz a další. Větší výskyt je zaznamenán u poruch spojených s nedostatkem železa, jejichž symptomem bývá anémie. Právě anémie se řadí k nejčastějším hematologickým onemocněním ve světě.

2 SOUČASNÝ STAV

2.1 Železo

Železo je chemický prvek značený jako Fe (z latinského Ferrum) [2]. Jedná se o přechodný kov, který je čtvrtým nejrozšířenějším prvkem zemské kůry (přibližně 5,1 %). Vzhledem ke spotřebě a širokému rozsahu použití lze železo považovat za nejdůležitější kov současné civilizace. Prvotní využití železa se datuje kolem roku 1 200 př. n. l. Elementární železo se v přírodě téměř nevyskytuje, nacházíme ho tedy ve sloučeninách, především ve formě oxidů a uhličitánů. V malém množství je pak železo obsaženo v živých organismech jako důležitý biogenní prvek [1, 5].

2.1.1 Chemické a fyzikální vlastnosti železa

Železo se řadí do 4. periody, VIII. B skupiny a do *d* bloku periodické soustavy prvků [2]. Atomové číslo železa je 26 a jeho elektronová konfigurace [Ar] 3d⁶ 4s². Relativní atomová hmotnost prvku je 55,847. Teplota varu železa je 3 000 °C, teplota tání 1 538 °C [1]. Železo má několik izotopů. Za nejdůležitější se považují ⁵⁴Fe, ⁵⁶Fe, ⁵⁷Fe ⁵⁸Fe, které jsou stabilní a najdeme je v přírodě [5].

Čisté železo je neušlechtilý, stříbrno-bílý, poměrně měkký, dobře kujný a tvárný kov. Vyskytuje se ve 3 alotropických modifikacích, s nimiž souvisí magnetické vlastnosti prvku, které jsou ovlivněny teplotou. Při teplotě 768 °C se totiž ferromagnetismus prvku ztrácí změnou alotropické modifikace. Železo se nejčastěji vyskytuje v oxidačních stavech +II a +III, v některých méně stálých sloučeninách ho nalezneme i s oxidačními čísly –II, +IV, +VI [1, 2, 5].

Železo se vyznačuje vysokou reaktivitou s jinými prvky. Tvoří sloučeniny například s kyslíkem, dusíkem, uhlíkem, fosforem a sírou. Jako neušlechtilý kov se železo rozpouští v kyselinách. Za negativum prvku se považuje koroze [1, 5]. Při korozi dochází k vzájemnému chemickému či chemicko-fyzikálnímu působení

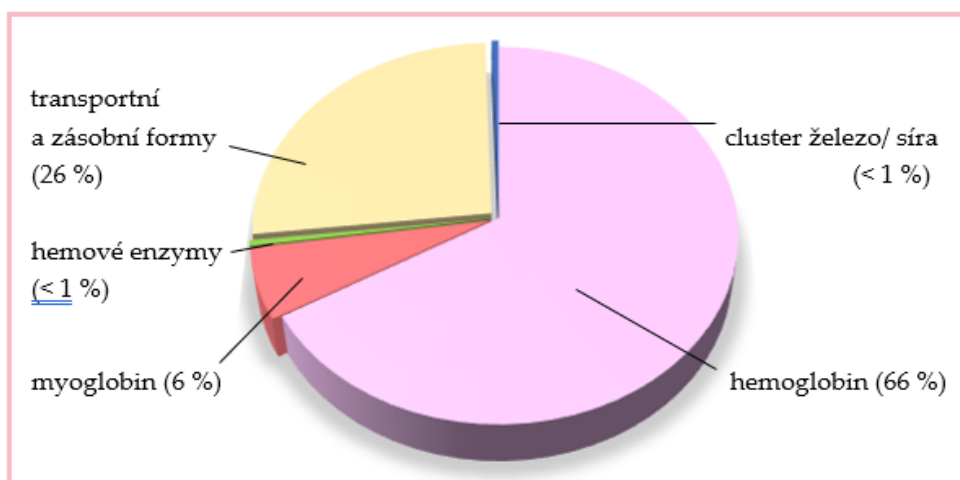
mezi železem a prostředím. Mění se tak vlastnosti kovu, které vedou ke zhoršení funkce. V případě železa dochází k narušování struktury kovu, až k úplnému rozpadu. Reakcí železa s kyslíkem za přítomnosti vlhkosti a nečistot vzniká hnědočervený porézní povlak – rez [6].

2.1.2 Železo v organismu

Železo je esenciální stopový prvek pro téměř všechny živé organismy (eukaryota, prokaryota, kromě laktobacilů) [7, 8]. Jedná se o velmi významnou složku krve i jiných tkání organismu. Plní několik funkcí a účastní se životně důležitých procesů [1].

Lidské tělo obsahuje 3–5 g železa. Volné železo v organismu je vysoce reaktivní a toxické. Jeho reaktivita je omezena a řízena spojením železa s prostetickými skupinami či proteiny [5, 7]. Většina železa v těle je přítomna ve formě hemových proteinů, mezi ně patří hemoglobin, myoglobin a hemové enzymy (kataláza, cytochrom-c-oxidáza). Tyto hemoproteiny zahrnují zhruba 73 % celkového železa v organismu, z toho největší množství (66 %) připadá na hemoglobin. 26 % celkového železa je zastoupeno v nehemových proteinech – transferrinu, ferritinu a hemosiderinu, zbylé 1 % železa je vázáno v komplexech se sírou (xantinoxidáza) [1, 9].

Železo lze považovat za jeden z nejuniverzálnějších prvků, protože v těle plní několik různých funkcí. Železo v hemoglobinu a myoglobinu se podílí na transportu kyslíku z plic do tkání a buněk. Dále slouží jako kofaktor několika enzymatických reakcí za využití elektrochemického potenciálu redoxního páru $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ [10]. Jako součást cytochromů přenáší elektrony v dýchacím řetězci. Železo se uplatňuje při buněčné proliferaci a diferenciaci, je také důležité pro regulaci genové exprese. Význam železa pro imunitní systém je způsoben jeho přítomností v NADPH-oxidáze, která zajišťuje obranu hostitele před mikroorganismy [7, 8].

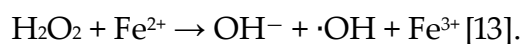


Obrázek 1 – Rozdělení železa [9; KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM, 2012, s. 389]

Toxicita

Železo může být pro organismus také toxické, a to v případě jeho nadbytku. Nadbytek železa v organismu se vyskytuje v případě onemocnění zvaného hemochromatóza, kdy dochází ke zvýšené absorpci prvku, která způsobuje především poškození jater, myokardu či slinivky břišní. K nadbytku železa může dojít i v případě podání krevních transfuzí nebo z důvodu zvýšeného perorálního příjmu, například neuvážené užívání farmaceutických přípravků se železem [11, 12].

Toxicita prvku je způsobena jeho chemickými vlastnostmi. V organismu je železo sice vázáno ve formě Fe^{3+} , ovšem přijímáno je ve formě Fe^{2+} . Volné Fe^{2+} ionty se podílejí na tvorbě hydroxylových radikálů z peroxidu vodíku. Tento proces popisuje Fentonova reakce:



Radikály mají negativní účinky na organismus, poškozují některé bílkoviny a nukleové kyseliny. Aby nedocházelo k těmto účinkům, snaží se organismus vzniku radikálů zabránit. Příkladem je navázání železa na specifické proteiny ferritin a transferrin, oxidace železa za pomoci plasmatického ceruloplazminu, chelatace nebo odbourání peroxidu vodíku katalázou [8].

2.1.3 Uskladnění železa v organismu

Ferritin

Za nejdůležitější molekulu uskladnění železa v organismu se považuje ferritin. Jedná se o nitrobuněčnou bílkovinu, jejíž funkcí je vytváření zásob železa, rychle a dobře mobilizovatelných především pro tvorbu hemoglobinu. Ferritin brání vzniku volných radikálů a podílí se na detoxikaci železa, čímž zajišťuje homeostázu prvku. Nacházíme ho u všech živých organismů. U savců, včetně člověka, se rozlišují 2 druhy – cytoplasmatický a mitochondriální ferritin [3].

Cytoplasmatický ferritin je tvořen z 24 podjednotek. Molekula ferritinu obsahuje 2 druhy těchto podjednotek – těžké H (21 kDa) a lehké L (19,5 kDa), jež jsou uspořádány do tvaru duté koule [3, 8]. Mezi seskupenými podjednotkami se nacházejí póry, kterými prostupuje železo a ukládá se v dutém prostoru molekuly ve formě ferrihydroxidfosfátu. Stejně tak se železo v případě potřeby z molekuly ferritinu uvolňuje. V jedné molekule ferritinu může být uloženo až 4 500 atomů železa, které je přijímáno ve formě Fe^{2+} a ukládá se po oxidaci ve formě Fe^{3+} . Molekula ferritinu bez navázaného železa se nazývá apoferritin [9, 3].

Poměr těžkých a lehkých podjednotek závisí na typu tkáně. Větší množství těžkých H podjednotek nacházíme v myokardu a ledvinách, naopak více lehkých L podjednotek se vyskytuje především v játrech či slezině [3]. Dalšími orgány bohatými na ferritin jsou plíce, kostní dřeň a v případě těhotenství placenta [9, 14]. Poměr podjednotek v tkáních je ovlivněn jak patologickými, tak i fyziologickými stavy. Například zánětem, infekcí, malignitami či vývojovými změnami [3].

V krvi se tato zásobní molekula vyskytuje jako sérový ferritin. Jedná se o L ferritin s malým množstvím železa. Hladina ferritinu v séru je poměrně nízká, a jelikož úzce souvisí s celkovým množstvím železa v organismu, představuje velmi důležitý

ukazatel zásob železa. V klinické praxi má stanovení sérového ferritinu význam pro diagnostiku anémií, maligních nádorů a jiných onemocnění [3].

Tvorba ferritinu je ovlivněna cytoplasmatickou hladinou železa a je regulována na úrovni translace systémem IRE–IRP. IRE (iron regulatory element) představuje krátký úsek mRNA, který se nepřepisuje a je regulován železem. Na tento úsek se mohou vázat regulační molekuly IRP 1 nebo IRP 2 (iron responsive proteins) čili proteiny odpovídající na železo [4, 15]. Vazba regulačních molekul IRP na IRE může translaci zablokovat nebo zesílit. Ovlivnění translace závisí na umístění IRE v mRNA. Při navázání IRP na 5' konec mRNA dochází k blokaci translace. V případě 3' konce mRNA je molekula stabilizována a translace zesílena. Pokud je v cytoplasmě přítomno Fe^{3+} , nedochází k navázání IRP na IRE, je umožněna translace a ferritin se tvoří. Za nepřítomnosti železnatých iontů se IRP naváže na IRE. Tím se zablokuje translace dané mRNA a k tvorbě ferritinu nedochází [3, 15].

Kromě ferritinu se IRE nacházejí v mRNA ferroportinu, syntázy δ -aminolevulové kyseliny (ALAS) či HIF (hypoxia inducible-factor). Při nedostatku železa se na mRNA váží IRP a blokují translaci, čímž potlačují syntézu hemu (ALAS) a znemožňují přesun železa z buněk do plasmy (ferroportin) [15].

Druhým typem proteinu je mitochondriální ferritin. Od cytoplasmatického se liší strukturou, skládá se pouze z těžkých H podjednotek. Prekurzor mitochondriálního ferritinu se tvoří v cytoplasmě a poté je transportován do mitochondrií, v nichž je syntéza proteinu dokončena. Tento typ ferritinu se s velkou pravděpodobností nepodílí na skladování železa. Slouží především k sekvestraci železa, které by pro organismus mohlo být škodlivé [3].

Hemosiderin

Pokud je v organismu vysoké množství železa, které už nelze skladovat prostřednictvím ferritinu, vzniká hemosiderin. Tento komplex proteinu a mineralizovaného železa je téměř nerozpustný. Jelikož organismus neumí železo hemosiderinu metabolizovat, považuje se za odpadní formu. Hemosiderin se vyskytuje v játrech a lokálně v místech hematomu jako žlutohnědá granula. Při patologiích se ukládá ve zvýšeném množství především v játrech a myokardu [3, 12].

2.1.4 Transport železa v organismu

Transferrin

Za hlavní molekulu podílející se na transportu železa v organismu se považuje transferrin. Tvoří se především v játrech, odkud je transportován do krve, v níž je součástí plasmy jako β globulin. V menší míře je tvořen ve varlatech či centrálním nervovém systému pro lokální použití [16]. Hlavní funkcí transferrinu je transport nehemového železa mezi tkáněmi a orgány. Nejvíce železa vázaného v transferrinu (více než 80 %) putuje do kostní dřeně, kde je potřebné pro tvorbu erytrocytů. Ovšem kromě železa může transferrin vázat i ionty mědi, chromu, zinku či dalších kovů [9, 12].

Strukturně se jedná o monomerní glykoprotein o hmotnosti 80 kDa. Na bílkovinné části transferrinu jsou navázány řetězce tvořené oligosacharidy s kyselinou sialovou [9, 12]. Molekula je tvořena dvěma doménami, které jsou podobné složením, ale odlišné funkcí, a slouží jako vazebné místo pro železo. Každá doména koordinačně váže jeden iont železa v trojmocné formě. Za fyziologických podmínek je železem obsazena zhruba jedna třetina celkové kapacity transferrinu. Molekula transferrinu bez navázaného železa se nazývá apotransferrin [8, 9].

Oligosacharidové řetězce v transferrinu mohou pomoci při diagnostice alkoholismu a při monitorování jeho léčby. Alkoholismus totiž způsobuje snížení sacharidového obsahu transferrinu [12]. Vzniká tak bezsacharidový transferrin CDT (carbohydrate deficient transferrin) s poločasem 10 dnů. CDT lze stanovit z krve nejpozději do 3 týdnů, než dojde k jeho vymizení [3].

Transferrinové receptory (TfR)

Jedná se o specifické receptory typu II, které jsou uloženy v buněčné membráně. Jejich funkcí je rozpoznat molekuly transferrinu a umožnit přísun železa do buňky. Rozlišují se dva druhy těchto receptorů – transferrinový receptor 1 (TfR1) a transferrinový receptor 2 (TfR2) [3].

Transferrinový receptor 1 je transmembránový glykoprotein tvořený dvěma stejnými podjednotkami o molekulové hmotnosti 190 kDa. Spojení podjednotek zajišťují disulfidové můstky. Každá podjednotka je schopna navázat dva atomy transferrinového železa. TfR1 má 3 domény – extracelulární, transmembránovou a cytoplasmatickou. [3, 17].

TfR1 se nachází ve většině buněk, ovšem nejvíce je exprimován na proliferujících buňkách, zejména buňkách krvetvorby, či nádorových buňkách. Exprese TfR1 je regulována stejně jako u ferritinu pomocí systému IRE-IRP, jenž v případě nadbytku železa blokuje translaci mRNA receptoru, čímž dochází k zablokování nebo zpomalení syntézy TfR1. TfR1 má k transferrinu vysokou afinitu, která je ovlivňována HFE (integrální membránový protein) [3, 17].

Solubilní (také sérový) transferrinový receptor (sTfR) je forma transferrinového receptoru 1. Jedná se o monomer, který se vyskytuje v séru. Solubilní transferrinový receptor vzniká proteolytickým odštěpením specifické extracelulární domény z TfR1. Jelikož koncentrace sTfR v séru souvisí s celkovým množstvím TfR, jedná se o důležitý laboratorní ukazatel míry a průběhu tvorby erytrocytů,

či spotřeby železa buňkami. Mezi koncentrací sTfR a celkovým množstvím TfR platí přímá úměrnost [3].

Transferrinový receptor 2 je glykoprotein vyskytující se ve dvou formách. Jako transmembránový TfR2- α se třemi doménami a jako intracelulární TfR2- β . TfR2 není ovlivňován HFE a má mnohem nižší afinitu k transferrinu než TfR1. Vyskytuje se především v buňkách vývojové řady erytrocytů a v játrech. Regulace TfR2 není řízena množstvím železa v organismu jako u TfR1, jelikož v mRNA receptoru není přítomen IRE. Mechanismus regulace TfR2 není znám. Jeho funkce je pravděpodobně spjatá s regulací železa v organismu a s řízením produkce hepcidinu. Mutací TfR2 vzniká vzácný druh hemochromatózy [3, 17].

Přenos železa pomocí transferrinu a transferrinových receptorů

Přenos železa z místa resorpce do cílových tkání je uskutečněn pomocí transferrinu a transferrinových receptorů. Transferrin se dvěma navázanými atomy Fe^{3+} tvoří komplex. Komplexy transferrinu s navázaným železem se na povrchu buňky váží na transferrinový receptor. Vzniklý komplex transferrinu a receptoru umožňuje přenos Fe^{3+} dovnitř buňky pomocí endocytózy [3, 4].

Železo přes membránu do buňky může prostupovat pouze ve formě Fe^{2+} . Snížením pH a okyselením prostředí v endocytotickém vaku, které zajišťuje H^+ pumpa, dochází k uvolnění železa z komplexu. Reduktáza Steap 3 redukuje Fe^{3+} na Fe^{2+} , které je pomocí endosomového transportéru kovů – DMT1 (divalent metal transporter 1) transportováno do nitra buňky [3, 4].

V cytoplasmě se železo uvolněné z transferrinu váže na apoferritin. Tím vzniká dlouhodobá zásoba železa ve formě ferritinu nebo přechází do labilního poolu, který představuje pohotovostní zásobu železa v buňce. Komplex apotransferrinu a transferrinového receptoru se v neutrálním pH mimo buňku rozdělí a volný apotransferrin putuje do cirkulace [3, 4].

Laktoferrin

Mezi molekuly podílející se na transportu železa v organismu se řadí i laktoferrin. Jedná se o glykoprotein s vysokou afinitou k iontům železa. Obsahuje dvě vazebná místa pro železo, které je schopen vázat při nižším pH než transferrin. Jeho kapacita není nikdy zcela zaplněna. Laktoferrin bez navázaného železa se nazývá apolaktoferrin. Laktoferrin se nachází v granulách neutrofilních granulocytů a vzniká v mukózních sekretech, především ve slinách nebo v slzách. Obsažen je také v mléce různých živočišných druhů (prvotně byl objeven v kravském mléce) [18, 19].

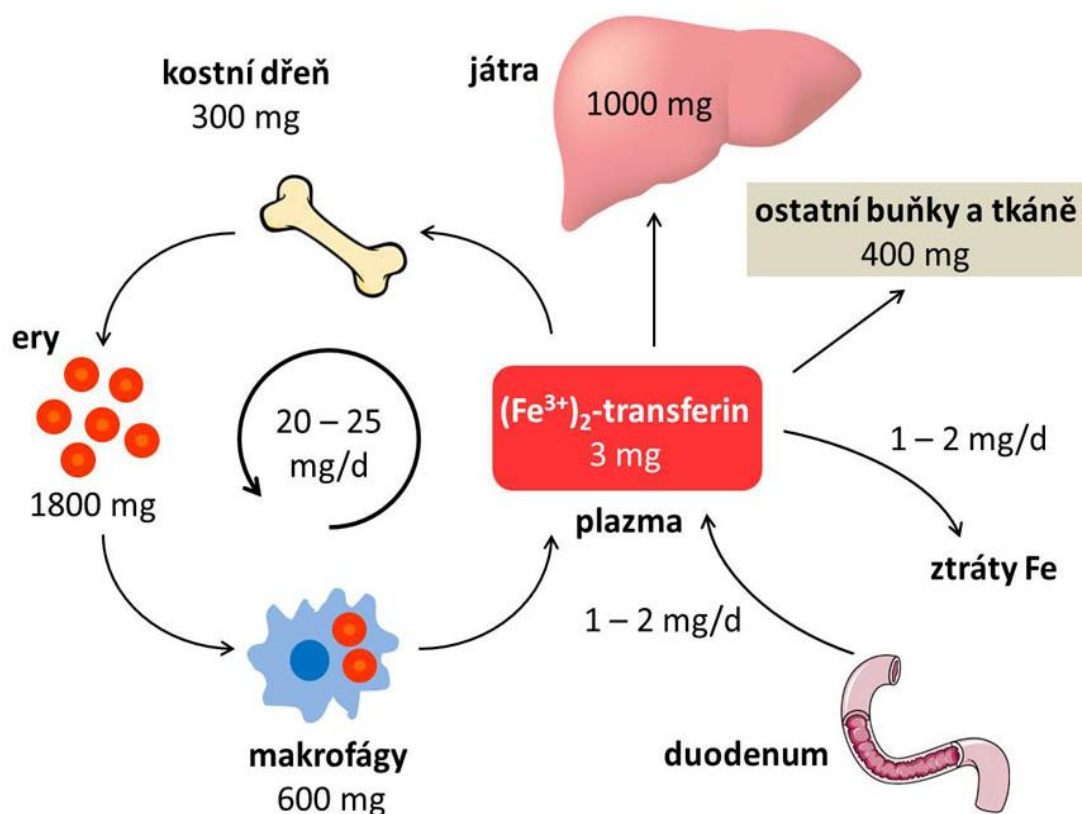
Vychytáváním železa v tělesných tekutinách se laktoferrin podílí na udržování homeostázy prvku. Snižuje hladinu volného železa. Brání tak vzniku hydroxylových radikálů a jejich toxickému působení [9]. Laktoferrin má svou roli i v imunitním systému. Některé organismy laktoferrin využívají pro první stupeň ochrany před mikroby. Jako antimikrobiální protein působí nejen proti virům a bakteriím, ale i proti houbám a parazitům [18].

Antimikrobiální aktivita laktoferrinu je zajištěna několika různými mechanismy. Vázáním železa udržuje nízkou hladinu prvku v sekretech. Tím zabraňuje množení a růstu bakterií. Poškozuje membrány bakteriálních buněk. Reakcí laktoferrinu s molekulami lipopolysacharidu dochází ke změně vlastností membrány gramnegativních bakterií. U grampozitivních bakterií laktoferrin reaguje s příslušnými kyselinami buněčné membrány. Laktoferrin je také schopen inhibovat tvorbu bakteriálního biofilmu. Ovšem některé bakterie jsou schopné železo z laktoferrinu využívat pomocí specifických receptorů [18].

Obrana proti virům je zajištěna přímou vazbou mezi laktoferrinem a virovou částicí nebo obsazením vazebného místa pro virus. Tím je zabráněno přímému kontaktu virové částice s buňkou a nedochází k infekci. Obrana proti houbám a parazitům je zajištěna podobnými mechanismy jako u bakterií [18].

2.1.5 Metabolismus železa

Metabolismus železa je zajišťován pomocí specializovaných mechanismů a molekul, které udržují homeostázu a zabraňují potenciálnímu toxickému účinku prvku. Homeostáza je udržována prostřednictvím rovnováhy mezi příjmem železa a jeho ztrátami [3].



Obrázek 2 – Schéma metabolismu železa [20; RACEK, Jaroslav. Vitamíny a stopové prvky [online]. [cit. 2019-05-08]. Dostupné z: <https://www.ceva-edu.cz/>].

Příjem a ztráty železa

Organismus získává železo jednak ze zdrojů exogenních prostřednictvím potravy, jednak ze zdrojů endogenních. Potravou je denně přijímáno zhruba 25 mg železa, ve formě hemové a nehemové jako Fe^{3+} . Nehemová forma železa je obsažena především v rostlinné stravě a je pro organismus hůře stravitelná. Ve stravě živočišné se železo vyskytuje ve formě hemové. Ta je pro organismus lépe využitelná, protože se vstřebává jiným způsobem než forma nehemová. Zdroje železa v rostlinné stravě jsou luštěniny, kakao, sója, sezam; v živočišné stravě především červené maso, játra, ledviny a ryby [3, 8]. Vstřebávání železa usnadňuje kyselina askorbová a bílkoviny masa. Naopak kravské mléko, fytyáty v rostlinné stravě či látky obsažené v čaji, kávě a víně se železem tvoří složité komplexy a absorpci blokují [21]. Jako blokátory mohou působit i kationty některých kovů, které jsou v organismu v nadbytku. Jedná se především o zinek, mangan, kobalt nebo olovo, které soutěží se železem o vazebné místo na speciálním transportéru dvojmocných kovů DMT1 [22].

Endogenní zdroje představují rozpadlé hemoproteiny či ferrosulfoproteiny. Většina železa pochází ze zaniklých erytrocytů, které jsou pomocí makrofágů recyklovány ve slezině [7]. Příjem železa u zdravých jedinců zpravidla převyšuje aktuální potřebu, proto je z celkového množství absorbováno jen malé procento přijatého železa (0,5–2 mg) [12]. Fyziologické ztráty železa jsou způsobeny ztrátou tělních tekutin (slzy, sliny, u žen menstruační krev, gravidita, laktace) a odlupováním epiteliálních buněk (zrohovatělé buňky kůže, přechodný epitel močových cest) [3].

Absorpce železa

Absorpce železa probíhá především v duodenu a v horní části jejunu. Její velikost je závislá na ztrátách železa z organismu. Čím jsou ztráty železa vyšší, tím víc se absorpce zvyšuje, naopak při nadbytku prvku se snižuje. Na procesu vstřebávání

se podílí i žaludek. Důležité je množství a acidita žaludeční šťávy a schopnost žaludeční sliznice produkovat glykoprotein gastroferrin. Na absorpci má vliv i množství přijaté kyseliny askorbové, která se v kombinaci s žaludeční šťávou podílí na redukci Fe^{3+} na Fe^{2+} . Jako redukční činidla mohou také působit aminokyseliny histidin a cystein [3, 12].

Ve střevě dochází ke vstřebávání železa prostřednictvím kartáčového lemu. Proces vstřebávání železa hemové a nehemové formy je odlišný. Hem uvolněný z hemoproteinů živočišné stravy je přes membránu enterocytu transportován proteinem HCP (heme carrier protein) do cytoplasmy. Zde dochází k uvolnění železa z hemu působením hemoxygenázy 1 (HO1 – heme-oxygenase 1). Konečným produktem reakce je bilirubin. Přenos uvolněného železa ve formě Fe^{2+} do krve je zprostředkován transmembránovým proteinem ferroportinem. V krvi je železo za pomoci hefestinu a ceruloplasminu oxidováno na Fe^{3+} a navázáno na transferrin [7, 8].

Nehemové železo se vyskytuje především jako vysokomolekulární nerozpustné Fe^{3+} . Před střevní absorpcí proto musí dojít k několika úpravám. Kyselé pH žaludku napomáhá redukci a uvolnění iontů železa z vysokomolekulárních forem. Na redukci se spolu s již zmíněnými redukčními činidly podílí i duodenální cytochrom b, enzym kartáčového lemu enterocytů. Gastroferrin udržuje solubilitu železa, čímž umožňuje průchod iontů do enterocytů přes vrstvu hlenu. Absorpce nehemového železa ve střevě je tedy závislá na pH v duodenu, na přítomnosti enzymů a redukčních činidel, které udržují železo ve zredukované formě. Samotné vstřebávání je uskutečněno pomocí transmembránového glykoproteinu DMT1, který transportuje železo do střevních buněk [3, 8].

Metabolismus železa v erytrocytu a erytropoéza

Erytrocyty obsahují dvě třetiny celkového množství železa. Každý den vzniká asi 200 milionů erytrocytů, jejichž průměrná délka života v cirkulaci činí 100–120 dnů. Po uplynutí životnosti jsou erytrocyty pohlceny fagocytujícími buňkami retikuloendotelového systému (RES) jater, sleziny a kostní dřeně [23].

V makrofágu je erytrocyt degradován a uvolňuje se hemoglobin, který se rozpadá na molekuly globinů a hemu. Štěpením molekul hemu hemoxygenázou se uvolňuje železo. Volné železo je ferroportinem exportováno z makrofágů do oběhu, poté je navázáno na transferrin a znovu využito v kostní dřeni. Makrofágy zpracovávají i hemoglobin vzniklý rozpadem erytrocytů v cévním řečišti, který se v plasmě váže na glykoprotein haptoglobin a pomocí receptoru CD136 prostupuje do buňky, kde je degradován [8, 24]. Každý den je tímto způsobem recyklováno asi 20 mg železa [23].

Erytropoéza je vysoce regulovaný proces probíhající v ostrůvcích kostní dřeně. Z hemopoetické kmenové buňky, přes stádium proerytoblastů, vznikají erytoblasty [23]. V erytoblastech dochází k vysoké spotřebě železa z důvodu syntézy hemoglobinu. Příisun železa je zajištěn pomocí transferrinového receptoru 1, který je ve velkém množství exprimován na povrchu erytoblastů. TfR1 vycytává extracelulární železo vázané na transferrin [24].

Atom železa je uvnitř erytoblastu přenesen do mitochondrií a navázán do středu porfyrinového kruhu hemu. Kruh se tvoří kondenzací kyseliny δ -aminolevulové, která je produktem mitochondriálního enzymu – erytroidní syntázy kyseliny aminolevulové (ALAS), jejímž koenzymem je vitamin B6 (pyridoxalfosfát) [24]. Erytoblasty vylučují jádro a vyzrávají v retikulocyty, z nichž vznikají erytrocyty, které jsou vyplavovány do krevního oběhu [23].

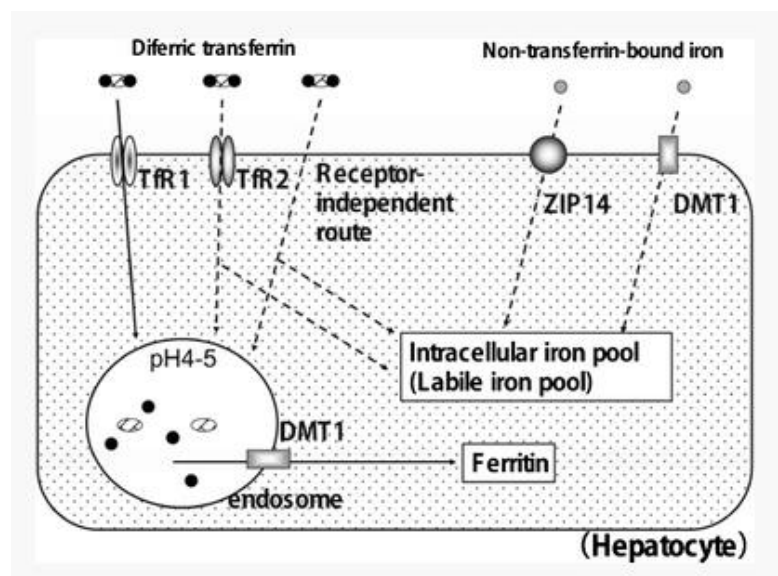
Metabolismus železa v hepatocyty

Játra jsou hlavním orgánem skladování železa. Nadbytečné železo se zde ukládá ve formě proteinů ferritinu a hemosiderinu. Kromě těchto proteinů je v játrech přítomno i malé množství volného železa jako labilní intracelulární pool (LIP), který se uplatňuje během intracelulárního metabolismu prostřednictvím oxidačně-redukčních reakcí, buněčné proliferace či buněčné signalizace [24]. Za fyziologických podmínek je v játrech uloženo 300 mg až 1 g železa, v případě hemochromatózy mohou hodnoty dosáhnout rozmezí 25–30 g [23].

Hepatocyty přijímají z cirkulace železo vázané v transferrinu a volné sérové železo tzv. NTBI (non-transferrin-bound serum iron). NTBI se v oběhu objevuje, jestliže je organismus železem přetížen a je vyčerpána kapacita transferrinu. Transport NTBI do hepatocyty je zajištěn prostřednictvím DMT1 a také ZIP14 (zinc transporter), který je kromě zinku schopen přenášet i další stopové prvky, včetně železa [24].

Příjem vázaného železa hepatocyty zahrnuje tři mechanismy. Dva z nich jsou uskutečněny prostřednictvím transferrinových receptorů TfR1 a TfR2, jež tvoří s železem vázaným v transferrinu komplex. Endocytózou je komplex přenesen do intracelulárního prostoru. V endozomu se komplex rozpadá vlivem nízkého pH, volné železo je transportováno DMT1 do cytoplasmy, TfR a apotransferrin jsou recyklovány a znovu využity. Třetí mechanismus je na receptorech nezávislý, považuje se za důležitý, ale jeho princip zatím nebyl objasněn [24].

Extrémní požadavky na železo k udržení syntézy hemoglobinu jsou většinou získány recyklací železa z erytrocytů. Absorpce železa kompenzuje ztráty železa (krvácení) nebo jeho zvýšené potřeby (těhotenství, dětství). Železo v játrech slouží jako labilní intracelulární pool [23].



Obrázek 3 – Metabolismus železa v hepatocyту [24; KOHGO, IKUTA, OHTAKE, 2008, s. 9]

Hepatocyte – hepatocyt; *diferric transferrin* – železo vázané v transferrinu; *non-transferrin-bound iron* – volné železo; *TfR1* – transferrinový receptor 1; *TfR2* – transferrinový receptor 2; *receptor-independent route* – cesta nezávislá na receptoru; *ZIP14* – transportér zinku; *DMT1* – divalentní transportér kovů; *intracellular iron pool* – intracelulární zásoba železa; *endosome* – endozom.

2.1.6 Regulace metabolismu železa

U savců probíhá regulace metabolismu železa na dvou úrovních, buněčné a systémové. Buněčná úroveň regulace zahrnuje transkripci, posttranskripční a posttranslační mechanismy. U vyšších eukaryot jsou nejvíce využívány právě posttranskripční úpravy, prostřednictvím již zmíněného systému IRE-IRP. Systémovou regulaci metabolismu železa zajišťuje hepcidin [25].

Hepcidin a ferroportin

Z chemického hlediska je hepcidin peptid s molekulovou hmotností 2,7 kDa složený z 25 aminokyselin a 4 disulfidových můstků. Existují i formy s nižším počtem aminokyselin – hepcidin-22 a hepcidin-20. Hepcidin vzniká z prekursoru složeného z 84 aminokyselin, který je kódován genem na chromozomu 19.

Molekula hepcidinu má tvar vlásenky s NH₂ terminálním koncem, tvořeným šesti aminokyselinami, který je důležitý pro regulační funkci a schopnost interakce s ferroportinem [7, 26].

Hepcidin se syntetizuje v hepatocytech, odkud je secernován do krve, jež ho transportuje k cílovým tkáním. V krevní plasmě se nachází volně nebo tvoří slabou vazbu s albuminem a α 2-makroglobulinem. Vylučován je močí [7]. Funkce hepcidinu je spjatá s ferroportinem. Ferroportin je transmembránový protein, jehož funkcí je export intracelulárního železa do krevního oběhu. Vyskytuje se především na membránách enterocytů, hepatocytů a makrofágů, v menší míře na membránách buněk plic, renálních tubulů a prekurzorů erytrocytů [26].

Mechanismus účinku hepcidinu

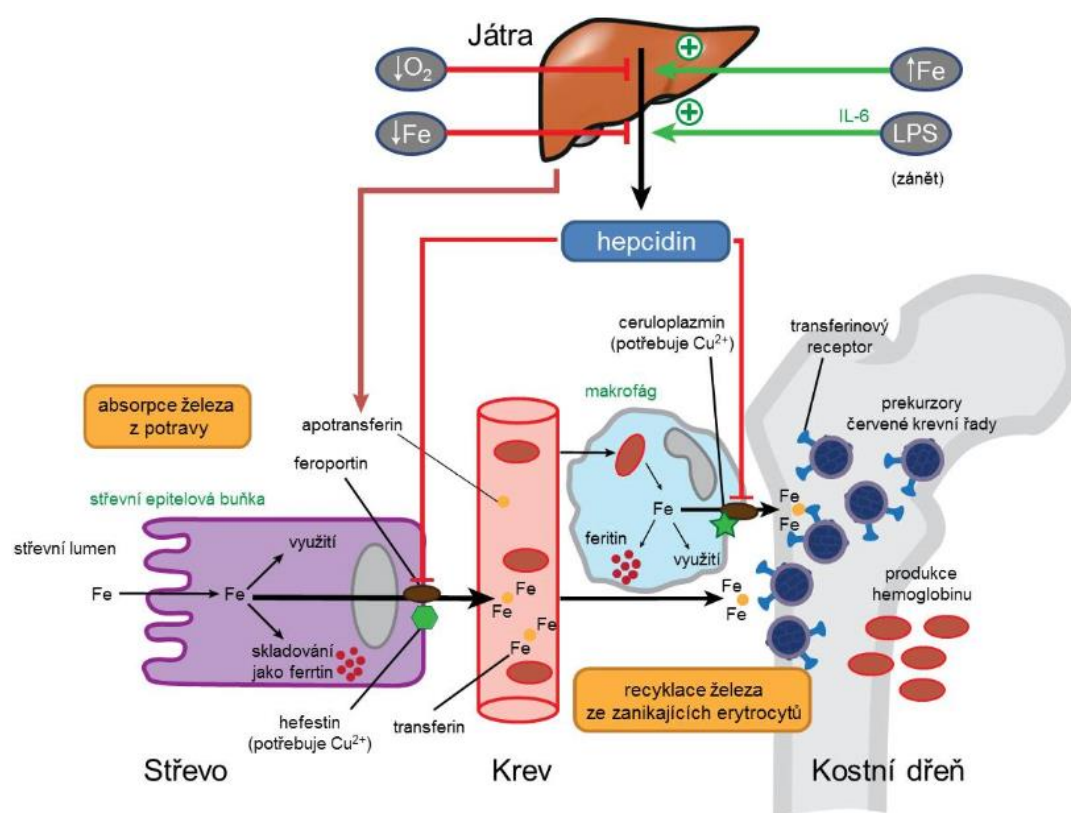
Hepcidin v organismu funguje jako hormon. Jeho funkcí je udržování homeostázy a řízení cirkulace železa. Váže se na ferroportin a vzniklý komplex přechází do buňky, v níž je degradován. Absencí ferroportinu na buněčné membráně dochází k zástavě transportu intracelulárního železa do extracelulárního prostředí [26].

Produkce hepcidinu je za fyziologických podmínek ovlivněna množstvím železa uloženého v zásobách a hladinou v krevním oběhu. Tímto způsobem je regulována absorpce železa v enterocytech. V případě dostatečných zásob a nadbytku železa v organismu dochází k produkci hepcidinu, který snižuje vstřebávání a výdej železa do krevního oběhu degradací ferroportinu. Pokud je železa nedostatek, produkce hepcidinu je utlumena a železo je ferroportinem uvolněno do cirkulace, kde se váže na transferrin [26]. Stejný mechanismus se uplatňuje u regulace recyklace železa v makrofázích [8].

Ke zvýšené produkci hepcidinu dochází při zánětu a infekci. Nadměrná produkce je způsobena zánětlivým mediátorem interleukinem 6, který aktivuje

syntézu hormonu z důvodu obrany proti infekci. Tato funkce hepcidinu je z fylogenetického hlediska primární – jejím cílem bylo zamezit přísunu železa bakteriálními buňkami a zabránit tak jejich růstu. Zmíněná regulace se však uplatňuje i u zánětů neinfekčního původu. Snížená hladina železa v cirkulaci s antimikrobiálním účinkem negativně ovlivňuje erytropoézu a při dlouhodobém působení zánětu hrozí rozvoj anémie, konkrétně anémie chronických chorob. Erytropoéza a hypoxie produkci hepcidinu potlačují [26].

Dlouhodobá zvýšená produkce hepcidinu vede ke vzniku anémie z nedostupnosti železa pro erytropoézu. Potlačení produkce a nedostatek hormonu naopak způsobují přetížení organismu železem, které se ukládá především v játrech [27].



Obrázek 4 - Mechanismus účinku hepcidinu [20; RACEK, Jaroslav. Vitamíny a stopové prvky [online]. [cit. 2019-05-08]. Dostupné z: <https://www.ceva-edu.cz/>].

2.2 Poruchy metabolismu železa

Poruchy metabolismu železa patří mezi patologické stavy. Mají dvojí charakter. Jedná se o nadbytek železa, způsobený zvýšenou kumulací prvku v organismu a v klinické praxi častější nedostatek železa [28].

2.2.1 Laboratorní ukazatelé

Sérové železo

Tabulka 1 - Sérové železo [29].

Charakteristika	ukazatel koncentrace železa v krvi
Referenční rozmezí Muži Ženy	12-32 $\mu\text{mol/l}$ 9-30 $\mu\text{mol/l}$
Nízké hodnoty	nedostatek železa, záněty, nefrotický syndrom, těhotenství, krvácení
Vysoké hodnoty	hemochromatóza, hyperchromní anémie, hemolytická anémie, thalasémie, hepatopatie

Ferritin

Tabulka 3 – Ferritin [29].

Charakteristika	ukazatel zásob železa v organismu
Referenční rozmezí Muži Ženy	30–284 $\mu\text{g/l}$ 14–186 $\mu\text{g/l}$
Nízké hodnoty	nedostatek železa, sideropenická anémie, v těhotenství, po porodu
Vysoké hodnoty	nadbytek Fe v organismu (hemochromatóza, hemosideróza), reakce organismu na akutní zátěž (záněty, nádory)

Transferrin

Tabulka 2 – Transferrin [29].

Charakteristika	hmotnostní koncentrace transferrinu v krvi
Referenční rozmezí	2–3 g/l
Nízké hodnoty	reakce akutní fáze, hepatopatie, těžká proteinová malnutrice, nefrotický syndrom, anémie u chronických infekcí a nádorových onemocnění, hemolytická anémie
Vysoké hodnoty	hypochromní anémie z nedostatku železa

Solubilní transferrinový receptor

Tabulka 4 - Solubilní transferrinový receptor [29].

Charakteristika	citlivý a specifický ukazatel nedostatku Fe v buňkách
Referenční rozmezí	
Muži	2,2–5,0 mg/l
Ženy	1,9–4,4 mg/l
Nízké hodnoty	útlum kostní dřeně, chronické renální selhání
Vysoké hodnoty	deficit železa, vystupňovaná erythropoéza (hemolytická anémie, polycytémie)

Saturace transferrinu

Tabulka 5 - Saturace transferrinu [29].

Charakteristika	podíl transferrinu saturovaného železem na celkovém transferrinu
Referenční rozmezí	
Muži	20-55 %
Ženy	15-50 %
Nízké hodnoty	nedostatek železa, sideropenická anémie, jaterní insuficience
Vysoké hodnoty	hemochromatóza, hemosideróza, užívání hormonální antikoncepce

Erytrocyty

Tabulka 3 – Erytrocyty [29].

Charakteristika	počet červených krvinek
Referenční rozmezí	
Muži	4,0–5,8 .10 ¹² /l
Ženy	3,8–5,2 .10 ¹² /l
Nízké hodnoty	deficit železa, anémie
Vysoké hodnoty	polycytémie, maligní onemocnění, thalasemie

Hemoglobin

Tabulka 4 – Hemoglobin [29].

Charakteristika	koncentrace červeného krevního barviva
Referenční rozmezí	
Muži	135–175 g/l
Ženy	120–160 g/l
Nízké hodnoty	deficit železa, anémie (hemolytické, chronických chorob, ...)
Vysoké hodnoty	polycytémie, sekundární polyglobulie

Hematokrit

Tabulka 5 – Hematokrit [29].

Charakteristika	poměr erytrocytů k celkovému objemu krve
Referenční rozmezí	
Muži	0,400–0,500
Ženy	0,350–0,470
Nízké hodnoty	deficit železa, anémie (hemolytické, chronických chorob, ...)
Vysoké hodnoty	polycytémie, maligní onemocnění, thalasemie

K dalším sledovaným parametrům patří například střední objem erytrocytu, střední hmotnost hemoglobinu v erytrocytu či střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytu [29].

2.2.2 Nedostatek železa

Nedostatek železa v organismu neboli sideropenie je stav způsobený mnoha různými příčinami doprovázený nespecifickými symptomy. Častými rizikovými faktory vzniku sideropenie jsou zvýšené požadavky na železo, zvýšená ztráta krve a omezení exogenních zdrojů (Tab. 1). Jako funkční nedostatek železa se označuje neschopnost organismu mobilizovat prvek ze zásob z důvodu patologicky vysoké produkce hepcidinu. Častým projevem nedostatku železa je anémie [28].

Tabulka 6 – Hlavní příčiny nedostatku železa [28].

Hlavní příčiny nedostatku železa
Zvýšené požadavky na železo
• Růst během dětství
• Těhotenství
• Léčba látkami stimulujícími erytropoézu
Omezení exogenních zdrojů železa
• Snížený příjem
• Nevhodná strava s nedostatkem železa nebo kyseliny askorbové
• Malabsorpce
- Resekce žaludku
- Infekce <i>Helicobacter pylori</i>
- Malabsorpční syndromy (Crohnova nemoc, celiakie)
• Interference léčivých přídatků (léky omezující tvorbu HCl)
Zvýšené ztráty
• Flebotomie
- Darování krve
- Dialýza (hemodialýza)
• Krvácení
- Chirurgická operace
- Trauma
- Gastrointestinální krvácení
- Genitourinární krvácení
- Krvácení z dýchacího traktu

Sideropenie má tři fáze – prelatentní, latentní a manifestní. Prelatentní fáze je charakterizovaná poklesem zásob železa, který se organismus snaží kompenzovat

zvýšeným vstřebáváním železa v gastrointestinálním traktu, snížením výdeje a zástavou tvorby ferritinu. Pokles železa prelatentní fáze obvykle nemá vliv na tvorbu erytrocytů. U více než 50 % pacientů klesá hladina ferritinu v séru pod dolní referenční mez [4].

Při latentní fázi dochází k vyčerpání a úplnému deficitu zásob železa. U více než 90 % pacientů klesá hladina sérového ferritinu pod 12 $\mu\text{g/l}$. Snížená je také hladina železa v séru a saturace transferrinu, která činí méně než 16 %. Naopak zvýšená je celková vazebná kapacita transferrinu pro železo, koncentrace solubilních cirkulujících transferrinových receptorů v séru (nad 5–8 mg/l). Je omezena dodávka železa pro erythropoézu. V kostní dřeni dochází k poklesu počtu sideroblastů pod 30 % [4]. Sideroblasty jsou normoblasty obsahující v cytoplasmě zásobní železo, jehož množství lze stanovit speciálním barvením nátěru kostní dřene [30]. Pro diagnostiku latentní fáze je zásadní kombinace vyšetření hladiny ferritinu v séru a saturace transferrinu, které jsou pro tuto fázi specifické a lze jimi odhalit až 95 % nemocných. Včasná diagnostika latentní fáze je důležitá pro léčbu sideropenie [4].

Při manifestní fázi sideropenie dochází k poklesu hemoglobinu, rozvoji sideropenické anémie, která je nejčastějším druhem anémie vůbec. Ferritin v séru klesá pod 5 $\mu\text{g/l}$, saturace transferrinu se snižuje pod 10 %. V kostní dřeni vzniká deficit zásobního železa a počet sideroblastů klesá pod 10 % celkového počtu [4].

Anémie

Anémie je patologický stav, považovaný za symptom onemocnění, nikoliv za diagnózu samotnou. Anémie je charakterizovaná sníženou hladinou hemoglobinu, hematokritu, nebo obou ukazatelů pod fyziologické rozmezí pro dané pohlaví a věk. Ženy mají fyziologicky nižší počet erytrocytů a nižší hladinu hemoglobinu než muži [31].

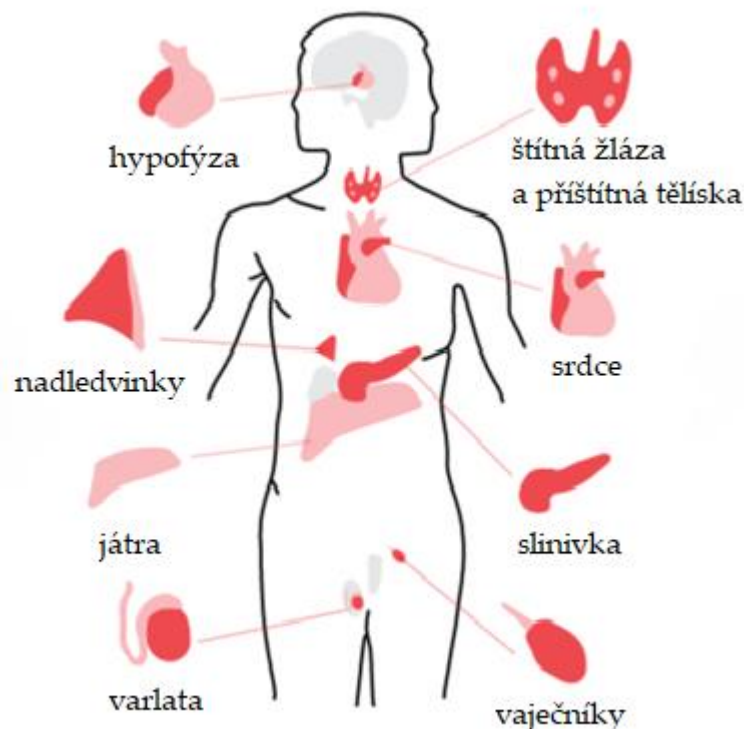
Klinické příznaky anémie se odvíjejí od míry hypoxie tkání a základního onemocnění. Mezi příznaky patří celková slabost, únava a malátnost; dále bolesti hlavy, poruchy spánku a koncentrace, zvýšená citlivost na chlad. Při poklesu hemoglobinu pod 90 g/l se objevuje bledost kůže a sliznic. Intenzita příznaků je závislá na rychlosti vzniku a stupni anémie, na schopnosti organismu nedostatek hemoglobinu kompenzovat a na věku postiženého. Starší pacienti jsou ohroženi více než pacienti mladší [31].

Anémie lze rozdělit z morfologického a etiopatogenetického hlediska. Morfologické hledisko zahrnuje dělení anémií dle MCV – středního objemu erytrocytů na mikrocytární, normocytární a makrocytární. Druhý typ dělení je podle mechanismu vzniku onemocnění – anémie z nedostatečné tvorby erytrocytů, anémie ze zvýšené ztráty erytrocytů a akutní posthemorhagická anémie [32].

2.2.3 Nadbytek železa

Nadbytek železa v organismu je stejně jako jeho nedostatek nežádoucí stav způsobený poruchou metabolismu železa. Vysoká kumulace prvku v těle vzniká v důsledku mnoha poruch a může vést k nenávratnému poškození orgánů, až k smrti. Poruchy lze rozdělit do dvou základních skupin – primární a sekundární akumulace železa [33].

Intenzita klinických příznaků je závislá na věku. S vyšším věkem se příznaky zhoršují, hemochromatóza se obvykle projevuje až po čtyřicátém roce života. Příznaky nadbytku železa jsou bolesti břicha a ubývání na váze. Dále únava, slabost, jaterní léze, hepatomegalie, diabetes mellitus, poruchy srdeční funkce, zánět kloubů, porucha funkce pohlavních žláz vedoucí k neplodnosti. Typická je také pigmentace kůže označovaná jako bronzový diabetes a další. Riziko přetížení organismu železem je nižší u dárců krve a u žen v plodném věku [33].



Obrázek 5 – Orgány postižené přetížením železem; upraveno dle [34].

Primární akumulace železa

Příkladem primární akumulace železa je hereditární hemochromatóza a další geneticky podmíněné poruchy. Při hereditární hemochromatóze dochází k narušení regulace vstřebávání železa a jeho nadbytek se ukládá do orgánů. Dělí se na 4 typy dle mechanismu onemocnění. Typ 1 je autozomálně recesivní onemocnění s poměrně častým výskytem. Diagnostika onemocnění je umožněna biochemickým a molekulárně-biologickým vyšetřením, používají se také zobrazovací metody (sonografie) či histologické vyšetření [33].

- Hemochromatóza – typ 1

Příčinou onemocnění bývá mutace genu HFE, lokalizovaného na 6. chromozomu. Protein HFE se za fyziologických podmínek váže s beta-2-mikroglobulinem. Vzniklý komplex obsazuje TfR1 a TfR2 enterocytů a hepatocytů. Dochází ke snížení afinity receptorů k transferrinu. V případě mutovaného proteinu HFE nedochází

ke vzniku komplexu s beta-2-mikroglobulinem, k jeho transportu na povrch enterocytů a hepatocytů nebo k navázání na TfR. Přesný mechanismus není znám [35].

Akumulací železa jsou nejdříve ohroženy játra, plíce a ledviny, později slezina, srdce či pankreas. Hromadění železa v játrech způsobuje poškození orgánových struktur a mechanismů, například oxidativní poškození mastných kyselin, poruchu lysozomů nebo aktivaci hvězdčovitých buněk, která zapříčiňuje zvýšenou produkci kolagenů a následný rozvoj jaterní fibrózy. Nekrózu hepatocytů dále ovlivňuje zvýšená tvorba kyslíkových radikálů jako následek aktivace Kupfferových buněk. Nadbytek železa urychluje apoptózu hepatocytů, jejíž rychlost je úměrná obsahu železa v játrech [35].

- Hemochromatóza – typ 2

Juvenilní hemochromatóza je z genetického hlediska také autozomálně recesivní onemocnění. Má dvě formy. První forma je charakterizována mutacemi genu pro hemojuvelin, protein ovlivňující expresi hepcidinu. Druhou formu způsobuje mutace genu pro hepcidin. Z toho vyplývá, že akumulace železa je zapříčiněna nízkou hladinou hepcidinu nebo potlačením jeho aktivity. Oproti hemochromatóze typu 1 se typ 2 vyznačuje těžšími příznaky akumulace železa. Častým projevem je hypogonadismus a postižení myokardu [33].

- Hemochromatóza – typ 3

Jedná se o autozomálně recesivní, poměrně vzácný typ onemocnění způsobený mutacemi genu, který kóduje TfR2. K hromadění železa pravděpodobně dochází z důvodu snížené exprese hepcidinu zapříčiněné porušenou funkcí TfR2. Projevy hemochromatózy typu 3 jsou podobné jako u typu 2, jsou však o něco závažnější [33].

- Hemochromatóza – typ 4

Hemochromatóza typu 4 je autozomálně dominantní onemocnění označované jako ferroportinová choroba. Onemocnění způsobují mutace genu SLC40A, který kóduje ferroportin. Mezi časté projevy hromadění železa patří jaterní cirhóza, diabetes či arytmie [33].

Tabulka 7 – Diagnostické charakteristiky různých typů hemochromatózy [Horák, 2010, s. 46].

Hereditární hemochromatóza	Diagnóza	Klinické příznaky
Typ 1	zvýšené hladiny sérového železa	nástup během 40.-50. roku života, progresivní akumulace železa v parenchymu
Typ 2 – juvenilní	zvýšené hladiny sérového železa, ferritinu, saturace transferrinu	nástup během 2. dekády života, hypogonadismus, kardiopatie
Typ 3	zvýšené hladiny sérového železa, ferritinu, saturace transferrinu	nástup během 40.-50. roku života, progresivní akumulace železa v parenchymu
Typ 4 – ferroportinová choroba	zvýšené hladiny sérového ferritinu, normální hladiny sérového železa, saturace transferrinu	předchází akumulace železa v RES

Sekundární akumulace železa

Sekundární akumulace železa označovaná jako hemosideróza vzniká následkem definovatelných příčin nebo jiných chorob [33].

Tabulka 8 – Příčiny sekundární akumulace železa [Horák, 2010, s. 67].

Příčiny akumulace železa
jaterní choroby (jaterní cirhóza, chronická hepatitida C, nealkoholová steatohepatitida, etylické poškození jater)
anémie s hromaděním železa
- hemolytické
- dyserytroetické
opakované transfuze
zvýšený perorální přívod železa
parenterální podávání železa
novorozenecká hemochromatóza
ostatní (hemodialýza, akumulace mědi, deficit pyruvátkinázy, kongenitální attransferrinémie)

2.2.4 Léčba

Léčba nedostatku železa v prvním kroku zahrnuje zjištění příčiny nízké hladiny prvku, a pokud je to možné, i její odstranění. Druhý krok léčby představuje suplementace dostatečným množstvím železa, která je zajištěna užíváním přípravků obsahující prvek. Přípravky se železem se podávají perorálně rovnoměrně během dne dostatečně dlouhou dobu. Denní dávka činí 180–200 mg železa. Ideální je užití přípravku nalačno nebo více než 2 hodiny po jídle, jelikož některé látky mohou ovlivnit jeho resorpci [4].

V případě pacientů, u nichž je příčinou nedostatku železa porušená resorpce ve střevě, podává se železo parenterálně. Běžná dávka činí přibližně 100 mg elementárního železa jednou denně. Nevýhodou je vysoká četnost vedlejších účinků způsobených rychlým uvolněním železa. Novější přípravky tvořené komplexem Fe^{3+} a karboxymaltósy uvolňují železo pomalu a rovnoměrně, čímž zajišťují lepší diagnostický účinek s minimálním rizikem vedlejších účinků. Dávkování přípravků je jednou týdně [4].

Léčba nadbytku železa je založena na snížení jeho hladiny. Uskutečňuje se pomocí krevních odběrů – flebotomie. Intenzivní léčba zahrnuje odběr 500 ml krve (250 mg železa) jednou až dvakrát týdně. Pokud dojde u pacienta ke snížení železa pod fyziologickou mez, následuje léčba udržovací, která se odvíjí od hladiny ferritinu. Obvykle se jedná o jeden odběr za tři měsíce. Ve výjimečných případech, při intoleranci krevních odběrů (pacienti s nedostatečnou syntézou plazmatických bílkovin, hemolytickou anémií či poruchou erythropoézy), se užívá léčba erythrocytaferézou nebo chelatačními činidly [33].

3 CÍL PRÁCE

Cílem bakalářské práce je podání uceleného přehledu o obecných vlastnostech a úloze železa v organismu, především charakteristika metabolismu a jeho poruch.

Součástí praktické části bude popis laboratorních metod využívaných v klinické praxi k vyšetření metabolismu železa a diagnostice poruch. Také budou uvedeny kazuistiky pacientů s nedostatkem či nadbytkem železa v organismu, které budou vyhodnoceny na základě získaných teoretických znalostí.

4 METODIKA

4.1 Odběr a příprava vzorků

Pro veškerá stanovení je důležitý správný odběr vzorku a použití vhodných zkumavek či odběrových nádobek. Vyšetření lze provést z krevního séra i plasmy. V laboratoři ÚKBH FN Plzeň (Ústav klinické biochemie a hematologie Fakultní nemocnice Plzeň) je využíván uzavřený odběrový systém Vacuette Greiner®, zajišťující bezpečný a kvalitní odběr.

4.1.1 Zkumavky pro vyšetření metabolismu železa

Zkumavka Vacuette zelená – heparinová plasma

- Objem 4 ml plné krve
- Obsahuje lithium heparin (antikoagulans), separační gel
- Centrifugace do 1 hod



Obrázek 6 – Zkumavka Vacuette zelená [29; ÚKBH FN Plzeň [online]. [cit. 2019-04-25].

Dostupné z: <https://ukbh.fnplzen.cz/>.

Zkumavka Vacuette červená – sérum

- Objem 4 ml plné krve
- Obsahuje separační gel, silikátové částice (aktivace hemokoagulace)
- Centrifugace do 1 hod



Obrázek 7 – Zkumavka Vacuette červená [29; ÚKBH FN Plzeň [online]. [cit. 2019-04-25].

Dostupné z: <https://ukbh.fnplzen.cz/>.

4.1.2 Zkumavky pro vyšetření krevního obrazu

Zkumavka Vacuette fialová – nesrážlivá krev

- Objem 3 ml nebo 2 ml
- Obsahuje antikoagulační činidlo K_3EDTA (vyvazuje Ca^{2+} ionty), bez gelu
- Valivá třepačka



Obrázek 8 – Zkumavka Vacuette fialová [29; ÚKBH FN Plzeň [online]. [cit. 2019-04-25].

Dostupné z: <https://ukbh.fnplzen.cz/>.

4.1.3 Odběr žilní krve

Odběr je důležité provést ráno nalačno z důvodu diurnálního rytmu železa. Pacient musí být poučen o vynechání tučných jídel, kávy, alkoholu a kouření večer před odběrem či o vynechání léků (pokud je to možné) 24–72 hodin před odběrem. Během odběru by pacient neměl jíst ani žvýkat [36].

Na identifikační štítek zkumavky napíšeme:

- jméno a příjmení pacienta
- rodné číslo
- diagnózu
- datum a hodinu odběru
- případně další informace – oddělení, plátce [36].

Venepunkce se standardně provádí v oblasti předloktí. V předloketní jamce se nacházejí čtyři snadno viditelné žíly se širokým průsvitem. Preferována je kubitální žíla, která je nejstabilnější, nachází se blízko povrchu a pokožka nad ní je nejméně citlivá. Paže by měla být v natažené pozici podložena opěrkou. Pacient je vyzván k sevření pěsti, použití turniketu déle než jednu minutu či opakované „pumpování“ jsou nevhodné z důvodu možného vlivu na laboratorní výsledek [36].

Následuje dezinfekce místa vpichu. Dezinfekci je nutné nechat dostatečně oschnout jako prevenci hemolýzy vzorku a odstranění pocitu pálení v místě odběru. Vpich je proveden po uplynutí doby expozice stanovené výrobcem přípravku (15–30 sekund) [36].

Použití odběrového vakuového uzavřeného systému:

- upevnění odběrové jehly v aplikátoru
- nasazení jednorázových ochranných rukavic
- uchopení pacientovy paže
- fixace žíly přimáčknutím palcem přibližně 2–5 cm pod místem vpichu
- provedení venepunkce
- pevné uchopení aplikátoru, zatlačení zkumavky a udržení pod místem vpichu
- zamezení pohybu a zachování konstantního tlaku na konec zkumavky ve směru jehly
- naplnění zkumavky dostatečným množstvím krve (podtlak, ryska)
- vyjmutí zkumavky z aplikátoru, když krev přestane téct
- v případě potřeby je možné do aplikátoru vložit další zkumavku [36].

Po odběru dostatečného množství krve je na místo vpichu i s jehlou položeno sterilní krytí, které je při odstranění jehly ze žíly jemně přitlačeno pracovníkem tak, aby nedošlo k poranění cévní stěny či ke kožnímu poranění pacientovy paže. Po vytažení jehly se pomocí sterilního tamponu a přiměřeného tlaku zastaví krvácení. Místo vpichu se očistí a sterilně zakryje [36].

CHYBY:

- pacient nebyl nalačno (chylózní sérum)
- nevysazení léků dle doporučení lékaře
- odběr provedený po infuzi, po fyzické zátěži, nebyl proveden ráno
- stažení paže, nadměrné cvičení
- prudké třepání krve ve zkumavce

- použití nevhodné zkumavky či jehly
- nedostatečné zaschnutí dezinfekčního přípravku na kůži
- nečasné doručení vzorků do laboratoře
- vystavení vzorků světlu, teplu
- nečasné oddělení séra/plasmy od krevního koláče či erytrocytů
- nedostatečný objem vzorku ve zkumavce
- špatné nebo chybějící označení zkumavky
- chybějící žádanka [36].

4.2 Hematologické vyšetření

Pro onemocnění spojená s poruchami metabolismu železa je kromě biochemických ukazatelů důležité stanovení červeného krevního obrazu. Vyšetření zahrnuje stanovení počtu erytrocytů, koncentrace hemoglobinu, hematokritu, střední objem erytrocytu, střední obsah a střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytu.

Pro hematologická vyšetření v laboratoři ÚKBH FN Plzeň slouží analyzátory firmy Beckman Coulter. Hematologická linka obsahuje 2 analyzátory DxH 800, které stanovují parametry krevního obrazu, automatickou linku pro zhotovení a barvení krevních nátěrů a počítač. DxH 800 je automatický hematologický analyzátor s modulární koncepcí umožňující rozšíření či doplnění linky dle požadavků laboratoře [37].



Obrázek 9 – Hematologická linka [29; ÚKBH FN Plzeň [online]. [cit. 2019-04-25].

Dostupné z: <https://ukbh.fnplzen.cz/>.

Před samotným provedením vyšetření je nutné zadání požadavků do informačního systému laboratoře. Ze systému jsou tyto požadavky automaticky přeneseny do řídicího počítače analyzátoru, čímž je u vzorků zajištěna analýza pouze požadovaných parametrů [37].

Zkumavky se vzorky označené štítkem s identifikací pacienta a čárovým kódem se vkládají do pětímístných stojánek (racků), které se umísťují do vstupní části analyzátoru. Poté jsou racky automaticky odsunuty do podavače s vestavěnou čtečkou čárových kódů a jednotlivé zkumavky v racku jsou postupně načteny. Načítání kódů vylučuje riziko záměny vzorků [37].

Po načtení kódů je rack posunut do automatického kazetového podavače, který zajišťuje šetrné promíchání vzorků otáčením zkumavek dnem vzhůru. Promíchané vzorky jsou pak pomocí jehly aspirovány a analyzovány. Když je proces analýzy dokončen, dochází k posunutí racků do výstupní části analyzátoru [37].

DxH 800 je vybaven speciálním vstupem pro statimové a další vzorky s potřebou přednostního vyšetření a rychlého vydání výsledku. Také obsahuje systém pro manuální aspiraci vzorků včetně ruční čtečky čárových kódů potřebný pro vyšetření vzorků v otevřeném odběrovém systému [37].

4.2.1 Stanovení červeného krevního obrazu

Velikost a počet erytrocytů

Princip stanovení počtu a velikosti erytrocytů je impedanční. Po aspiraci vzorku dochází k jeho naředění a pomocí hydrodynamické fokusace procházejí buňky skleněnou trubičkou do detekční komory s měřicí aperturou. Apertura je umístěna mezi dvěma elektrodami, jimiž prochází stejnosměrný proud. Při průchodu jednotlivých elementů detekční zónou dochází ke změně odporu proudu, která vyvolá napěťový impuls. Velikost impulsu je úměrná velikosti objemu detekovaného elementu a počet impulsů odpovídá počtu elementů prošlých detekční zónou [37].

Hematokrit

Hodnota hematokritu se získává na analyzátoru součtem napěťových impulsů z impedančního měření erytrocytů [29].

Hemoglobin

Hemoglobin se stanovuje fotometricky. Vzorek reaguje s lyzačním činidlem, které obsahuje sodium lauryl sulfát (SLS). Dochází k rozpadu buněk, uvolnění a změně konformace hemoglobinu a oxidaci železa. Následně vzniká komplex SLS-hemoglobin, jehož koncentrace je stanovena spektrofotometrem [29].

Střední objem erytrocytu

Počítaný parametr. Jedná se o podíl hodnoty hematokritu a počtu erytrocytů [29].

Střední množství hemoglobinu v erytrocytu

Počítaný parametr. Jedná se o podíl koncentrace hemoglobinu a počtu erytrocytů [29].

Střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytu

Počítaný parametr. Jedná se o podíl koncentrace hemoglobinu a hodnoty hematokritu [29].

4.2.2 Manuální zhotovení a obarvení krevního nátěru

Hodnocení obarveného krevního nátěru patří k základnímu hematologickému vyšetření. Z nátěru se stanovuje diferenciální rozpočet a morfologie krevních elementů, případně slouží k určení jednotlivých vývojových stádií těchto elementů. V ÚKBH FN Plzeň jsou krevní nátěry zhotovovány automatickou linkou Beckman Coulter. V případě nedostatečně kvalitního nátěru či v malých laboratořích se nátěry zhotovují manuálně a vyšetřují se pod mikroskopem [29].

Zhotovení krevního nátěru

Krevní nátěr lze zhotovit z nativně odebrané kapky krve (kapilární či žilní odběr), případně z nesrážlivé krve do 2 hodin po odběru. Zkumavku je nutné důkladně promíchat [39].

Pracovní postup:

- příprava podložního sklíčka, které musí být čisté, suché, odmaštěné (nedotýkat se plochy, pouze hrany či matné plošky určené pro identifikaci)
- identifikace vzorku na kraj sklíčka
- nanesení kapky krve cca 0,5 cm od pravého okraje sklíčka
- přiložení zabroušeného roztěrového sklíčka před kapku (z levé strany)
- posunutí roztěrového sklíčka ke kapce tak, aby se krev roztekla po celé hraně
- rozetření kapky plynulým pohybem v úhlu 45 stupňů směrem k levé straně
- nátěr by se měl rovnoměrně ztenčovat a dosahovat zhruba 2/3 podložního sklíčka [39].

Barvení krevního nátěru

Barvení se provádí dle Pappenheimovy metody. Před barvením je důležité nechat sklíčko s nátěrem minimálně 10 minut schnout při laboratorní teplotě [40].

Potřebné reagentie – pracovní roztoky:

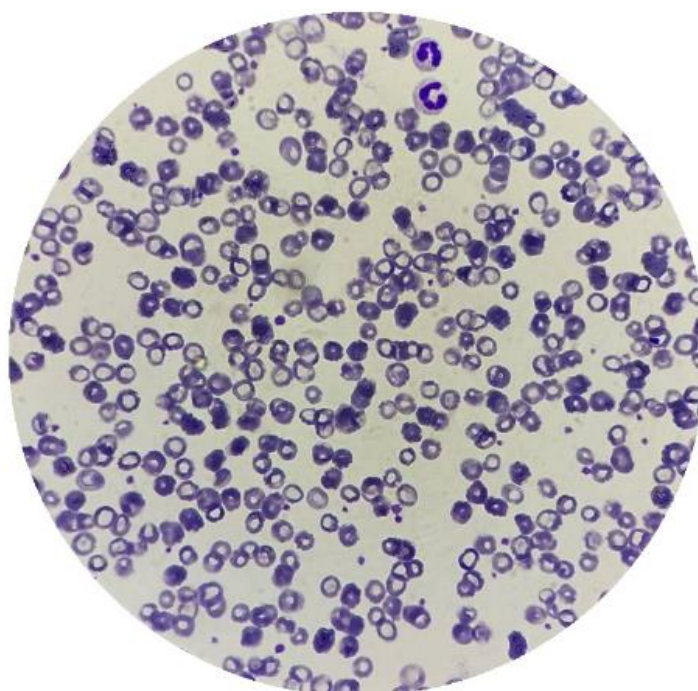
- pracovní roztoky jsou do laboratoře dodávané namíchané
- fixační roztok May Grünwald: eozin, metylenová modř, metylalkohol, glycerol
- barvicí roztok Giemsa-Romanowski: azureozin II, azur II, glycerol, metylalkohol
- fosfátový pufr (pH 6,7–6,8) [40].

Pracovní postup:

- fixace nátěru v roztoku May Grünwald 10 min
- opláchnutí nátěru promývacím roztokem – fosfátovým pufrem
- barvení nátěru roztokem Giemsa-Romanowski 10 min
- opláchnutí nátěru promývacím roztokem – fosfátovým pufrem
- opakované propláchnutí promývacím roztokem
- opláchnutí nátěru pod tekoucí vodou, nechat zaschnout [40].

Výsledky krevních nátěrů

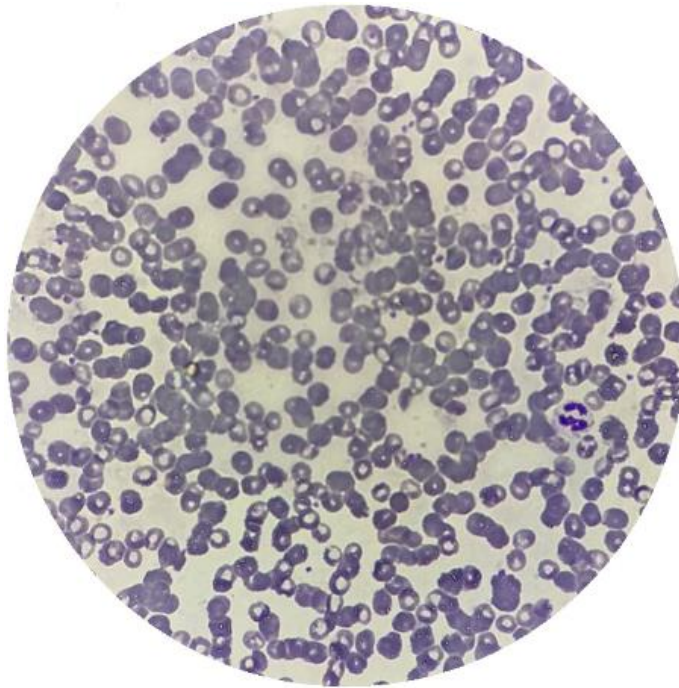
Nátěry byly pozorovány optickým mikroskopem Axio Scope.A1 německé značky Zeiss přes imerzní olej pod imerzním objektivem při tisícinásobném zvětšení.



Obrázek 10 - Krevní nátěr, nízká koncentrace hemoglobinu, zvětšení 1 000× [vlastní zdroj].

Na obrázku 10 je mikroskopické zobrazení krevního nátěru pacienta se sideropenickou anémií. V preparátu se nachází velké množství erytrocytů s výrazným centrálním projasněním. Jedná se o hypochromii, která je důsledkem nízkého obsahu hemoglobinu v erytrocytech z důvodu

nedostatku železa v organismu. V menší míře jsou v preparátu pozorovatelné mikrocyty (průměr menší než $6,7\ \mu\text{m}$), jež jsou typické pro anémii způsobené nedostatkem železa.



Obrázek 11 - Krevní nátěr, normální koncentrace hemoglobinu, zvětšení $1\ 000\times$ [vlastní zdroj].

Na obrázku 11 je mikroskopické zobrazení krevního nátěru zdravého člověka. Velikost erytrocytů je fyziologická, lze je označit normocyty ($7,2$ až $7,6\ \mu\text{m}$). Převažují erytrocyty bez nebo s mírným zesvětlením středu. Mírné centrální projasnění je fyziologické, způsobené bikonkávním tvarem erytrocytu, střed je oproti periférii ztenčený.

4.3 Biochemické vyšetření

K vyšetření vzorků pro stanovení laboratorních ukazatelů metabolismu železa v laboratoři ÚKBH FN Plzeň slouží analytický systém Cobas® 8 000. Jedná se o automatizovaný modulární systém dodávaný švýcarskou společností Roche Diagnostics. Výhodou linky je stavebnicový princip umožňující variabilní kombinaci a poskládání jednotlivých typů modulů dle potřeb laboratoře [38].



Obrázek 12 – Analytický systém Cobas 8 000 [29; ÚKBH FN Plzeň [online]. [cit. 2019-04-25].

Dostupné z: <https://ukbh.fnplzen.cz/>.

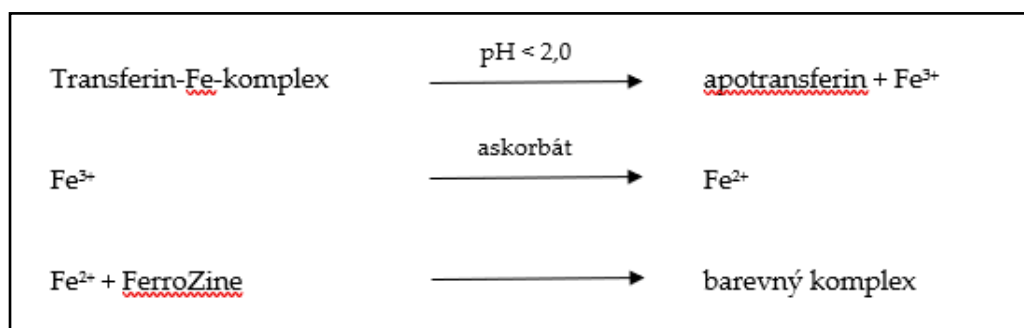
Základní jednotkou analytického systému je Core modul, který tvoří vstupní a výstupní jednotka a obslužný systém zajišťující dopravu stojánek se vzorky k jednotlivým analyzátorům. Stojánky jsou plastové pětimístné se speciálními drážkami, jimiž se umísťují do vstupní jednotky. Rozlišují se stojánky určené pro kontroly, kalibrace a vzorky. Součástí linky jsou počítače, které slouží k propojení analyzátorů s informačním systémem laboratoře. Do vstupní jednotky linky se vkládají stojánky se vzorky ve zkumavkách s čárovým kódem, které je oproti hematologickému analyzátoru nutné vkládat bez víčka, jelikož se vyšetřuje sérum či plasma a zkumavky se nepromíchávají [38].

4.3.1 Stanovení železa

Koncentrace železa v séru či plasmě je závislá na příjmu železa z potravy a vykazuje cirkadiánní kolísání. Proto by si každá laboratoř měla prověřit převoditelnost očekávaných hodnot na svou populaci pacientů. Stanovení železa probíhá pomocí biochemického analyzátoru C 702, části automatické linky Cobas 8 000 [41].

Princip stanovení

Železo se v kyselém prostředí uvolní z transferrinu. Lipemické vzorky jsou vyčeřeny pomocí detergentu. Uvolňované ionty Fe^{3+} jsou askorbátem redukovány na Fe^{2+} , které pak reagují s ferrozinem za tvorby barevného komplexu. Intenzita vytvářeného zbarvení je přímo úměrná koncentraci železa a měří se fotometricky při 570 nm [41].



Obrázek 13 - Princip stanovení železa [41; ROCHE DIAGNOSTICS, 2016, s. 1].

Potřebné reagensy – pracovní roztoky:

- R1: kyselina citronová (200 mmol/l), thiourea (115 mmol/l), detergent
- R3: askorbát sodný (150 mmol/l), FerroZine (6 mmol/l), konzervans [41].

4.3.2 Stanovení transferrinu

Hmotnostní koncentrace transferrinu se stanovuje ze séra či plasmy na biochemickém analyzátoru C 702, části automatické linky Cobas 8 000 [42].

Princip stanovení

Při stanovení transferrinu se využívá imunologické aglutinace. Principem vyšetření je tvorba precipitátu při reakci lidského transferrinu se specifickým antisérem. Měří se pomocí turbidimetrie [42].

Potřebné reagensie – pracovní roztoky:

- R1: fosfátový pufr o pH 7,2 (55 mmol/l), NaCl (25 mmol/l), 5% polyetylglykol, konzervans
- R3: protilátka proti lidskému transferrinu (králičí), NaCl (100 mmol/l), konzervans [42].

4.3.3 Stanovení solubilního transferrinového receptoru

Hmotnostní koncentrace solubilního transferrinového receptoru se stanovuje ze séra či plasmy na biochemickém analyzátoru C 702 [43].

Princip stanovení

Jedná se o částicové turbidimetrické imunologické stanovení. Solubilní transferrinový receptor tvoří aglutinát s latexovými částicemi, které jsou potažené protilátkou vůči tomuto receptoru. Precipitát se měří fotometricky při 570 nm [43].

Potřebné reagensie – pracovní roztoky:

- R1: TES/HCl pufr o pH 7,7 (20 mmol/l), NaCl (500 mmol/l), konzervans
- R3: latexové částice (potažené monoklonální protilátkou proti lidskému sTfR), TRIS/HCl pufr o pH 8,0 (20 mmol/l), konzervans [43].

4.3.4 Stanovení ferritinu

Koncentrace ferritinu se stanovuje ze séra či plasmy na imunochemickém analyzátoru Roche Cobas e 411 [44].

Princip stanovení

Stanovení je elektroluminiscenční, princip testu je sendvičový. V prvním kroku dochází k inkubaci 10 μ L vzorku, biotinylované monoklonální protilátky proti ferritinu a monoklonální protilátky proti ferritinu, značené rutheniovým komplexem. Směs reaguje za vzniku sendvičového komplexu [44].

V druhém kroku dochází k přidání mikročastic potažených streptavidinem a po inkubaci se komplex váže na pevnou fázi prostřednictvím interakce mezi biotinem a streptavidinem [44].

Vzniklá reakční směs je automaticky nasáta do měřicí cely. V měřicí cele jsou prostřednictvím magnetu zachyceny mikročástice s navázanými komplexy. Nenavázané složky směsi jsou odstraněny pomocí roztoku ProCell (systémový pufr). Napětí pracovní elektrody vyvolá chemiluminiscenční emisi fotonů, která je detekována a změřena fotonásobičem [44].

Výsledná koncentrace ferritinu je stanovena z kalibrační křivky specifické pro analyzátor. Je vytvořena dvoubodovou kalibrací a z master křivky, která je do přístroje načtena z čárového kódu reagentie [44].

Potřebné reagentie – pracovní roztoky:

- M: mikročástice potažené streptavidinem (0,72 mg/ml), konzervans (6,5 ml)
- R1: Anti-Ferritin-Ab~biotin (10 ml):
 - biotinylovaná monoklonální (myší) protilátka proti ferritinu (3,0 mg/l),
 - fosfátový pufr o pH 7,2 (100 mmol/l), konzervans

- R2: Anti-ferritin-Ab~Ru(bpy) (10 ml):
monoklonální (myší) protilátka proti ferritinu značená rutheniovým komplexem (6,0 mg/l), fosfátový pufr o pH 7,2 (100 mmol/l), konzervans [44].

4.3.5 Stanovení saturace transferrinu

Saturace transferrinu je počítaný parametr. K výpočtu saturace je potřebná naměřená koncentrace železa a naměřená koncentrace transferrinu v plasmě nebo séru. Jedná se o podíl transferrinu, který je saturovaný železem ku celkovému transferrinu, nebo poměr koncentrace sérového/plasmatického železa ku celkové vazebné kapacitě transferrinu [29].

5 VÝSLEDKY

5.1 Kazuistika 1

Anamnéza a nynější onemocnění

- muž, 46 let
- doposud bez zdravotních problémů a léčby
- pád při hokeji, poranění hlavy
- vyšetření a observace ve FN Plzeň.

Laboratorní vyšetření

- Hematologie – červený krevní obraz

Tabulka 9 - Výsledky červeného krevního obrazu

Měřený parametr	Výsledek	Referenční rozmezí	Jednotka
Erytrocyty (Ery)	3,96	4,50–5,30	.10 ¹² /l
Hemoglobin (Hb)	70	135–175	g/l
Hematokrit (Hct)	0,230	0,400–0,500	
MCV	58	82–98	fl
MCH	17,7	28,0–34,0	pg
MCHC	304	320–360	g/l

Z laboratorních výsledků bylo zjištěno, že všechny parametry červeného krevního obrazu jsou snižené. Pacientovi byla diagnostikována těžká anémie. Nízká hodnota MCV při počtu erytrocytů pouze málo sníženém je typická pro nedostatek železa.

- Biochemie – ukazatele metabolismu železa

Tabulka 10 – Výsledky biochemického vyšetření

Měřený parametr	Výsledek	Referenční rozmezí	Jednotka
Železo	2,1	9–34	μmol/l
Transferrin	3,31	2,0–3,6	g/l
Saturace transferrinu	3	20,0–50,0	%
Ferritin	13	30–284	μg/l
sTfR	10,28	2,2–5,0	μg/l

Z biochemického vyšetření byly zjištěny nízké hodnoty sérového železa, ferritinu a saturace transferrinu, naopak zvýšená byla hladina solubilního transferrinového receptoru. Koncentrace transferrinu splňovala referenční rozmezí.

Dvojnásobně až trojnásobně zvýšená koncentrace solubilního transferrinového receptoru je typická pro deficit železa. Snížená saturace transferrinu o více než 15 % a nízké koncentrace železa a ferritinu sideropenii potvrzují.

Dalším postupem bylo zjišťování příčiny nedostatku železa. Vyšetřením gastrointestinálního traktu (GIT) byly vyloučeny poruchy související s absorpcí prvku včetně celiakie. Příčinou anémie byly s největší pravděpodobností krevní ztráty způsobené hemoroidy. Léčba byla zprostředkována operací hemoroidů a suplementací železa.

5.2 Kazuistika 2

Anamnéza a nynější onemocnění

- chlapec, 3 roky a 3 měsíce
- porod i vývoj normální
- při preventivní prohlídce zjištěna těžká anémie
- bledá kůže, sliznice, odpolední únava
- matka uvádí normální stravu, včetně masa

Laboratorní vyšetření

- Hematologie – červený krevní obraz

Tabulka 11 – Výsledky červeného krevního obrazu

Měřený parametr	Výsledek	Referenční rozmezí	Jednotka
Erytrocyty (Ery)	4,50	3,90–5,30	.10 ¹² /l
Hemoglobin (Hb)	58	115–135	g/l
Hematokrit (Hct)	0,221	0,340–0,400	
MCV	49,1	75-87	fl
MCH	12,9	23,0–27,0	pg
MCHC	262	300–370	g/l

Z červeného krevního obrazu je patrné, že pacient má nižší hladinu hematokritu a středního objemu erytrocytů. Velmi nízká je koncentrace hemoglobinu a hmotnost hemoglobinu v erytrocytech. Počet erytrocytů je ve fyziologickém rozmezí. Fyziologický počet erytrocytů v kombinaci se sníženým objemem erytrocytů poukazuje na anémii vyvolanou nedostatkem železa.

- Biochemie – ukazatele metabolismu železa

Tabulka 12 - Výsledky biochemického vyšetření

Měřený parametr	Výsledek	Referenční rozmezí	Jednotka
Železo	< 2	4–19	μmol/l
Transferrin	4,14	1,5–3,3	g/l
Saturace transferrinu	< 1,9	20,0–50,0	%
Ferritin	10	30–233	μg/l
sTfR	60,8	2,6–6,2	μg/l

Biochemické vyšetření ukázalo nízkou koncentraci sérového železa, ferritinu a sníženou saturaci transferrinu. Koncentrace sérového transferrinu a solubilního transferrinového receptoru jsou naopak vysoké.

Mnohonásobné zvýšení koncentrace solubilního transferrinového receptoru a vyšší hladina transferrinu v kombinaci s nízkými hladinami železa, ferritinu a saturace transferrinu vypovídají o nedostatku železa. Jedná se tak opět o sideropenii.

Dalším postupem bylo hledání příčiny. Možnost ztrát železa byla vyšetřením vyloučena. Pacient byl podroben vyšetření resorpční křivky železa, která by odhalila případnou poruchu resorpce prvku.

Resorpční křivka železa

- hodnotí se změna koncentrace železa v séru či plasmě po jeho perorálním podání
- test se provádí až po předchozím vyšetření koncentrace železa, transferrinu a ferritinu

- kontraindikací testu je vysoká koncentrace ferritinu či nízká koncentrace transferrinu
- test se provádí ráno, po 10 hodinách lačnění, fyzickém a psychickém klidu, po vyloučení jakýkoliv přípravků se železem a látek ovlivňujících resorpci
- po odběru nalačno se pacientovi podá během 10 minut elementární železo v rychle rozpustné lékové formě s rychlým uvolněním
- dospělým se podávají tablety, dětem kapky či sirup, podání per os
- chlapci bylo podáno 5 mg železa ve formě kapek – Aktiferrin
- poté následuje odběr po 1 hodině a další po 2 hodinách po podání železa
- resorpce prvku je ovlivněna jeho množstvím v organismu, u zdravého člověka se vstřebává 7–10 % železa, 15–17 % při nedostatku a při rozvinuté anémii se resorpce může zvýšit až na 25 %
- pokud je výsledek alespoň jedné koncentrace železa vyšší než 28 $\mu\text{mol/l}$ považuje se za fyziologický [29].

Tabulka 13 - Výsledek resorpční křivky železa

Čas po podání železa	1 hod	2 hod
Koncentrace železa ($\mu\text{mol/l}$)	30,5	52,5

Jelikož obě změřené koncentrace železa po podání kapek byly vyšší než 28 $\mu\text{mol/l}$, porucha resorpce byla u chlapce vyloučena. Jedinou možnou příčinou deficitu prvku u pacienta je tak nedostatečný příjem ve stravě. Léčba spočívala v suplementaci železa. Již po týdnu léčby bylo patrné zlepšení výsledků červeného krevního oběhu (Tabulka 11).

Tabulka 14 - Porovnání výsledků červeného krevního obrazu po týdnu léčby

Měřený parametr	První měření	Měření po týdnu	Jednotka
Erytrocyty (Ery)	4,5	4,85	.10 ¹² /l
Hemoglobin (Hb)	58	73	g/l
Hematokrit (Hct)	0,221	0,279	
MCV	49,1	58	fl
MCH	12,9	15,1	pg
MCHC	262	263	g/l

Po týdnu léčby suplementací železem se u chlapce zvýšil počet erytrocytů a koncentrace hemoglobinu, které se projevily zvýšením ostatních parametrů červeného krevního obrazu.

5.3 Kazuistika 3

Anamnéza a nynější onemocnění

- muž, 56 let
- více než 20 let léčený pro PCT (porfyrria cutanea tarda) – pozdní kožní porfyrrie s fotosenzitivitou obou rukou
- na kliniku přijat pro nově zjištěný diabetes mellitus (glykémie nalačno 15,3–19,6 mmol/l, glykovaný hemoglobin 82,3 mmol/mol)
- slabost a úbytek hmotnosti (7 kg za 4 měsíce)

Laboratorní vyšetření

- Biochemie – ukazatele metabolismu železa

Tabulka 15 - Výsledky biochemického vyšetření

Měřený parametr	Výsledek	Referenční rozmezí	Jednotka
Železo	38,9	9–34	μmol/l
Transferrin	1,95	2,0–3,6	g/l
Saturace transferrinu	79,8	20,0–50,0	%
Ferritin	928	30–284	μg/l

Z biochemického vyšetření byly zjištěny patologické hodnoty ukazatelů metabolismu železa. Koncentrace železa a ferritinu v séru či plazmě je zvýšená, vysoká je i saturace transferrinu, naopak mírně snižená je koncentrace transferrinu. Všechny tyto parametry v kombinaci s pozdní kožní porfyrrií a nově rozvinutým diabetem ukazují na pravděpodobnost onemocnění pacienta hereditární hemochromatózou, tedy nadměrného hromadění železa v organismu.

- Biochemie – jaterní enzymy

Tabulka 16 - Výsledky biochemického vyšetření

Měřený parametr	Výsledek	Referenční rozmezí	Jednotka
Bilirubin	7	≤ 25	μmol/l
AST	0,93	≤ 0,80	μkat/l
ALT	1,65	≤ 1,00	μkat/l
GGT	2,17	≤ 1,90	μkat/l
ALP	1,6	≤ 2,20	μkat/l

Z biochemického vyšetření byly dále zjištěny zvýšené katalytické koncentrace jaterních enzymů – aspartátaminotransferázy (AST), alaninaminotransferázy (ALT) a gamaglutamyltransferázy (GGT). Zvýšená aktivita enzymů nasvědčuje poškození hepatocytů při akumulaci nadbytečného železa v játrech.

Z tohoto důvodu byl pacientovi odebrán vzorek krve na genetické vyšetření. Vyšetřením byla zjištěna mutace v genu HFE (845G>A), která potvrzuje hereditární hemochromatózu. Hromadění železa v pankreatu způsobilo poškození β-buněk Langerhansových ostrůvků a nutnost léčby inzulinem. Závažnější onemocnění jater (cirhóza, hepatocelulární karcinom) nebylo zobrazovacími metodami prokázáno.

U pacienta byla zahájena léčba pravidelnými venepunkcemi. Zpočátku docházel na odběr 500 ml krve dvakrát měsíčně. Po výrazném zlepšení laboratorních ukazatelů metabolismu železa a normalizaci aktivity jaterních enzymů zahrnovala udržovací léčba odběr 400 ml krve jednou měsíčně. Červený krevní obraz vykazoval normální hodnoty i přes četné venepunkce (Tabulka 14).

Hladina železa a transferrinu se normalizovaly, saturace transferrinu a hladina ferritinu byly mírně pod dolní referenční mezí; to ukazuje, že nadměrná saturace organismu železem byla léčbou odstraněna (Tabulka 15).

- Hematologie – červený krevní obraz

Tabulka 17 - Výsledky červeného krevního obrazu po opakovaných venepunkcích

Měřený parametr	Výsledek	Referenční rozmezí	Jednotka
Erytrocyty (Ery)	4,3	4,50–5,30	.10 ¹² /l
Hemoglobin (Hb)	143	135–175	g/l
Hematokrit (Hct)	0,418	0,400–0,500	
MCV	97	82–98	fl

- Biochemie – ukazatele metabolismu železa

Tabulka 18 - Výsledky ukazatelů metabolismu železa

Měřený parametr	Výsledek	Referenční rozmezí	Jednotka
Železo	9,8	9–34	μmol/l
Transferrin	2,55	2,0–3,6	g/l
Saturace transferrinu	15,0	20,0–50,0	%
Ferritin	18	30–284	μg/l

6 DISKUZE

Vyšetření červeného krevního obrazu a biochemických ukazatelů metabolismu železa patří ke standardním vyšetřením klinických hematologických a biochemických laboratoří. Laboratoře ÚKBH Fakultní nemocnice Plzeň jsou velkým pracovištěm vybaveným nejmodernějšími automatickými analyzátory splňujícími požadavky standardizace a automatizace.

Vyšetření krevního obrazu včetně zhotovení, obarvení a vyhodnocení krevního nátěru ve FN Plzeň probíhá na automatické lince Beckman Coulter. Rozdíl lze nalézt ve středních a malých laboratořích, kde proces vyšetření není plně automatizován. Taková analýza je časově náročnější na obsluhu. V některých malých laboratořích chybí analyzátory na zhotovení a vyhodnocení krevních nátěrů. Nátěry se zhotovují a barví manuálně a následně se hodnotí pod mikroskopem. Nevýhodou je opět časová náročnost a vyšší riziko chyb. Úplná automatizace v menších laboratořích je finančně nevýhodná. Důvodem je nižší počet vyšetření oproti velkým laboratořím [29].

Biochemické vyšetření laboratorních ukazatelů metabolismu železa ve FN Plzeň probíhá na automatickém analytickém systému Cobas 8 000 firmy Roche Diagnostic, který je přímo určený pro velké laboratoře. Ve středních a malých laboratořích by se nákup a provoz analyzátoru opět nevyplatil z důvodu nízkého počtu vzorků. Ovšem ze zdroje [38] lze zjistit, že firma Roche nabízí modely analytických systémů Cobas i pro střední a malé laboratoře.

Koncentraci železa v séru lze stanovit, kromě použité využívanější spektrofotometrie, též metodou atomové absorpční spektroskopie (AAS), jak uvádí zdroj [46]. Nevýhodou AAS oproti spektrofotometrii je časová náročnost a nemožnost automatizace metody, která vyžaduje obsluhu kvalifikovaným personálem.

Další nevýhodou je potřeba speciálního přístrojového vybavení a nutnost vyloučit i minimální hemolýzu vzorku krve – železo z uvolněného hemoglobinu významně zvyšuje výsledek. [46].

Výsledky práce zahrnují kazuistiky pacientů s poruchami metabolismu železa. U pacienta v kazuistice 1 byla porucha objevena náhodně bez předchozího podezření. Muž byl do nemocnice přijat po úrazu a ze standardního vyšetření krevního obrazu byly zjištěny snížené hodnoty počtu erytrocytů, hematokritu, hemoglobinu a parametrů s ním souvisejících MCV, MCH, MCHC (Tabulka 10). Fyziologický nebo mírně snížený počet erytrocytů s nízkým MCV je charakteristický pro sideropenickou anémii.

Biochemickým vyšetřením (Tabulka 11) byly zjištěny nízké hladiny ukazatelů metabolismu železa kromě koncentrace solubilního transferinového receptoru, jehož hladina byla proti fyziologickému rozmezí vysoká. Biochemickými výsledky tak byla potvrzena anémie z nedostatku železa. Následovalo zjišťování příčiny nedostatku železa a léčba.

Pacient z kazuistiky 2 je malý chlapec (3 roky). Podezření na anémii vzniklo při preventivní prohlídce. U chlapce se objevily typické příznaky – bledost kůže a sliznic, únava. Z hematologického vyšetření (Tabulka 12) vplynuly nízké hladiny všech parametrů červeného krevního obrazu kromě počtu erytrocytů. Biochemické vyšetření (Tabulka 13) ukázalo mnohonásobné zvýšení koncentrace solubilního transferinového, vyšší hladinu transferrinu a nízké hodnoty koncentrace železa, ferritinu a saturace transferrinu. Sideropenie tak byla potvrzena.

Jelikož u chlapce byla vyšetřením vyloučena možnost ztrát železa, byl podroben testu na poruchu resorpce. Z výsledků vyšetření resorpční křivky železa (Tabulka 14) byla porucha resorpce vyloučena. Poslední možnou příčinou byl tedy

nedostatečný příjem prvku. Léčba probíhala suplementací železa. Tabulka 14 s porovnáním výsledků červeného krevního obrazu před zahájením léčby a po týdnu suplementace ukazuje její úspěšnost.

Zdroj [47] uvádí, že dle Světové zdravotnické organizace (WHO) k roku 2008 trpí anémií 1,62 miliardy obyvatel, tedy jedna čtvrtina populace. Méně často postihuje muže, častěji ženy a nejčastěji malé děti (47,4 %). Zemí s největší prevalencí anémie je Afrika. Nejčastější formou je anémie z nedostatku železa [47].

Pacient z kazuistiky 3 byl přes 20 let léčený s pozdní kožní porfyrií. Nově se objevily problémy s úbytkem váhy, celkovou slabostí a také byl u něho diagnostikován diabetes. Z biochemického vyšetření byly zjištěny patologicky zvýšené hladiny ukazatelů metabolismu železa (Tabulka 17) a také katalytické koncentrace některých jaterních enzymů (AST, ALT, GGT) uvedených v Tabulce 18.

Z vyšetření je patrné, že se jedná o hromadění železa v organismu, proto byl vzorek krve pacienta odeslán na genetické vyšetření, které potvrdilo mutaci v genu HFE – hereditární hemochromatózu. Ukládání železa v játrech způsobilo zatím mírné poškození, jehož důsledkem bylo zvýšení aktivity enzymů. Diabetes mellitus byl zapříčiněn hromaděním železa a poškozením buněk pankreatu. U pacienta byla zahájena léčba venepunkcemi. Hladiny ukazatelů metabolismu se normalizovaly (Tabulka 19) a parametry červeného krevního obrazu i přes četné venepunkce splňovaly fyziologické rozmezí (Tabulka 18).

V březnovém vydání (2019) časopisu *Clinical Laboratory International* [48] autorka uvádí, že největší výskyt mutace v genu HFE způsobující hereditární hemochromatózu je v populaci Evropy. Skutečnost, že jeden z osmi lidí je nositelem této mutace, označuje hemochromatózu jako nejčastější dědičnou poruchu metabolismu evropské populace. Otázkou je zavedení populačního genetického screeningu, který se zatím neprovádí v žádných zemích.

7 ZÁVĚR

V teoretické části bakalářské práce jsem se snažila podat ucelený přehled o chemických, fyzikálních a především biologických vlastnostech a funkcích železa. Charakterizovala jsem metabolismus a regulaci železa v organismu, včetně onemocnění způsobených poruchami metabolismu prvku.

Cílem bakalářské práce bylo vyhodnocení vybraných kazuistik pacientů s poruchou metabolismu železa. V metodice tak byly popsány postupy laboratorních vyšetření červeného krevního obrazu a biochemických ukazatelů metabolismu železa potřebné pro diagnostiku poruch.

Ve výsledcích jsou uvedeny tři kazuistiky pacientů s poruchou metabolismu železa, anamnéza a zjištěné hodnoty laboratorních vyšetření, na jejichž základě jsou vyhodnoceny. Dvě kazuistiky zahrnují poruchy způsobené nedostatkem železa a jedno onemocnění z nadměrné kumulace prvku v organismu.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- AAS – atomová absorpční spektrofotometrie
- ALAS – syntáza delta-aminolevulové kyseliny
- ALP – alkalická fosfatáza
- ALT – alaninaminotransferáza
- AST – aspartátaminotransferáza
- CDT – carbohydrate deficient transferrin (bez sacharidový transferrin)
- DMT1 – divalent metal transporter 1 (transportér kovů)
- Ery – erytrocyty
- GGT – gama-glutamyltransferáza
- GIT – gastrointestinální trakt
- Hb – hemoglobin
- HCP – heme carrier protein (protein podílející se na resorpci hemu)
- Hct – hematokrit
- HFE – gen regulující železo
- HIF – hypoxia inducible factor (hypoxií indukovaný faktor)
- IRE – iron regulatory element (úseky regulované železem)
- IRP – iron responsive proteins (proteiny odpovídající na železo)
- K₃EDTA – tri-draselná sůl kyseliny etylen-diamin-tetraoctové
- KO – krevní obraz
- LIP – labilní intracelulární pool
- MCV – střední objem erytrocytu
- MCH – hmotnost hemoglobinu v erytrocytu
- MCHC – koncentrace hemoglobinu erytrocytu
- NTBI – non-transferrin-bound serum iron (sérové železo nenavázané v transferrinu)
- PCT – porphyria cutanea tarda (pozdí kožní porfyrie)
- RBC – red blood cells (červené krvinky)
- RES – retikuloendotelový systém

SLS – sodium lauryl sulfát

SOP – standardní operační postup

sTfR – solubilní transferrinový receptor

TfR1 – transferrinový receptor 1

TfR2 – transferrinový receptor 2

ÚKBH FN Plzeň – Ústav klinické biochemie a hematologie Fakultní nemocnice Plzeň

WHO – World Health Organization (Světová zdravotnická organizace)

ZIP14 – zinc transporter (transportér zinku)

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] NICHOLLS, D. *The Chemistry of Iron, Cobalt and Nickel: Comprehensive inorganic chemistry*. Oxford, Eng.: Pergamon, 1973. ISBN 0080188745.
- [2] VACÍK, Jiří. *Přehled středoškolské chemie*. 4. vyd., v SPN-pedagogickém nakl. 2. vyd. Praha: SPN-pedagogické nakladatelství, 1999. ISBN 80-723-5108-7.
- [3] MATOUŠ, Bohuslav et al. *Základy lékařské chemie a biochemie*. Praha: Galén, 2010, s. 242-255. ISBN 978-80-7262-702-8.
- [4] ČERMÁK, Jaroslav. Léčba anémie a nedostatku železa z pohledu hematologa. *Kardiol Rev Int Med* [online]. 2014, 16(5), 359-365 [cit. 2019-02-25]. ISSN 2336-2898. Dostupné z: http://www.kardiologickarevue.cz/kardiologicka-revue-clanek/lecba-anemie-a-nedostatku-zeleza-z-pohledu-hematologa-50142?confirm_rules=1.
- [5] TOUŽÍN, Jiří. *Stručný přehled chemie proků*. Brno: Tribun EU, 2008. Knihovnicka.cz. ISBN 978-80-7399-527-0.
- [6] NOVÁK, Pavel. Koroze kovů., Kolektiv autorů. *Konzervování a restaurování kovů: Ochrana předmětů kulturního dědictví z kovů a jejich slitin*. Brno: Technické muzeum v Brně-Metodické centrum konzervace, 2011, s. 136-198. ISBN 978-80-86413-70-9.
- [7] GANZ, Tomas, *Systemic Iron Homeostasis*, *Physiological Reviews*, ročník 93(4), 2013, 1721-41 s., ISSN 1522-1210.
- [8] SEDLÁČKOVÁ, Terezie a Jaroslav RACEK. Metabolismus železa a jeho regulace. *Klinická biochemie a metababolismus*. 2009, roč. 17, č. 1, s. 17-23.
- [9] KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. Překlad 4. vydání. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0.
- [10] DOBROTA, Dušan a kol., *Lekárska biochémia*, ed. 2., Vydavateľstvo OSVETA, 2016, ISBN 978-80-8063-444-5.

- [11] RAJDL, Daniel, Jaroslav RACEK, Richard PRŮŠA a Milan DASTYCH. *E-Klinická biochemie* [online]. 2014 [cit. 2018-11-28]. Dostupné z: <https://elius.lfp.cuni.cz/ebio/KlinickaBiochemieCZ.pdf>.
- [12] LEDVINA, Miroslav, Alena STOKLASOVÁ a Jaroslav CERMAN. *Biochemie pro studující medicíny*. Vyd. 2. V Praze: Karolinum, 2009. ISBN 978-802-4614-144.
- [13] RACEK, Jaroslav. *Klinická biochemie. 2., přeprac. vyd.* Praha: Galén, 2006. ISBN 80-726-2324-9.
- [14] JABOR, Antonín. Ferritin v séru. *Prevedig* [online]. [cit. 2019-03-06]. Dostupné z: https://www.prevedig.cz/pict/fotogalerie/Odborne_texty/Feritin%20v%20s%C3%A9ru.pdf.
- [15] KOZUHIRO, Iwai. Regulation of cellular iron metabolism: Iron-dependent degradation of IRP by SCFFBXL5 ubiquitin ligase. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 2019, **133**, 64-68 [cit. 2019-02-25]. ISSN 0891-5849. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.011>.
- [16] LEITNER, Dominique F. a James R. CONNOR. Functional roles of transferrin in the brain. *Biochimica et Biophysica Acta* [online]. 2012, **1820**(3), 393-402 [cit. 2019-02-25]. ISSN 0304-4165. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.10.016>.
- [17] VOKURKA, M. a J. HUGO. Transferinový receptor. *Velký lékařský slovník Online* [online]. Maxdorf [cit. 2019-03-06]. Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz/lexikon-pojem/transferinovy-receptor-zkr-tfr>.
- [18] BARTOŇKOVÁ, N., J. PRODĚLALOVÁ a M. FALDYNA. „Multifunkční protein“ laktoferin a jeho potenciál jako doplňku stravy pro prasata. *Veterinářství*. 2015, **65**(3), 195-197. ISSN 0506-8231..
- [19] OIKONEN, Vesa. Transferrin and transferrin receptor. *Turku pet centre* [online]. UNIVERSITY OF TURKU, 2017 [cit. 2019-03-06]. Dostupné z: http://www.turkupetcentre.net/petanalysis/target_transferrin.html.

- [20] RACEK, Jaroslav. *Vitamíny a stopové prvky* [online]. [cit. 2019-05-08]. Dostupné z: <https://www.ceva-edu.cz>.
- [21] NOVOTNÝ, Jan. Sideropenická anémie. *Medicína pro praxi*. 2007, (4 (11)), 390-394. ISSN 1803-5310.
- [22] ŽOUREK, Michal, Silvie LACIGOVÁ, Michal KRČMA, Jiří MUDRA, Zdeněk JANKOVEC a Zdeněk RUŠAVÝ. Přehled metabolismu železa s ohledem na klinickou praxi. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie a výživa* [online]. 2007, **10**(2), 100-105 [cit. 2019-02-25]. Dostupné z: <https://docplayer.cz/13437077-Prehled-metabolismu-zeleza-s-ohledem-na-klinickou-praxi.html>.
- [23] MUCKENTHALER, Martina U., Stefano RIVELLA, Mathias W. HENTZE a Bruno GALY. A Red Carpet for Iron Metabolism. *Cell*[online]. 2017, **168**(3), 344-361 [cit. 2019-02-25]. ISSN 0092-8674. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.034>.
- [24] KOHGO, Yutaka, Katsuya IKUTA a Takaaki OHTAKE. Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. *International Journal of Hematology* [online]. 2008, **88**(1), 7-15 [cit. 2019-02-25]. ISSN 1865-3774. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12185-008-0120-5>.
- [25] PENKA, Miroslav a Alena BULIKOVÁ. *Neonkologická hematologie. 2., dopl. a zcela přeprac. vyd.* Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2299-3.
- [26] HOUDA, J., D. POSPÍŠILOVÁ a M. HORVÁTHOVÁ. Úloha hepcidinu v regulaci metabolismu železa. *Čes-slov Pediat* [online]. 2014, **69**(5), 301-312 [cit. 2019-02-28]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/282867687_Uloha_hepcidinu_v_regulaci_metabolismu_zeleza.
- [27] BĚLOHLÁVKOVÁ, Petra. Postavení hepcidinu v diagnostice a léčbě anémií. *Med. praxi* [online]. 2011, **8**(3), 127-129 [cit. 2019-03-01]. ISSN 1803-5310. Dostupné z: https://www.medicinapropraxi.cz/artkey/med-201103-0007_Postaveni_hepcidinu_v_diagnostice_a_lecbe_anemii.php.

- [28] MUNOZ, M., J. A. GARCIA-ERCE a A. F. REMACHA. Disorders of iron metabolism. Part II: iron deficiency and iron overload. *Journal of Clinical Pathology* [online]. 2011, **64**(4), 287-296 [cit. 2019-03-03]. DOI: 10.1136/jcp.2010.086991. ISSN 0021-9746. Dostupné z: <http://jcp.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jcp.2010.086991>.
- [29] Ústav klinické biochemie a hematologie Fakultní nemocnice Plzeň [online]. [cit. 2019-04-25]. Dostupné z: <https://ukbh.fnplzen.cz/>.
- [30] VOKURKA, M. a J. HUGO. Sideroblast. *Velký lékařský slovník On-line* [online]. Maxdorf [cit. 2019-03-06]. Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz/pojem/sideroblast>.
- [31] KAFKOVÁ, A. Anémie-Diagnostika a léčba. *Via practica* [online]. 2005, **2**(3), 141-144 [cit. 2019-03-03]. ISSN 1339-424X. Dostupné z: <http://www.solen.sk/pdf/Kafkova.pdf>.
- [32] STEINEROVÁ, Kateřina. Nejběžnější typy anémií – diagnostika, klasifikace a léčba. *Med. praxi* [online]. 2018, **15**(2), 80-83 [cit. 2019-03-03]. ISSN 1803-5310. Dostupné z: https://www.medicinapropraxi.cz/artkey/med-201802-0005_Nejbeznejsi_typy_anemii_8211_diagnostika_klasifikace_a_lecba.php.
- [33] HORÁK, Jiří. *Hemochromatóza*. 1. Praha: Grada, 2010. ISBN 978-80-247-3287-9.
- [34] Symptoms. In: *Haemochromatosis UK* [online]. [cit. 2019-03-25]. Dostupné z: <http://haemochromatosis.org.uk/haemochromatosis/symptoms/>.
- [35] HORÁK, Jiří a Milan JIRSA. Genetická hemochromatóza. HŮLEK, Petr a Petr URBÁNEK. *Hepatologie*. 3. Grada publishing, 2018, s. 391-392. ISBN 9788024729398.
- [36] LAJOŠ, Peter. Standardní operační postup: Odběr žilní krve. 2015.
- [37] *Beckman Coulter Česká republika* [online]. [cit. 2019-04-25]. Dostupné z: <http://www.beckmancoulter.cz/>.
- [38] HOFFMANN, F. *Roche Diagnostics Česká republika* [online]. ©1996-2018 [cit. 2019-04-25]. Dostupné z: <http://www.roche-diagnostics.cz/>.

- [39] DOSTÁLOVÁ, Radka. Standardní operační postup: Provedení krevního nátěru. 2011.
- [40] DOSTÁLOVÁ, Radka. Standardní operační postup: Barvení krevního nátěru. 2011.
- [41] ROCHE DIAGNOSTICS. Návod k použití: Železo. 2016.
- [42] ROCHE DIAGNOSTICS. Návod k použití: Transferrin. Verze 2. 2017.
- [43] ROCHE DIAGNOSTICS. Návod k použití: Tina-quant rozpustný transferinový receptor. 2018.
- [44] ROCHE DIAGNOSTICS. Návod k použití: Tina-quant Ferritin Gen.4. 2016.
- [45] RACEK, Jaroslav. *Automatizace v klinické biochemii*. Fakultní nemocnice Plzeň.
- [46] SCHNEIDERKA, Petr. *Atomová absorpční spektrofotometrie*. Olomouc, 2013.
- [47] BRANČÍKOVÁ, Dagmar. Jak ovlivnit anémii stravováním?. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2012, **14**(5), 231–234 [cit. 2019-05-02]. ISSN 1803-5256. Dostupné z: <http://solen.cz/pdfs/int/2012/05/13.pdf>.
- [48] SLEIGH, Alison. Hemochromatosis: more common than first thought. *Clinical Laboratory International*[online]. 2019, **43**(3), 3 [cit. 2019-05-03]. Dostupné z: <https://www.clinlabint.com/digital-editions/3d-issues/cli-feb-march-2019/>.

10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Rozdělení železa.....	13
Obrázek 2 – Metabolismus železa	20
Obrázek 3 – Metabolismus železa v hepatocytu	25
Obrázek 4 – Mechanismus účinku hepcidinu.....	27
Obrázek 5 – Orgány postihující přetížení železem	34
Obrázek 6 – Zkumavka Vacuette zelená.....	40
Obrázek 7 – Zkumavka Vacuette červená.....	40
Obrázek 8 – Zkumavka Vacuette fialová	41
Obrázek 9 – Hematologická linka.....	44
Obrázek 10 – Krevní nátěr, nízká koncentrace hemoglobinu.....	48
Obrázek 11 – Krevní nátěr, normální koncentrace hemoglobinu	49
Obrázek 12 – Analytický systém Cobas 8 000.....	50
Obrázek 13 – Princip stanovení železa.....	51

11 SEZNAMU POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1 – Sérové železo	28
Tabulka 2 – Transferin	29
Tabulka 3 – Hlavní příčiny nedostatku železa	31
Tabulka 4 – Diagnostické charakteristiky různých typů hemochromatózy	36
Tabulka 5 – Příčiny sekundární akumulace železa	37
Tabulka 6 – Výsledky červeného krevního obrazu	55
Tabulka 7 – Výsledky biochemického vyšetření.....	56
Tabulka 8 – Výsledky červeného krevního obrazu	57
Tabulka 9 – Výsledky biochemického vyšetření.....	58
Tabulka 10 – Výsledek resorpční křivky železa.....	59
Tabulka 11 – Porovnání výsledků červeného KO po týdnu léčby	60
Tabulka 12 – Výsledky biochemického vyšetření.....	61
Tabulka 13 – Výsledky biochemického vyšetření.....	62
Tabulka 14 – Výsledky červeného KO po opakovaných venepunkcích	63
Tabulka 15 – Výsledky ukazatelů metabolismu železa	63