

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra biologických a lékařských věd

**Význam molekulární biologie v laboratorní diagnostice
vrozené hemochromatózy**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: PharmDr. Martin Beránek, Ph.D.
PharmDr. Hana Klusoňová, Ph.D.

Hradec Králové 2007

Jaroslava Hegerová

Děkuji PharmDr. Martinu Beránkovi, Ph.D. z Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice v Hradci Králové za odborné vedení bakalářské práce, za neocenitelné rady, podporu a čas, který mi věnoval.

Děkuji také PharmDr. Evě Malířové, vedoucí úseku Oddělení nukleární medicíny Fakultní nemocnice v Hradci Králové, za ochotnou pomoc při shromažďování dat pacientů.

Mé poděkování patří i PharmDr. Lence Plíškové, vedoucí úseku molekulární biologie Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice v Hradci Králové, za možnost vypracovat bakalářskou práci na tomto pracovišti.

Seznam použitých zkratk

ALT	alaninaminotransferáza
AST	aspartátaminotransferáza
ATP	alkalická fosfatáza
Dyct b	duodenal cytochrome b
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DMT 1 – 1	divalent metal transporter
FRET	fluorescence resonance energy transfer
GMT	γ glutamyltransferáza
HFE	hemochromatóza
HH	hereditární hemochromatóza
Ireg 1	iron – regulated transporter
LD	laktátdehydrogenáza
PCR	polymerázová řetězová reakce
RES	retikuloendoteliální systém
RFLP	restriction fragment length polymorphism (analýza restrikčních fragmentů)
TfR	receptor pro transferin

OBSAH

I.	Úvod	3
II.	Cíle	4
III.	Teoretická část	5
	III.1. Metabolismus železa – osud železa v organismu.....	5
	III.2. Hemochromatóza – dědičné onemocnění, mutace genu.....	6
	III.2.1. Definice a typy hemochromatózy.....	12
	III.2.2. Projevy onemocnění.....	13
	III.2.3. Genetické pozadí choroby.....	15
	III.2.4. Mutace C282Y a H63D výskyt, frekvence klinická manifestace.....	16
IV.	Experimentální část	21
	IV.1. Použitý biologický materiál	21
	IV.2. Principy biochemických vyšetřovacích metod	22
	IV.3. Molekulárně biologické vyšetření hemochromatózy.....	27
	(PCR/RFLP)	
	IV.4. Princip real-time PCR s hybridizačními FRET sondami.....	30
	IV.5. Použité statistické metody.....	32
V.	Výsledky	33
	V.1. Optimalizace experimentálních podmínek pro real-time PCR.....	33
	V.2. Výsledky vyšetření probandů pomocí real-time PCR.....	47
	V.3. Výsledky biochemických analýz probandů.....	49
VI.	Diskuse	50
VI.	Závěry bakalářské práce	56
VII.	Literatura	57

I. Úvod

Úsek molekulární biologie ÚKBD FN HK, na kterém pracuji, se zabývá, mimo jiných vyšetření lidského genomu i vyšetřením hereditární hemochromatózy.

Hereditární hemochromatóza je autosomálně recesivní onemocnění, které je způsobeno především mutacemi v genu HFE. Je charakterizována nadměrnou absorpcí železa ze střeva a jeho ukládáním v parenchymových orgánech, především pak v játrech, pankreatu, srdci, tenkém střevě a v endokrinních žlázách (1).

Existuje reálná hypotéza, že hemochromatóza vznikla u starých Keltů (tj. přibližně před 60 ti generacemi). S keltskými výboji a s migrací jejich potomků se pak šířila dál. Tuto hypotézu podporuje zeměpisné rozšíření nemoci. Vyskytuje se především u obyvatel Evropy a USA. V Asii a na jižní polokouli s výjimkou Austrálie se naopak tato nemoc prakticky nevyskytuje (1,2,3).

Zvýšená absorpce železa podmiňovala snazší adaptaci jedince životním podmínkám v období, kdy lidé neměli dostatek masa a hrozila jim chudokrevnost. V rostlinné potravě je železa méně a navíc se mnohem hůře vstřebává. Mutace, která umožňovala využít až dvojnásobek železa z potravy byla za těchto podmínek pro svého nositele nespornou selekční výhodou. V současnosti se však stala závažným zdravotním problémem. Značné množství železa uložené v organizmu může vést k cirhóze jater, hepatocelulárnímu karcinomu, srdečnímu selhání, diabetu, artritidě i k předčasnému úmrtí. Symptomy nemoci se projevují v období mezi 40. a 60. rokem života, po celoživotní bezpříznakové kumulaci železa v tkáních.

Z tohoto pohledu se jako klinicky významná jeví snaha o časnou laboratorní diagnostiku hereditární hemochromatózy a následnou celoživotní lékařskou péči o takto postižené osoby.

II. Cíle práce

- 1) Zavést vyšetřovací metodu založenou na real-time PCR pro zefektivnění laboratorní diagnostiky hereditární hemochromatózy.
- 2) Vyhodnotit přínos fenotypizačních biochemických metod a metod molekulárně biologických pro časnou diagnostiku hereditární hemochromatózy.
- 3) Porovnat diagnostickou hodnotu nejčastěji používaných biochemických metod pro diagnostiku hereditární hemochromatózy v těchto souborech probandů:
 - a) homozygotů pro HH
 - b) heterozygotů pro mutaci C282Y
 - c) heterozygotů pro mutaci H63D

III. Teoretická část

III.1. Metabolismus železa

Železo je esenciálním prvkem, nutným pro funkci všech tkání. Hraje klíčovou roli v oxidativním metabolismu buňky, stejně jako při tvorbě DNA (železo je součástí nehemového proteinu ribonukleotid reduktázy nezbytné pro syntézu DNA) a jeho nedostatek proto může mít pro buňku závažné důsledky. Na druhé straně tzv. volné železo v nízkomolekulární formě, jehož obsah stoupá v buňce při přetížení železem, může působit jako katalyzátor při tvorbě sloučenin obsahujících aktivní kyslík, zejména ve formě volných hydroxylových radikálů. Tyto látky mohou vést cestou peroxidativního štěpení lipidů k poškození řady buněčných struktur a zániku poškozené buňky.

Železo je také součástí pro buňku životně důležitých enzymů, např. oxidázy, katalázy, peroxidázy, akonitázy, cytochromů a syntázy oxidu dusnatého. Jednou z hlavních funkcí železa je účast při transportu kyslíku (jako součást hemu) (4).

Bilance železa v organismu

U dospělého člověka je 35–45 mg železa na kg tělesné váhy. Ženy mají v důsledku pravidelné ztráty krve menstruací a menšího objemu přijímané stravy zásoby železa nižší. 60 až 70 % celkového množství železa je přítomno v erytrocytech jako součást hemoglobinu, 10 % v myoglobinu, cytochromu a v dalších enzýmech obsahujících železo.

Zbývajících 20–30 % tvoří tzv. zásobní železo, tj. feritin a hemosiderin v hepatocytech a makrofázích. Množství železa zůstává během života konstantní, je udržováno rovnováhou mezi příjmem a ztrátami železa. Běžnou potravou přijímá člověk denně 10–20 mg železa, do vnitřního prostředí se dostane pouze 5–10 % přijatého množství. Hladina plazmatického železa je u muže 14,3–26,0 $\mu\text{mol} / \text{l}$ a u ženy 10,7–21,5 $\mu\text{mol/l}$. Průměrné denní ztráty u mužů jsou 0,5–1 mg a 1–2 mg u žen.

U člověka neexistuje fyziologický mechanismus exkrece železa. Jakmile se železo dostává do cirkulace, není možné je ve větší míře vyloučit. Minimální množství se ztrácí deskamací kůže, močí a žlučí. U zdravých jedinců jsou příjem i ztráty zhruba vyrovnané (5).

Příjem železa

V potravě se železo vyskytuje ve formě anorganické (nehemové), které tvoří menší část přijímaného železa, a jako železo obsažené v hemu. Příjem železa z potravy probíhá v duodenu a proximálním jejunu. Vstřebávání železa ovlivňuje kyselá žaludeční šťáva, kde kyselina chlorovodíková a pepsin uvolňují železo z vazby na proteiny a z komplexů.

Absorpce zahrnuje: a) příjem železa z lumen střeva apikální membránou enterocytů

b) průchod cytoplazmou enterocytů
případně uložení ve formě feritinu

c) uvolnění do krevního oběhu přes bazolaterální membránu

Způsob absorpce hemového a nehemového železa se liší. Většina anorganického železa se vyskytuje ve formě Fe^{3+} kationtů. Membránový transportní systém pro železo však upřednostňuje Fe^{2+} kationty, proto k jeho průchodu přes membránu je třeba redukce Fe^{3+} kationtů na Fe^{2+} kationty. Redukci zajišťuje membránová reductáza Dcyt b (duodenal cytochrome b). Vlastním transportérem je pak membránový protein DMT 1-1 (divalent metal transportér), který se nachází na kartáčovém lemu enterocytů a v endosomech somatických buněk. V cytozolu enterocytů tvoří železo komplexy s nízkomolekulárními chelátory. Toto železo je označováno jako labilní intracelulární pool, tj. pohotovostní zásoba železa. Tvoří cca 0,2–0,3 % z celkového železa. Tato část železa je rychle použitelná pro potřeby buňky a má cytotoxický potenciál (6,7).

Přechod Fe^{2+} kationtů přes bazolaterální membránu umožňuje membránový protein Ireg 1 (iron-regulated transporter). Před vazbou železa na transferin musí dojít k jeho oxidaci na Fe^{3+} kationty, a to prostřednictvím proteinu hefestinu, tj. sérového proteinu s feroxidázovou aktivitou – jde o homolog ceruloplazminu. Transferin může vázat pouze Fe^{3+} kationty. Železo, které není přeneseno, se skladuje ve formě feritinu (8).

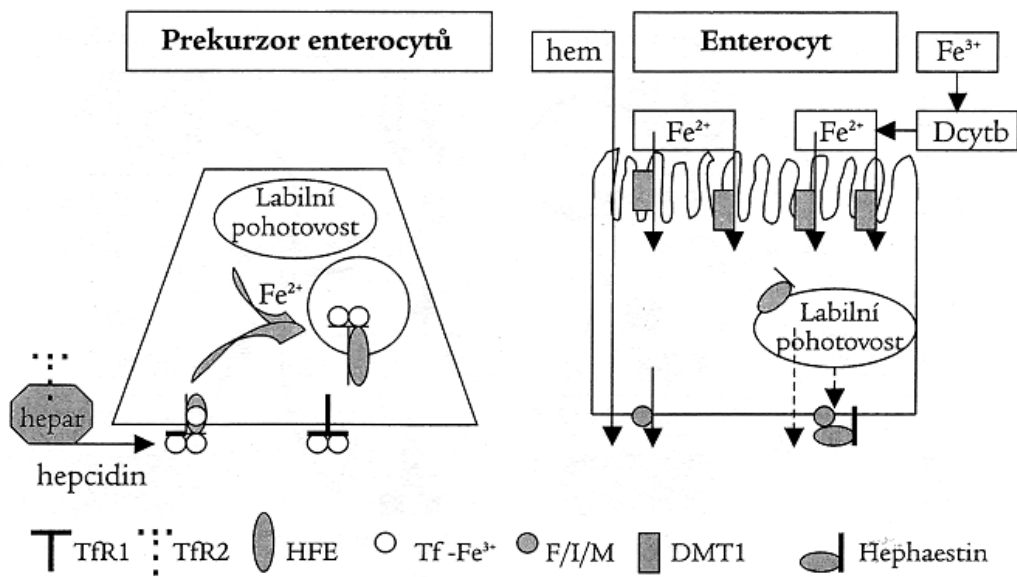
Absorpce hemového železa je efektivnější než absorpce anorganického železa. Proteolytickým štěpením se z hemoglobinu a myoglobinu uvolňuje hem, který jako metaloporfyrin vstupuje do enterocytů, kde je štěpen hemoxygenázou a uvolňuje se železo. To se ukládá v buňce, nebo je uvolněno do oběhu stejnou cestou jako anorganické železo (9).

Transport a příjem železa buňkou

Transport železa z enterocytů k ostatním buňkám zprostředkovává specifický protein, transferin. Transferin je jednořetězcový sérový glykoprotein ($M_r = 80\,000$) s dvěma vazebnými místy pro Fe^{3+} kationty. Hlavním místem syntézy transferinu jsou játra. Receptor pro transferin (TfR) na buněčné membráně umožňuje příjem železa do buňky, regulovaný její momentální potřebou (10).

Existují dva typy transferinového receptoru : TfR 1 a TfR 2, oba do značné míry homologní. TfR 1 se nachází na membránách všech buněk mimo erytrocytů (nejvíce pak na membránách buněk tvořících hemoglobin, tj. erytroblastů). TfR 2 je exprimován hlavně v játrech. Aby nedocházelo k nadměrnému příjmu železa, je syntéza TfR 1 regulována posttranskripčně hladinou železa. Tato regulace u TfR 2 chybí, jeho úloha je pravděpodobně především regulační. TfR 2 má výrazně nižší afinitu k transferinu než TfR 1. TfR může najednou vázat 2 molekuly transferinu, do buňky se tak mohou přes jeden receptor dostat 4 atomy železa (11).

Komplex Tf-Fe-TfR se do buňky dostává endocytózou. Činností ATP dependentní protonové pumpy se sníží pH v endosomu, dochází ke konformačním změnám v komplexu Tf-Fe-TfR a k uvolnění železa. Komplex apo Tf-TfR se vrací zpět na povrch buňky, kde disociuje a obě složky mohou být znovu použity (12). Resorpci hemového a nehemového železa schematicky znázorňuje obrázek 1.



Obrázek 1. Resorpce Fe^{2+} kationtů, Fe^{3+} kationtů a hemu enterocyty

Dcytb – duodenální cytochrom b, F/ I/ M – Ferroportin 1 / Ireg 1 MTP 1,
DMT 1 – přenašeč železa přes apikální membránu, TfR 1 – transferinový
receptor1, Tf – Fe^{3+} - komplex transferinu a trojmocného železa

Skladování a recyklace železa

Hlavním místem skladování železa jsou játra (hepatocyty) a retikuloendoteliální systém (RES). Železo se váže na protein feritin. Feritin je heteropolymér tvořený 24 podjednotkami ($M_r = 474\,000$) dvou typů: H a L. Podjednotka H obsahuje feroxidázové centrum, které váže a oxiduje Fe^{2+} . Funkcí L podjednotky je stabilizace proteinu.

Většina feritinu se vyskytuje v cytoplazmě, malá část v séru. Sérový feritin je významným ukazatelem zásob železa.

Degradačním produktem feritinu je hemosiderin. Na transferin je navázáno méně než 1% z celkového množství železa, tj. asi 4 mg.

Za 1 den transportuje transferin až 25 mg železa, a to hlavně mezi RES a kostní dřeně, kde je železo využito k syntéze hemoglobinu v prekurzorech erytrocytů (13).

V mitochondriích erytroblastů dochází k zabudování železa do protoporphyrinu v přítomnosti enzymu hemsyntetázy za vzniku hemu a následně hemoglobinu. Staré erytrocyty jsou odbourávány buňkami RES, účinkem hydrolytických enzymů jsou degradovány. Z hemoglobinu se uvolňuje hem, a z něj pomocí hemoxygenázy železo. Železo se váže na transferin a je znovu transportováno do kostní dřeně. Hemoglobin uvolněný při intravaskulární hemolýze (fyziologicky 10–20 %) je v krevní plazmě navázán na haptoglobin a vychytáván játry a buňkami RES. Malá část intravaskulárního hemoglobinu je degradována na hem, ten je vázán na hemopexin a transportován do jater (14).

Regulace střevní absorpce železa

Na regulaci střevní absorpce se podílejí 3 hlavní faktory

- 1) saturace transferinu
- 2) množství zásobního železa
- 3) potřeby erytropoézy

Minoritní podíl na regulaci má momentální obsah železa v potravě a hypoxie. Při nedostatku železa dochází ke zvýšení DMT-1, Ireg 1, a TfR 2, zatímco množství feritinu se snižuje. Opačná situace nastává při nadbytku železa.

Při regulaci střevní absorpce se výrazně uplatňuje HFE gen a jeho produkt HFE protein. HFE protein je tvořen třemi extracelulárními doménami α 1-3. Doména α 3 se nekovalentně váže s β 2-mikroglobulinem, který je nutný k transportu HFE proteinu na povrch buňky. HFE protein tvoří komplex s TfR, kde kompetuje o vazebné místo s transferinem. Transferin nesoucí železo vytěsňuje z komplexu HFE- β 2-mikroglobulin-TfR volný HFE protein. Ten pak zprostředkuje signál o dostatečné saturaci železem, pravděpodobně prostřednictvím hepcidinu (15,18).

Hepcidin byl objeven A. Krausem a Ch. Parkerem při hledání nových bakteriálních peptidů. Jedná se o peptid složený z 20, 22, nebo 25 aminokyselin s antibakteriální a antimykotickou aktivitou, jehož syntéza probíhá výhradně v játrech. Brzy byl prokázán jeho klíčový význam v regulaci metabolismu železa. Příjem železa hepatocyty zprostředkovaný TfR 2 ovlivňuje produkci hepcidinu, který následně moduluje střevní absorpci železa prostřednictvím Ireg 1 (19,20).

Současný pohled na regulaci železa předpokládá, že HFE protein v komplexu s β 2 mikroglobulinem a TfR v buňkách krypt a především v játrech slouží jako senzor hladiny železa v těle. Zvýšená hladina železa se odrazí ve vyšším příjmu železa buňkami krypt a jater, což vede k uvolnění HFE proteinu z vazby na komplex, syntéze hepcidinu a následnému naprogramování enterocytů na příjem menšího množství železa ze střeva. Opačná situace nastává při nedostatku železa.

Příčinou nedostatku železa může být jeho nedostatek v potravě, nebo jeho malabsorpce, eventuelně zvýšené ztráty. Nedostatečný příjem je způsoben nevhodným složením potravy (málo masa, převážně mléčná strava, vegetariánství atd.). Malabsorpce tj. porušená resorpce železa může nastat po operacích GIT, např. po resekci žaludku. Na nadměrných ztrátách železa se podílí náhlé a masivní krvácení, ale i dlouhodobé malé ztráty krve.

Důsledkem nerovnováhy mezi příjmem a ztrátou, respektive spotřebou železa může být sideropenie a sideropenická anemie. Při normálním příjmu železa může sideropenie vzniknout v případě, že množství přijatého železa nestačí krýt zvýšené nároky na jeho potřebu. Příkladem je dospívání a těhotenství. V těhotenství musí přijaté železo krýt i potřeby plodu a placenty. K vyrovnání potřeb je pak nutné dodat organizmu přibližně 6 mg železa za den. Sideropenií v době těhotenství trpí až 90 % žen.

Nedostatek železa se projeví snížením syntézy hemu. Dochází k poklesu tvorby hemoglobinu, myoglobinu a enzymů obsahujících železo. Důsledkem nedostatečného množství nebo využití železa je sideroblastická anemie. Jde o poruchu inkorporace železa do erytroblastů. Známé jsou dvě formy, vrozená a získaná. Obě ve svém důsledku vedou k poruše syntézy hemoglobinu.

III.2. Hemochromatóza – dědičné onemocnění, mutace genu

III.2.1. Definice a typy hemochromatózy

Obecně lze hemochromatózu definovat jako stav, kdy je organismus přetížen železem. Podle stupně přetížení pak lze tento stav rozdělit do tří fází.

- 1) prelatentní – nárůst železa v orgánech bez překročení zásobní kapacity
- 2) latentní - nárůst železa v orgánech s překročením zásobní kapacity bez poškození
- 3) manifestní - s orgánovým poškozením

Ke kumulaci železa v organismu může dojít z různých příčin. Primární hemochromatóza, nebo také hereditární hemochromatóza, je onemocnění s primárně zvýšenou resorpcí železa ve střevě s prokazatelným genetickým pozadím.

Sekundární hemochromatóza (hemosideróza), vzniká sekundárně zvýšenou resorpcí železa a kumulací železa podmíněnou nadměrným parenterálním přívodem železa. Se sekundární hemochromatózou způsobenou sekundárně zvýšenou resorpcí železa se lze setkat u anemií s hyperplázií červené krevní řady a neefektivní erythropoézou. Příkladem je talasemie, sférocytární a nesférocytární hemolytická anemie a myelodysplastický syndrom. K sekundární hemochromatóze vede také nadměrný parenterální přívod železa opakovanými transfúzemi.

Primární hemochromatóza je dědičné autosomálně recesivní onemocnění charakterizované zvýšenou absorpcí železa ve střevě s následným ukládáním nadbytečného železa v parenchymových buňkách tkání a orgánů. Je rozeznáváno několik podtypů hereditární hemochromatózy, HH 1 – HH 5. Nejčastěji se vyskytuje HH 1, způsobená mutacemi v HFE genu. Příčinou vzniku ostatních forem je mutace některých genů, jejichž produkty se uplatňují při metabolismu železa (21).

III.2.2. Projevy onemocnění

V organismu postižených osob je ve zvýšené míře vstřebáváno železo. Vylučování železa je limitováno, takže dochází k jeho pozvolné kumulaci v tkáních a orgánech. Při zvýšené koncentraci železa dochází k překročení kapacity bílkovin, které železo vážou a volné železo může mít negativní účinky, tj. tvorba hydroxylového radikálu z peroxidu vodíku. Volné radikály poškozují nukleové kyseliny a proteiny (22).

Rychlost kumulace železa je individuální. Individuální jsou i projevy onemocnění v závislosti na pohlaví. U žen se vyskytuje hemochromatóza méně často. Tento rozdíl je připisován ztrátám železa během fertilního věku (menstruace, gravidita, porod, laktace). Je to i důvod pozdější manifestace onemocnění u žen.

V latentním stádiu mají postižení normální krevní obraz, nachází se u nich zvýšená koncentrace sérového železa, zvýšená saturace transferinu a zvýšený sérový feritin. Při manifestním poškození pak dochází i ke zvýšení hladiny aminotransferáz, glykémie a doprovodným jevem jsou i některé hormonální abnormality. V játrech nemocných se rozvíjí fibróza a cirhóza, fibrózou může být postižen i pankreas. Onemocnění poškozuje svalovinu i převodní systém srdce, vyvolává osteoporózu a chondrokalcinózu v kloubech. Charakteristické je i zbarvení kůže, tzv. bronzový diabetes a chronická únava. Ušetřeny nezůstávají ani endokrinní orgány. Lze se setkat s hypogonadizmem, poruchami štítné žlázy, nadledvin i příštítných tělísek. Zvýšená koncentrace železa v organismu může být růstovým faktorem pro patogenní bakterie (yerseniové sepse) i plísně (23, 24).

Onemocnění zpravidla manifestuje až po čtyřicátém roku života. Bez odpovídající léčby je konečná fáze této nemoci fatální. Nemocní umírají zpravidla na jaterní selhání, hepatocelulární karcinom, komplikace diabetu nebo kardiomyopatii. Při včasné zahájené léčbě se pacienti dožívají stejného věku jako zdravá populace.

Léčba spočívá v odstraňování nadbytečného železa z organismu. Terapie se provádí: a) opakovanými venepunkcemi, což je doposud nejúčinnější postup užívaný při léčbě hemochromatózy; b) pomocí chelátorů železa – léčba je méně účinná než venepunkce a užívá se u anemických pacientů a doplňkově u pacientů s rozvinutou kardiomyopatií; c) doplňkově lze podávat antioxidanty – vitamín C a tokoferol, které mohou zčásti neutralizovat toxické účinky volného železa.

Velice žádoucí jsou i režimová opatření spočívající v dietním režimu s výrazným omezením alkoholu a potravin s vyšším obsahem železa.

III.2.3. Genetické pozadí choroby

Genetická nebo také hereditární či primární hemochromatóza je vrozená metabolická porucha, která vzniká v důsledku autosomálně recesivní mutace. Jedná se o monogenní (mendelistický) typ dědičnosti. K fenotypovým projevům choroby je nutná přítomnost obou mutovaných alel, tj. homozygotní konstelace.

Počet heterozygotů pro HH, tj. nositelů jedné vadné alely, se v evropské populaci, včetně ČR, odhaduje na 10 %. Odhad počtu homozygotů pro HH je pak 1:300-400. To činí z hereditární hemochromatózy jednu z nejčastějších genetických chorob (25).

HFE gen, jehož produkt má vliv na udržení přiměřených zásob železa v organismu byl popsán v roce 1996. Nachází se na krátkém raménku 6. chromozomu (21). Jedná se o gen z rodiny hlavního histokompatibilního komplexu s vysokou homologií (58%) ke genům I. třídy. Analýzou mutací bylo prokázáno, že gen HFE je skutečně hlavním faktorem podmiňujícím HH (26).

HFE protein tvoří na povrchu buňky střevních krypt komplex s transferinovým receptorem (TfR). Zvýšená exprese divokého (nemutovaného) proteinu HFE na membráně snižuje afinitu TfR k transferinu s navázaným železem. Tím prakticky brání absorpci nadměrného množství železa. Jiná situace nastane, pokud je HFE protein změněn mutací.

Podle statistik je majoritní mutací v bělošské populaci mutace C282Y. Důsledkem záměny guaninu za adenin v pozici 845. nukleotidu je nahrazení aminokyseliny proteinu v 282. pozici proteinového řetězce tyrozinem. Mutace C282Y brání tvorbě disulfidického můstku mezi $\alpha 3$ doménou HFE a $\beta 2$ mikroglobulinem. Mutantní protein je zadržován v Golgiho aparátu, kde dochází k jeho zrychlené degradaci.

Není exprimován na povrch buňky (bez vazby na $\beta 2$ mikroglobulin není transport možný). HFE protein nemůže plnit svoji funkci (26).

Prakticky nejrozšířenější mutací je mutace H63D. Záměna cytozinu za guanin na pozici 187. nukleotidu vede na úrovni proteinu k záměně histidinu za aspartát na pozici 63. aminokyseliny. V případě HFE proteinu vznikajícího přepisem mutované alely H63D dochází normálně k vazbě s $\beta 2$ mikroglobulinem a transportu na membránu. Mutovaný protein však ztrácí schopnost ovlivnit afinitu TfR k transferinu (27).

III.2.4 . Mutace C282Y a H63D, výskyt, frekvence, klinická manifestace

Hereditární hemochromatóza je problémem především bělošské populace. Bylo potvrzeno, že mutace C282Y a H63D, vyskytující se v homozygotní konstelaci, způsobují dědičnou hemochromatózu (28).

Mutace C282Y

Prováděné studie vedly ke zjištění, že majoritní příčinou vzniku choroby je přítomnost mutace C282Y. Tato mutace je rozšířena především v evropské populaci. V Africe, Asii a Jižní Americe je mutace C282Y vzácná.

Rozdíly ve frekvenci této mutace jsou pozorovány i v rámci Evropy. Její výskyt je nejvyšší v severozápadní Evropě, především v Irsku a Velké Británii, kde nejméně jednu kopii mutovaného genu má 10–20 % populace. Oproti tomu ve východní a jižní Evropě je její výskyt nižší, cca 2–4 %.

Další studie prokázali výskyt mutace C282Y v homozygotním stavu u 80–90 % pacientů s hereditární hemochromatózou. Ve Francii byla mutace v homozygotním stavu nalezena u 71 % nemocných s HH, ve Velké Británii u 80–85 % postižených a v Německu a Rakousku u 90 % nemocných. Lépe je na tom jižní Evropa, kde např. v Itálii byla tato mutace v homozygotním stavu nalezena u 61 % nemocných s HH (30,31,32).

V České republice činí výskyt této mutace v heterozygotní formě cca 7%, to znamená, že každý 15 jedinec je přenašečem této mutace. Každý přibližně 850-tý jedinec je pak homozygotem pro mutaci a má tedy zvýšené riziko onemocnět touto chorobou (29).

Problémem je otázka penetrance této mutace. Ne u každého homozygota pro mutaci C282Y se vyvinou symptomy onemocnění. Až u 30 % osob homozygotních pro mutaci C282Y se hereditární hemochromatóza klinicky neprojevuje, jsou u nich patrné pouze mírně zvýšené zásoby železa.

Mutace H63D

Tato mutace má podobnou geografickou distribuci jako mutace C282Y, ale je častější. Vyskytuje se u 15–40 % evropské populace. Je fylogeneticky starší a ovlivňuje vstřebávání železa pravděpodobně podstatně méně než mutace C282Y.

Z klinických studií vyplývá, že v ČR je zhruba každý 4. člověk heterozygotem pro mutaci H63D a každý 130. člověk homozygotem.

Kombinování heterozygotů C282Y/H63D tvoří 3–5 % pacientů s hereditární hemochromatózou. Fenotyp je při této konstelaci kompatibilní s HH, klinický obraz bývá méně vyjádřen s nižší penetrancí mutace (33,34,35).

Variabilní fenotypové projevy naznačují účast dalších genů. Fenotypové projevy jsou ovlivněny nejen geneticky, ale také pohlavím a faktory prostředí. Je to především množství železa v potravě a konzumace alkoholu. Absorpce železa u osob s HH je 2–4krát vyšší než u zdravých osob. V pozdním stádiu nemoci může být celkové množství železa v organizmu až 40g, přičemž u zdravých jedinců je to do 5g.

Bylo prokázáno, že i určité procento heterozygotů pro mutace (především C282Y) splňuje běžná diagnostická kritéria pro hereditární hemochromatózu. U těchto jedinců je včasný záchyt z hlediska profylaxe důležitý, podobně jako u homozygotů.

Klinická manifestace

Symptomatologie nemoci se u člověka postiženého hereditární hemochromatózou projevuje kolem 40-60 roku života, po mnohaletém klinicky němém stádání železa v tkáních a jejich nevratném poškození. Pokud je choroba zachycena včas, tedy v latentním stádiu, je možná účinná profylaxe (36).

Prvotními příznaky, se kterými pacient přichází k lékaři, je celková slabost a únava, která se vyskytuje u 90 % nemocných. Druhým nejběžnějším příznakem je bolest břicha, na kterou si stěžuje až 60 % pacientů.

Tyto příznaky jsou natolik nespecifické, že z nich nelze usuzovat na jakékoliv onemocnění s genetickým pozadím. Teprve základní biochemická vyšetření mohou blíže specifikovat možný zdroj obtíží.

Prioritním ukazatelem jsou parametry metabolismu železa. Hlavním mechanismem toxického účinku železa je peroxidace lipidů. Důsledkem je destrukce dvojných vazeb nenasycených mastných kyselin, které jsou součástí membránových fosfolipidů s následnou poruchou integrity lipoproteinových membrán buněk a jejich organel, především mitochondrií. Výsledkem je porucha homeostázy nitrobuněčného prostředí s poklesem koncentrace ATP a smrt buňky v důsledku nekrózy či spuštění apoptózy (37,38).

V latentním stádiu mají postižení obvykle normální krevní obraz. Prvním ukazatelem na možné genetické pozadí choroby je zvýšená koncentrace sérového železa. Fyziologická koncentrace sérového železa je 0,4 mg/l. Fyziologická koncentrace sérového transferinu je 2,0–3,6 g/l. V případě HH je jeho koncentrace snižena. Saturace transferinu je u zdravých jedinců asi 30 %, u nemocných s HH přesahuje 50 %. Dobrým indikátorem zásob železa je sérový ferritin. Jeho fyziologická koncentrace je v závislosti na pohlaví 14–284 mg/l. Vyšší hodnoty sérového ferritinu mohou vést k podezření na HH.

Dalšími biochemickými markery, které jsou ovlivněny hereditární hemochromatózou jsou cytoplazmatické enzymy. Vzhledem k postupnému poškození hepatocytů, projevující se zvýšením permeability buněčné membrány, lze v krvi prokázat zvýšenou aktivitu ALT, LD a cytoplazmatické frakce AST. Při těžkém poškození hepatocytů, kdy se následkem nekrózy buněk do krve dostávají i enzymy lokalizované intramitochondriálně, stoupá v séru aktivita AST a poměr AST / ALT je větší než jedna. Výrazně stoupá i aktivita GMT.

V játrech probíhá mimo jiné metabolismus sacharidů, lipidů, lipoproteinů a syntéza bílkovin.

Vzhledem k tomu, že v játrech se nachází železa nejvíce, lze při manifestním poškození sledovat zvýšenou koncentraci glukózy v krvi a pokles koncentrace některých bílkovin v séru. Patří nim prealbumin, albumin a některé frakce α_1 , α_2 a β_1 globulinů. V játrech nemocných se rozvíjí cirhóza a fibróza, což může mít za následek sníženou koncentraci cholesterolu (38).

Doplňkovým vyšetřením může být jaterní biopsie. Ta však není rozhodující při diagnostice choroby, ale užívá se jí při stanovení stupně poškození jater.

Lehčí formy přetížení železem (heterozygozita v lokusu C282Y a další varianty v příslušných regulačních genech) nevedou k orgánovému poškození sami o sobě, ale mohou pravděpodobně sekundárně akcelarovat poškození jiné primární etiologie. Nejvýznamněji se to týká právě jater, kde jsou zásoby železa nejvyšší. Geneticky determinované přetížení železem bylo sledováno v souvislosti s chronickou hepatitidou C, steatohepatitidou a dalšími chorobami (39).

Problémem při diagnostice hereditární hemochromatózy je častější výskyt přidružených onemocnění v době klinické manifestace choroby. Díky tomu nemusí být dlouho (nebo vůbec) stanovena správná diagnóza. Z toho vyplývá, že prakticky jediným způsobem stanovení správné diagnózy je molekulárně biologické vyšetření genu pro hemochromatózu.

Na úseku molekulární biologie UKBD FN Hradec Králové, bylo od roku 1999 do roku 2006 vyšetřeno 488 pacientů na mutace v genu pro hemochromatózu. V naší laboratoři jsou vyšetřovány dvě nejfrekventovanější mutace, tj. C282Y a H63D. Z celkového počtu bylo 73 osob heterozygotních pro mutaci C282Y a u 34 byla stanovena homozygotní konstelace této mutace. Mutace H63D v heterozygotní formě byla zjištěna u 113 vyšetřovaných a 21 osob byli homozygoti pro tuto mutaci. Tři vyšetřované osoby pak byly smíšenými heterozygoty C282Y / H63D.

IV. Experimentální část

IV.1. Použitý biologický materiál

Ze souboru osob vyšetřených v naší laboratoři bylo do této studie vybráno 41 pacientů homozygotních pro mutaci H63D nebo C282Y (soubor 1), heterozygotních pro mutaci C282Y (soubor 2) a heterozygotních pro mutaci H63D v HFE genu (soubor 3). Celkem bylo vyšetřeno 14 žen a 27 mužů. Věk vyšetřovaných osob se pohyboval mezi 10 a 67 roky. Průměrný věk vyšetřovaných osob byl 42 let. Bližší charakteristika je udána ve výsledkové tabulce 6.

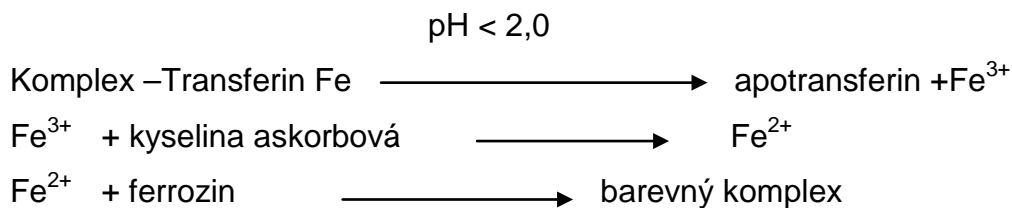
„Kontrolní“ skupinu tvořilo 32 pacientů, u nichž nebyla prokázána mutace v HFE genu. Do „kontrolního“ souboru bylo zahrnuto 8 žen a 24 mužů. Věk vyšetřovaných osob se pohyboval mezi 18 a 74 roky. Průměrný věk kontrolní skupiny byl 43 let. Tito pacienti sloužili jako porovnávací skupina pro posouzení spolehlivosti biochemických parametrů pro stanovení diagnózy HH.

Kritériem pro výběr pacientů byla laboratorní dostupnost jejich biochemických parametrů. Tato retrospektivní studie a výběr dat z laboratorního informačního systému byly provedeny se svolením Etické komise FN HK a vedení Ústavu klinické biochemie a diagnostiky FN Hradec Králové.

VI.2. Principy biochemických vyšetřovacích metod

Biochemické vyšetřovací metody prováděné na analyzátoru Modular firmy Hitachi High Technologies Corporation, Tokyo, Japonsko.

1) Stanovení Fe

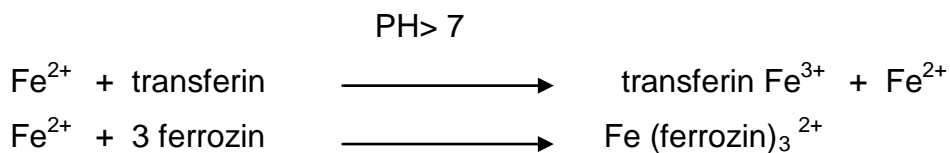


Absorbance barevného komplexu se měří fotometricky při 570 nm.

Fyziologické rozmezí: muži 10,6 – 28,3 $\mu\text{mol/l}$

ženy 6,6 – 26,0 $\mu\text{mol/l}$

2) Volná vazebná kapacita železa (UIBC)



Absorbance barevného komplexu se měří fotometricky při 570 nm.

Fyziologické rozmezí : 30,5 – 49,7 $\mu\text{mol/l}$

3) Celková vazebná kapacita železa FeVK

Stanovení výpočtem $\text{FeVK} = \text{Fe} + \text{UIBC}$

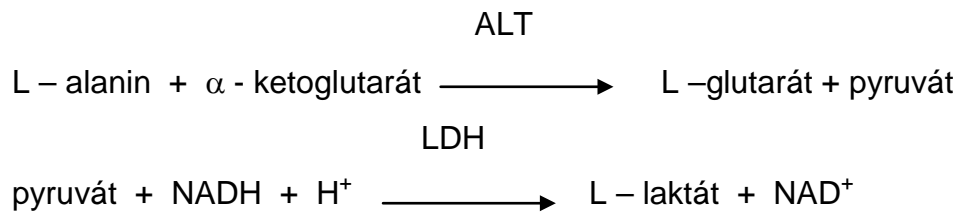
Fyziologické rozmezí : 44,8 – 73,6 $\mu\text{mol/l}$

4) Saturace železa

$$\text{Stanovení výpočtem} \quad \text{Saturace Fe} = \frac{\text{Fe}}{\text{FeVK}}$$

Fyziologické rozmezí : muži 33 %

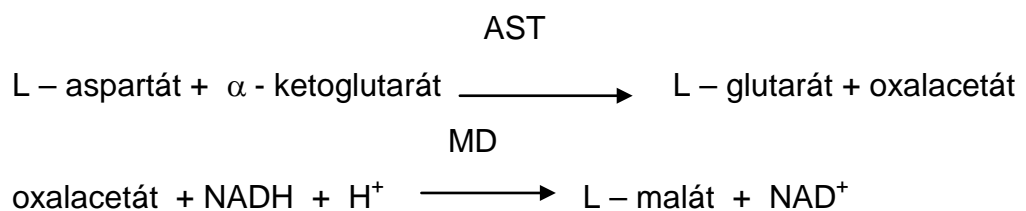
ženy 30 %

5) ALT alaninaminotransferáza optický test

fotometricky je sledován úbytek NADH měřením absorbance při 340 nm. Enzym ALT je nutné aktivovat pyridoxal –5-fosfátem, startovací substrát = ketoglutarát.

Fyziologické rozmezí : muži 0,21 – 0,79 $\mu\text{kat/l}$

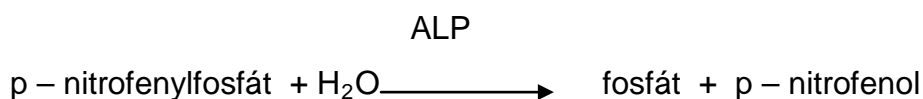
ženy 0,18 – 0,55 $\mu\text{kat/l}$

6) AST aspartátaminotransferáza

fotometricky je sledován úbytek NADH měřením absorbance při 340 nm
Enzym AST je nutné aktivovat pyridoxal-5-fosfátem, startovací substrát ketoglutarát.

Fyziologické rozmezí : muži 0,21 - 0,68 $\mu\text{kat/l}$
 ženy 0,18 - 0,52 $\mu\text{kat/l}$

7) ALP alkalická fosfatáza

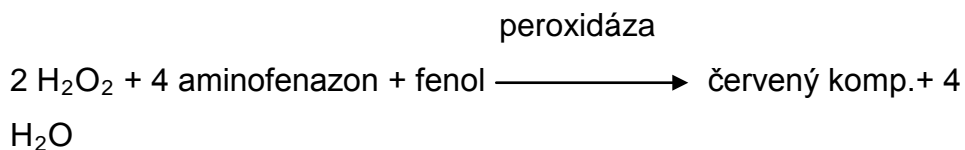
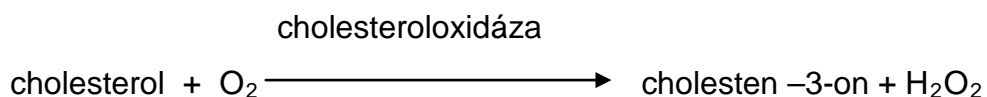
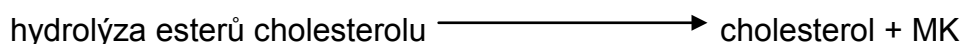


Reakce probíhá v přítomnosti Mg^{2+} a Zn^{2+} iontů v alkalickém prostředí amino-metyl-propanolového pufru.

Absorbance barevného komplexu se měří fotometricky při 415 nm.

Fyziologické rozmezí : muži 1,04 – 2,20 $\mu\text{kat/l}$
 ženy 0,71 – 2,03 $\mu\text{kat/l}$

8) Cholesterol



Fotometrické stanovení absorbance barevného komplexu.

Fyziologické rozmezí : 3,8 – 5,2 mmol/l.

9) Bilirubin

Stanovení podle Jendrassika a Grafa

Stanovení přímého bilirubinu

Kopulace s diazotovanou kys. sulfanilovou ve slabě kyselém prostředí.

Vzniká červený azobilirubin. Intenzita zabarvení je měřena fotometricky při 510 – 550 nm.

Stanovení celkového bilirubinu.

Reakce založená na diazotaci, ke stanovení je nutné použít akcelerátor (kofein + benzoan sodný).

Fyziologické rozmezí : 3 – 17 $\mu\text{mol/l}$

10) γ - glutamyltransferáza GMT

GMT přenáší γ - glutamylovou skupinu ze substrátu na dipeptid glycyglycin. Při reakci se uvolňuje aminonitrobenzoát, který se stanovuje kineticky při 405 nm.

Substrát (γ -glutamil-3-karboxy-4-nitroanilid)

Fyziologické rozmezí : muži 0,0 – 1,77 $\mu\text{kat/l}$

ženy 0,0 - 1,10 $\mu\text{kat/l}$

11) Feritin

Stanovení feritinu bylo do 30.6. 2005 prováděno imunoradiometrickou Metodou (Feritin Irma Immunotech – A Beckman Coulter Company)

Od 1.7. 2005 vyšetření prováděno enzymovou immunoanalýzou na mikročasticích (MEIA), na přístroji AxSYM, firma Abbott.

Fyziologické rozmezí : muži 17 – 230 $\mu\text{g/l}$

ženy 14 – 150 μ g/l

12) Transferin

Imunoturbidimetrická metoda

Protilátka proti transferinu reaguje s antigenem ve vzorku za vzniku komplexu antigen protilátka. Intenzita zákalu vzniklého komplexu se stanovuje turbidimetricky.

Fyziologické rozmezí : 2,0 – 3,6 g/l

IV.3. Molekulárně biologické vyšetření

Provádí se vyšetření na přítomnosti bodových mutací v genu pro hemochromatózu (C282Y a H63D):

Postup

- 1) izolace DNA
- 2) amplifikace PCR reakce
- 3) RFLP
- 4) detekce

1) Izolace DNA z biologického materiálu

Izolace DNA se provádí z plné nesrážlivé krve kitem QIAamp DNA, firmy Qiagen.

Alternativní metodou izolace DNA je fenol-chloroformová extrakce. Touto metodou lze izolovat DNA nejen z krve, ale např. i z kostní dřeně, tkáně a dalších biologických materiálů.

Kvalita a kvantita izolované DNA je stanovena spektrofotometricky měřením absorbance při vlnové délce 260 nm / 280 nm.

Při použití izolačních kolon firmy Qiagen se výtěžek pohybuje okolo 30 µg/ml, a při použití fenol-chloroformové izolace kolem 250 µg/ml. Žádoucí čistota v obou případech se pohybuje v rozmezí 1,7–1,9.

Vyizolovaná DNA může být krátkodobě uložena v lednici při teplotě 4° C, dlouhodobě skladována je při – 20 ° C v mrazícím boxu.

2) Amplifikace PCR reakce

Amplifikace vyizolované DNA se provádí metodou polymerázové řetězové reakce (PCR).

a) průkaz mutace C282Y

Sekvence primerů :

	Mutace C282Y
H 1	5' – CTG GAT AAC CTT GGC TGT ACC CCC – 3'
H 2	5' - CAG ATC CTC ATC TCA CTG – 3'

Master mix - složení

voda
Pufr (TaKaRa , MgCl ₂ 15 mM) 10x koncentrovaný
dNTPs (TaKaRa 2,5 mM) 0,2 mM
Primer C282Y (GeneriBiotech 10 pmol / µl) 10 pmol
Primer C282Y (GeneriBiotech 10 pmol / µl) 10 pmol
Taq – polymeráza (TaKaRa 5U / µl) 0,75 U

b) Průkaz mutace H63D

Sekvence primerů

	Mutace H63D
H 1	5' - ACA TGG TTG AGG CCT GTT GC – 3'

H 2	5'- GCC ACA TCT GGC TTG AAA TT – 3'
-----	-------------------------------------

Master mix – složení

voda
Pufr (TaKaRa , MgCl ₂ 15 mM) 10 mM
DNTPs (TaKaRa 2,5 mM) 0,2 mM
Primer H63D 1 (GeneriBiotech 25 pmol / μl)
Primer H63D 2 (GeneriBiotech 25 pmol / μl)
Tag – polymeráza (TaKaRa 5U / μl) 0,75 U

K analýze je použito 23 μl master mixu a 2 μl vyizolované DNA. PCR reakce probíhá v cykleru , ve kterém je nastaven požadovaný teplotní profil. Výsledek amplifikace je monitorován na kontrolním gelu.

3) *RFLP*

Restrikční analýza se provádí přímo v mikrozkušnicích, ve kterých proběhla PCR. Pro restrikční analýzu se používají endonukleázy Rsa I (mutace C282Y) a Bcl I (mutace H63D).

Mutace C282Y

15 μl PCR produktu + 0,5 μl Rsa I + 1,5 μl pufru NEB 1
inkubace 16 hodin při teplotě 37 °C

Mutace H63D

15 μl PCR produktu + 0,5 μl Bcl I + 1,5 μl pufru NEB 3
inkubace 16 hodin při teplotě 50 °C

5) *Detekce*

Detekce produktu po restrikční analýze se provádí na 3 % agarozovém gelu barveném ethidium bromidem s vhodným velikostním markerem.

Interpretace výsledků:

C282Y mutace : produkt : 171 bp + 18 bp = wt / wt
 171 bp + 133 bp + 18 bp = M / wt
 133 bp + 38 bp + 18 bp = M / M

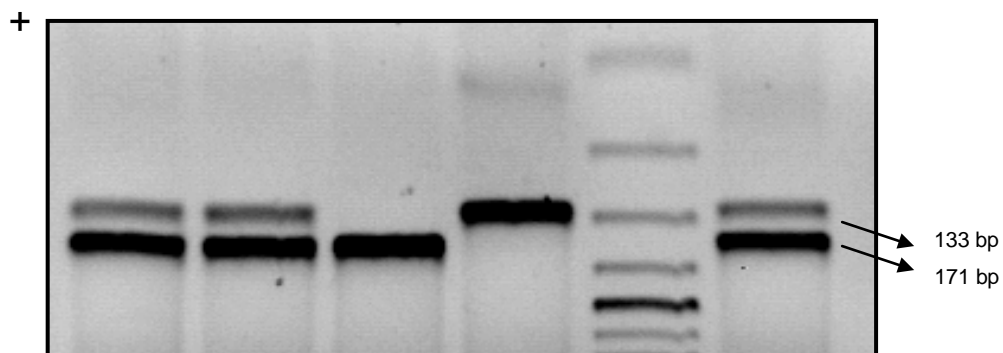
H63D mutace : produkt : 150 bp + 50 bp = wt / wt
 200 bp 150 bp + 50 bp = M / wt
 200 bp = M / M

M / M = homozygot pro mutaci

M / wt = heterozygot pro mutaci

wt / wt = zdravý homozygot

Obrázek 2. Ukázka analýzy C282Y pomocí PCR-RFLP na 3% horizontálním agarózovém gelu. dráha 1: heterozygot M/wt,
 dráha 2: heterozygot M/wt
 dráha 3. homozygot wt/wt
 dráha 4. homozygot M/M
 dráha 5. velikostní marker MXIII
 dráha 6. kontrola M/wt



1 2 3 4 5 6

IV.4. Princip real – time PCR s hybridizačními FRET sondami

Pro fluorimetrickou detekci a vyhodnocení PCR reakce v reálném čase (real-time PCR) ve skleněných kapilárách na přístroji LightCycler (viz obrázek 3) lze použít několik metod. V této práci byla použita metoda využívající FRET sondy (fluorescence resonance energy transfer) specificky detekující vytvořené PCR produkty.

Obrázek 3. Čelní pohled na LightCycler (Roche), verze 1.5.



Jako sondy se používají dva speciálně navržené, sekvenčně specifické oligonukleotidy značené na svých koncích fluorochromy. Sekvence těchto sond se volí tak, aby mohly komplementárně hybridizovat ve své těsné blízkosti (v našem případě 2 nukleotidy) na cílovou sekvenci amplifikovaného DNA fragmentu v uspořádání „hlava-ocas“ (head-to-tail) tak, aby po hybridizaci mohlo dojít k účinnému přenosu energie.

Používané barvy (fluorochromy):

a) Fluorescein - využití – značení donorové sondy

Sonda obsahuje fluorochrom na svém 3' konci, maximum excitace fluoresceinu: 493 nm; maximum emise barvy: 525 nm

b) LightCycler Red 640 (LC Red 640) - využití – značení akceptorové sondy

Sonda obsahuje fluorochrom na svém 5' konci, maximum excitace: 626 nm; maximum emise: 640 nm. Hydroxylová skupina na 3' konci oligonukleotidového řetězce musí být fosforylována, aby se zabránilo prodlužování (polymeraci) sondy během PCR reakce.

b) LightCycler Red 705 (LC Red 705) – využití – značení akceptorové sondy

Sonda obsahuje fluorochrom na svém 5' konci, maximum excitace: 685 nm; maximum emise: 705 nm.

Reakční směs obsahuje kromě dvou sond ještě reakční pufr, dNTPs, Taq polymerázu, hořečnaté kationty, primery a DNA templát. Optimalizace koncentrací jednotlivých komponent byly jedním z cílů této bakalářské práce a jsou proto uvedeny jako součást její výsledkové části.

Během denaturace při 95 °C vytváří templát jednořetězcová vlákna DNA. Po dosažení annealingové teploty (58 °C) hybridizují PCR primery a sondy komplementárně ke svým specifickým sekvencím cílových úseků. Donorová sonda značená fluoresceinem se dostává do těsné blízkosti fluorochromu sondy akceptorové. Po osvětlení elektrony fluoresceinu excitují světlem ze zdrojové LED diody (470 nm) a

následně dochází k emisi fluorescence o vlnové délce 530 nm. Emitované záření předává část své energie pomocí dipól-dipól interakcí akceptorovému fluorochromu.

Ten následně emituje fluorescenční záření o vyšší vlnové délce (640 nm nebo 705 nm). Světlo emitované LC Red 640 (resp. 705) se následně měří v příslušném detekčním kanálu (F2, resp. F3) na konci hybridizační fáze, tedy v době, kdy dosahuje fluorescence svého maxima. S každou nově vytvořenou molekulou amplikonu se zvyšuje intenzita fluorescence. Počínaje cyklem, ve kterém dojde k nárůstu fluorescence nad mez detekce, platí, že hodnota fluorescence je nepřímo úměrná logaritmu koncentrace cílové DNA. Čím vyšší je množství DNA templátu ve směsi, tím menší počet cyklů je třeba k nárůstu fluorescence nad detekční mez přístroje.

V dalším kroku programu (elongace) dochází k vzestupu teploty na 72 °C, což má za následek oddělení sond od cílových sekvencí. Současně jsou na základě komplementarity dosyntetizována dceřinná vlákna k vláknům templátovým. V této fázi reakce jsou sondy odděleny, jsou tedy příliš daleko od sebe a přenosu FRET energie není možný. Při dalším cyklu se děj znovu opakuje.

IV.5. Použité statistické metody

Pro hodnocení biochemických dat a molekulárně biologických parametrů byl v jednotlivých skupinách pacientů vypočítán číselný průměr a výběrová směrodatná odchylka. Pro hodnocení statistické významnosti byl použit t test. Veškeré statistické analýzy byly provedeny v programu Microsoft Excel, verze 2000.

U všech biochemických parametrů bylo předpokládáno normální rozdělení hodnot. Za statisticky významnou byla považována hladina významnosti $p < 0,05$.

V. Výsledky

V.1. Optimalizace experimentálních podmínek pro real-time PCR

Pro analýzu byly použity primery a sondy firma TIB MOLBIOL Synthesela bor GmbH (Berlin, SRN).

Sekvence primerů pro mutaci C282Y

HFE 282 F	5´TggCAAaggTAAACAgATCC 3´
HFE 282 B	5´TACCTCCTCAggCACTCCTC 3´

Sekvence sond pro mutaci C282Y

HFE 282 mt	5´AgATATACgTACCAggTggAg--FL
HFE 282 (640)	
	5´-LC640-CCCAggCCTggATCAgCCCCTCATTgTgATCTgg--PH

Sekvence primerů pro mutaci H63D

HFE63 S	5´CACATggTTAAggCCTgTTg 3´
HFE63 A	5´gATCCCACCCTTTCAgACTC 3´

Sekvence sond pro mutaci H63D

HFE 63 mt	5´- ACggCgACTCTCATCATCAgA—FL
HFE 6365 (705)	
	5´-LC705-CACgAACAgCTggTCATCCACgTAGCCCAAAGCTTCAA-PH

Reakce probíhala v LightCycleru firmy Roche Molecular Biochemicals

Teplotní profil PCR reakce.

Proběhlo 40 cyklů za podmínek uvedených v následujícím schématu.

1. denaturace: 95°C - 10 sec.
2. annealing : 58°C - 10 sec.
3. elongace : 72°C - 7 sec.

Počáteční denaturace 95°C - 6 minut.

Protokol č. 1: Optimalizace koncentrace MgCl₂ pro H63D i C282Y mutace.

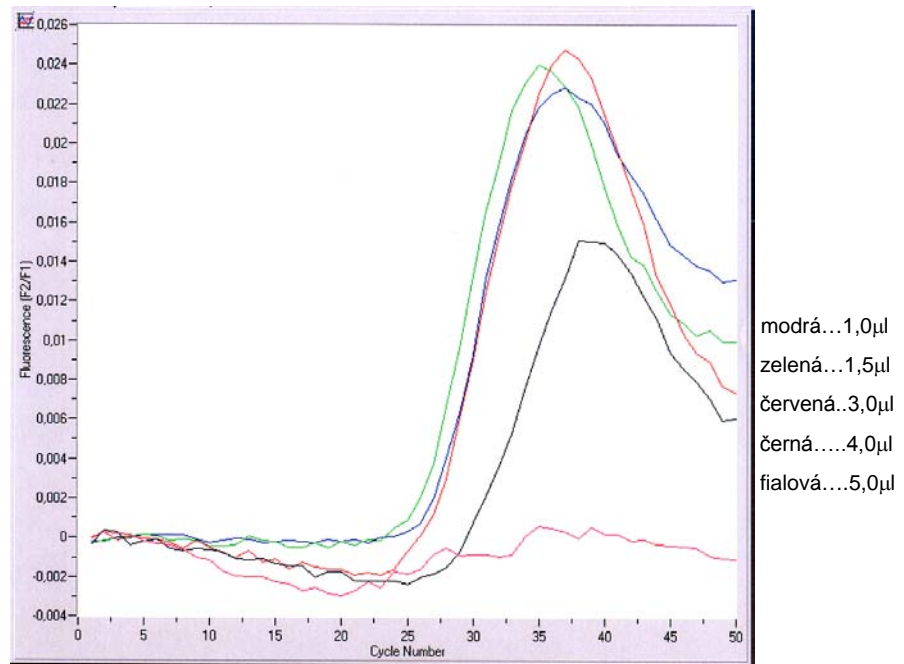
Tabulka 1. Složení master mixu

Pufr Roche	10x	2,0μl
MgCl ₂	25mM	0,5μl
Pr.C282Y F	5μM	0,4μl
Pr.C282Y B	5μM	0,4μl
Pr. H63D S	5μM	0,4μl
Pr. H63D A	5μM	0,4μl
S. C282Ymt	2μM	2,0μl
S. C282Y (640)	2μM	2,0μl
S. H63D mt	1μM	2,0μl
S. H63D (750)	2μM	2,0μl
H ₂ O		0,9μl
DNA		2,0μl

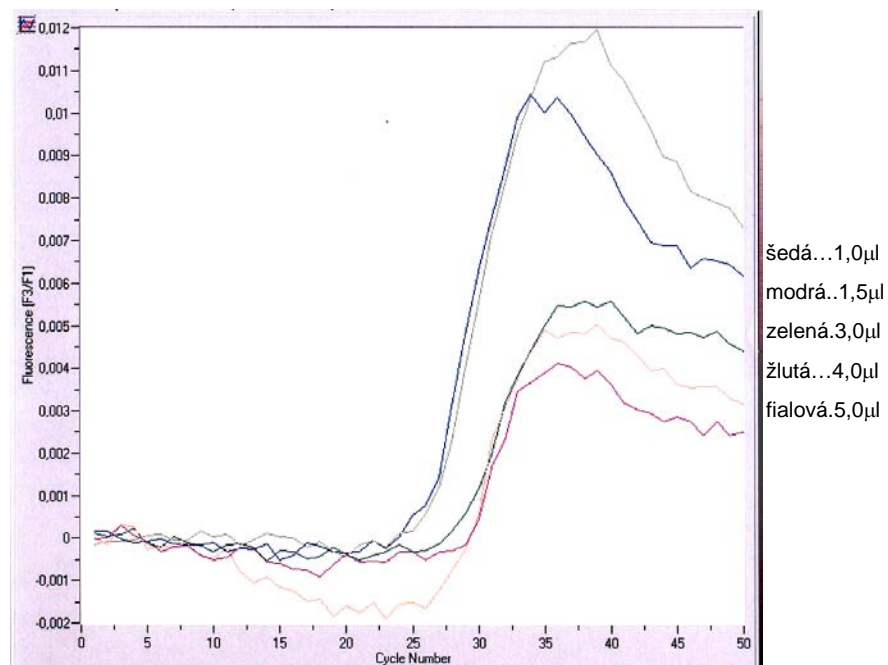
K základnímu master mixu bylo do jednotlivých kapilár připipetováno: 1,0 1,5 3,0 4,0 a 5,0 μ l MgCl₂.

Celkový objem byl v kapilárách doplněn H₂O na 22 μ l a poté provedena analýzy. Výsledek analýzy dokládají obrázky 4 a 5.

Obrázek 4. Amplifikační křivky real-time pro mutaci C282Y při optimalizaci koncentrace MgCl₂.



Obrázek 5. Amplifikační křivky real-time pro mutaci H63D při optimalizaci koncentrace MgCl₂.



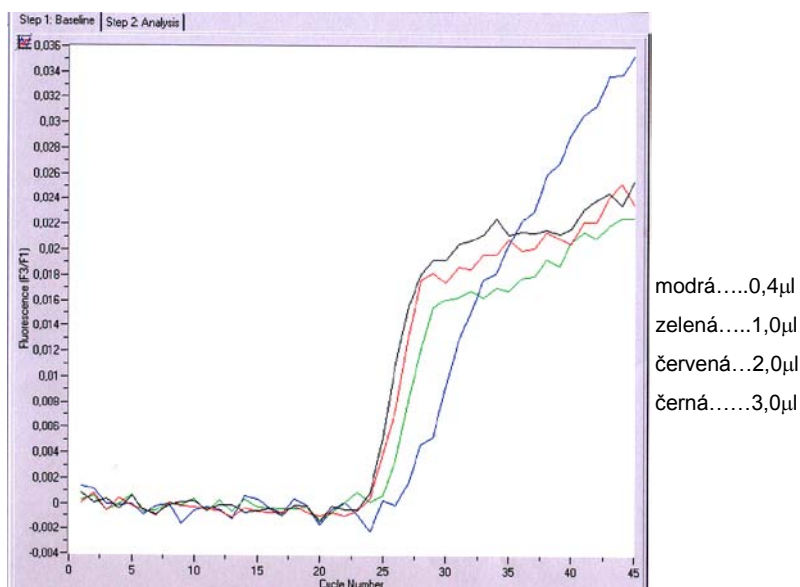
Závěr protokolu 1: Jako optimální koncentrace $MgCl_2$ pro reakci byla shledána koncentrace 1,5 μl .

Protokol č.2: Optimalizace koncentrace primerů a sond pro H63D
Master mix pro mutaci H63D

Pufr Roche 10x	2,0 μl
$MgCl_2$	1,5 μl
Primer H63D S	0,4 μl
Primer H63D A	1,0 μl
Sonda H63D(705)	1,0 μl
Sonda H63D mt	1,0 μl
DNA	2,0 μl

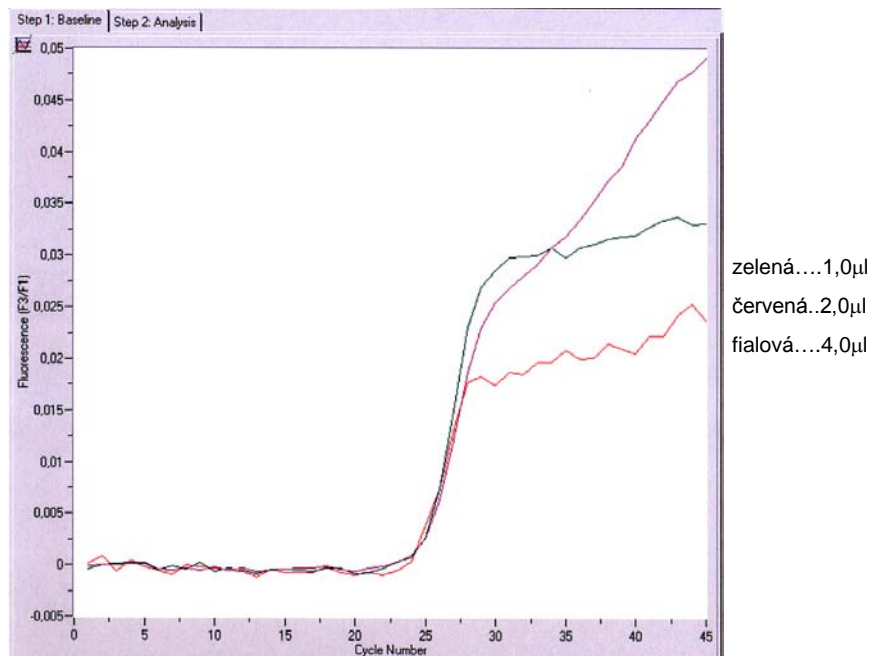
K základnímu master mixu bylo do jednotlivých kapilár připipetováno: 0,6 1,6 2,6 μl primerů H63D S a H63D A. Doplněno na celkový objem 22 μl H_2O . Hodnocení viz obrázek 6.

Obrázek 6: Amplifikační křivky real-time pro mutaci H63D při optimalizaci koncentrace primerů při koncentraci sond 1 μl .



Pro optimalizaci koncentrace sond bylo použito stejné složení směsi, jako u předcházející série, objem sond H63D mt a H63D (705) byl zvýšen na 2 μ l a 4 μ l . Hodnocení viz obrázek 7.

Obrázek 7: Amplifikační křivky real-time pro mutaci H63D při optimalizaci koncentrace sond pro H63D.



Závěr protokolu 2:

Optimální koncentrace pro mutaci H63D

MgCl₂ = 1,5 μ l

Primer H63 A = 1,0 μ l

Primer H63 S = 1,0 μ l

Sonda H63mt = 1,0 μ l

Sonda H63(705) = 1,0 μ l

Protokol č. 3: Kontrola optimalizace podmínek pro mutaci C282YMaster mix pro mutaci C282Y

Pufr Roche 10x	2,0 μ l
MgCl ₂ 25mM	1,5 μ l
PrimerC282Y F	0,5 μ l
PrimerC282Y B	0,5 μ l
Sonda282 mt	2,0 μ l
Sonda282(640)	2,0 μ l
H ₂ O	9,5 μ l
DNA	2,0 μ l

Závěr protokolu 3: Master mix byl shledán jako optimální pro analýzu.

Protokol č. 4: Optimalizace množství DNA templátu a hodnocení meze detekce metody real-time PCR (protokol dvou jednoduchých PCR reakcí ve dvou kapilárách)

Master mix

<i>Mutace H63D</i>		<i>Mutace C282Y</i>	
Pufr Roche 10x	2,0 μ l	Pufr Roche 10x	2,0 μ l
MgCl ₂ (25mM)	1,5 μ l	MgCl ₂ (25mM)	1,5 μ l
Primer H63D C	1,0 μ l	Primer C282Y B	0,5 μ l
Primer H63D A	1,0 μ l	Primer C282Y F	0,5 μ l
SondaH63mt	1,0 μ l	Sonda C282 mt	2,0 μ l
Sonda H63 (750)	1,0 μ l	Sonda C282 (640)	2,0 μ l
H ₂ O	10,5 μ l	H ₂ O	9,5 μ l

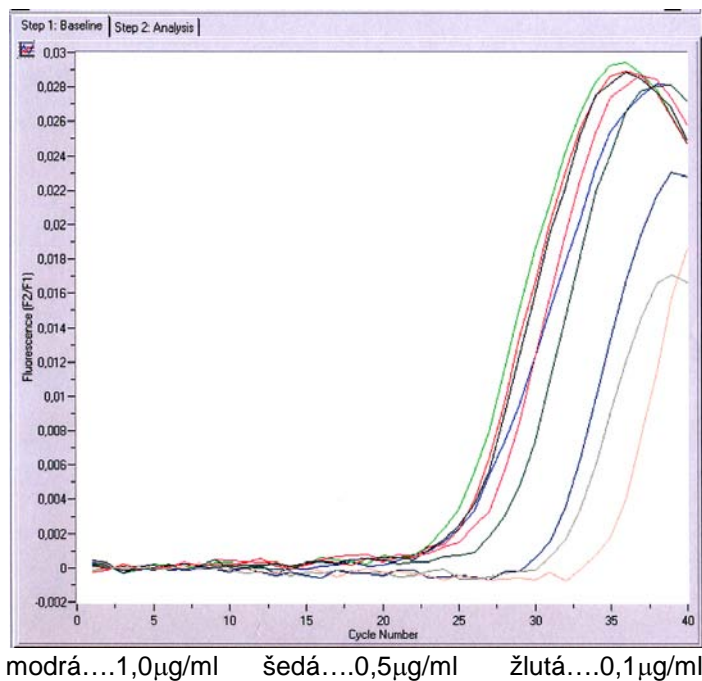
Koncentrace DNA

Vzorky

Koncentrace DNA

č1.....	300,0μg/ml
č2.....	100,0μg/ml
č3.....	50,0μg/ml
č4.....	35,0μg/ml
č5.....	17,5μg/ml
č6.....	8,7μg/ml
č7.....	1,0μg/ml
č8.....	0,5μg/ml
č9.....	0,1μg/ml

Obrázek 8. Amplifikační křivky real-time pro mutaci C282Y pro zjištění meze detekce real-time PCR.



Obrázek 9. Amplifikační křivky real-time pro mutaci H63D pro zjištění meze detekce real-time PCR.



modrá.....1 µg/ml šedá.....0,5 µg/ml žlutá....0,1 µg/ml

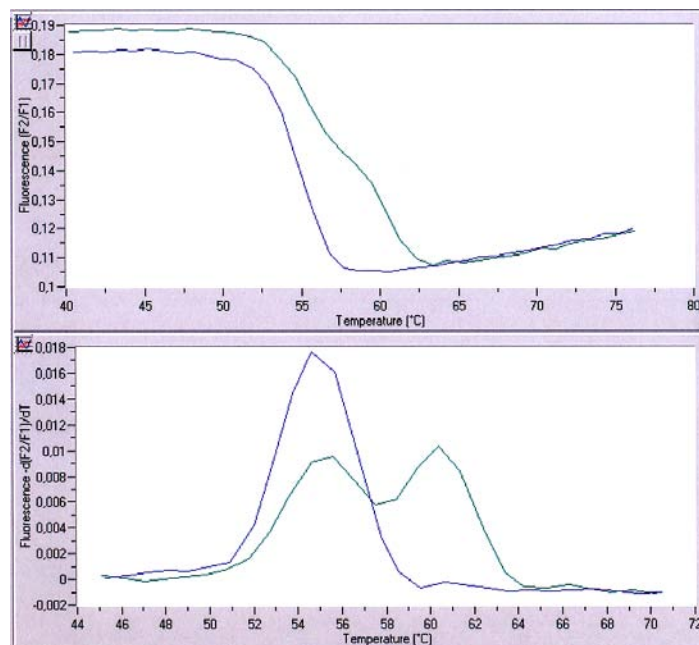
Závěr protokolu 4: Nejnižší experimentálně ověřená koncentrace DNA templátu schopná amplifikace je 0,1 µg/l.

Protokol 5: Hodnocení paralelní vyšetření obou mutací v jedné kapiláře (multiplex PCR) versus PCR ve dvou kapilárách

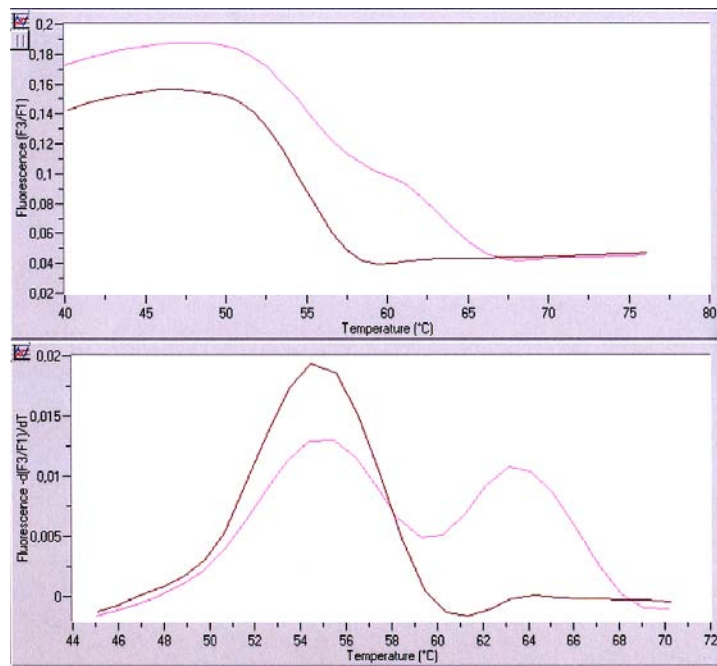
Master mix pro multiplex PCR

Pufr Roche 10x	2,0 μ l
MgCl ₂ 25 mM	1,5 μ l
Primer H63D S	1,0 μ l
Primer H63D A	1,0 μ l
Sonda H63mt	1,0 μ l
Sonda H63(705)	1,0 μ
Primer C282Y	0,5 μ l
Primer C282Y B	0,5 μ l
Sonda C282Y mt	1,0 μ l
Sonda C282Y(640)	1,0 μ l
H ₂ O	7,5 μ l)
DNA	2,0 μ l

Obrázek 10. Analýza teploty tání pro mutace C282Y při multiplex real time-PCR .modrá křivka.....wt/wt zelená.....M/wt



Obrázek 11. Analýza teploty tání pro mutace H63D při multiplex real time-PCR hnědá křivka.....wt/wt fialová.....M/wt



Závěr protokolu 5:

Hodnota teploty tání pro mutovanou alelu C282Y = 54,77°C.

Hodnota teploty tání pro zdravou alelu C282Y = 60,39°C.

Hodnota teploty tání pro mutovanou alelu H63D = 54,70°C.

Hodnota teploty tání pro zdravou alelu H63D = 63,60°C.

Protokol 6. Rozptyl hodnot teploty tání normálních a mutovaných alel na souboru anonymizovaných analytických vzorků DNA (výsledky viz tabulka 2) .

Tabulka 2: Průměrné hodnoty teplot tání pro mutované a zdravé alely H63D a C282Y.

	n	T _m °C	SD
H63D wt	57	54,70	0,34
H63D M	29	63,60	0,34
C282Y wt	50	54,77	0,29
C282Y M	27	60,39	0,30

Závěr protokolu 6:

Průměrná teplota tání zdravé alely H63D = $54,70 \pm 0,34$ °C.

Průměrná teplota tání mutované alely H63D = $63,60 \pm 0,34$ °C.

Průměrná teplota tání zdravé alely C282Y = $54,77 \pm 0,29$ °C.

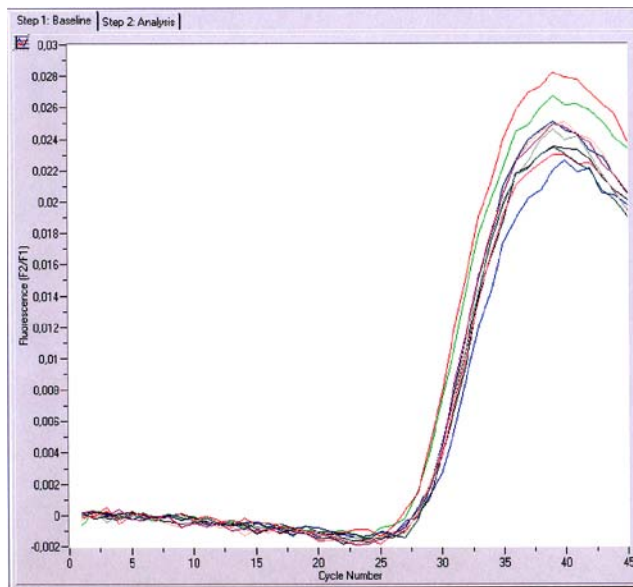
Průměrná teplota tání mutované alely C282Y = $60,39 \pm 0,30$ °C.

Protokol 7: Hodnocení sériové opakovatelnosti real-time PCR pomocí crossing-point analýzy pro mutace H63D a C282Y (viz Tabulka 3)

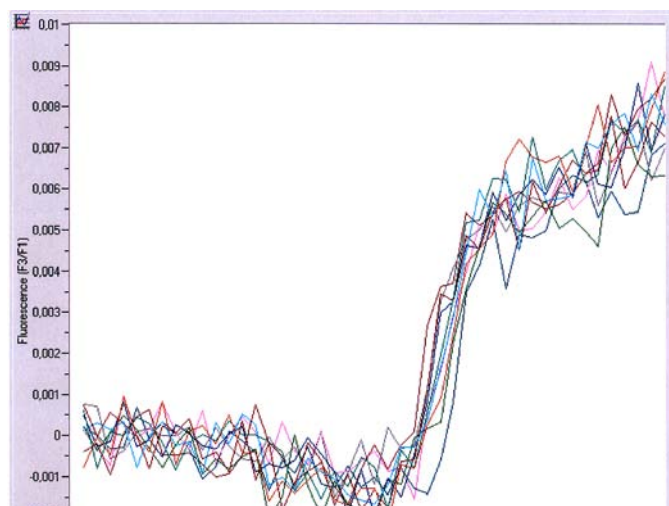
Tabulka 3. Hodnoty analýzy crossing-point pro obě mutace

	n	crossing point	SD
H63D	11	25,51	1,05

C282Y	11	27,95	1,26
-------	----	-------	------

Obrázek 12.

Hodnocení sériové opakovatelnosti real-time PCR pro mutaci C282Y, určená na 11 vzorcích DNA, vyšetřených v 1 analytické sérii.

Obrázek 13.

Hodnocení sériové opakovatelnosti real-time PCR pro mutaci H63D, určená na 11 vzorcích DNA, vyšetřených v 1 analytické sérii.

Závěr protokolu 7:

Hodnota crossing-point pro mutaci H63D = $25,51 \pm 1,05$.

Hodnota crossing-point pro mutaci C282Y = $27,95 \pm 1,26$.

Sériová opakovatelnost reakce je vyhovující.

Protokol 8: Hodnocení reprodukovatelnosti v čase (8 sérií v průběhu 14 dní) real-time PCR pomocí crossing-point analýzy pro mutace H63D a C282Y (viz Tabulka 4)

Tabulka 4. Hodnoty analýzy crossing-point pro obě mutace

	n	crossing-point	SD
H63D	8	25,01	0,30
C282Y	8	27,55	0,39

Závěr protokolu 8:

Hodnota crossing-point pro mutaci H63D = $25,01 \pm 0,30$.

Hodnota crossing-point pro mutaci C282Y = $27,55 \pm 0,39$.

Reprodukovatelnost analýzy v čase je vyhovující.

V.2. Výsledky vyšetření probandů pomocí real-time PCR

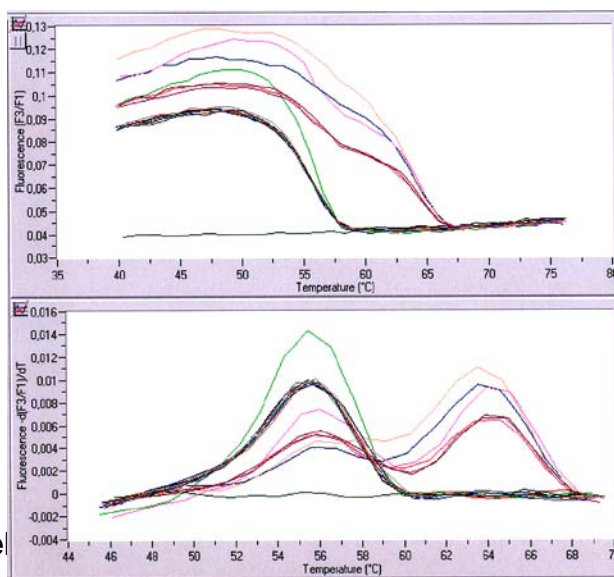
Metodou real-time PCR jsme vyšetřili celkem 73 pacientů se známými genotypy určenými v předchozích analýzách pomocí PCR-RFLP pro oba typy mutací. Tabulka 5 prezentuje shodu dosažených výsledků.

Tabulka 5. Srovnání výsledků metody PCR-RFLP a real-time PCR pro mutace H63D a C282Y v HFE genu.

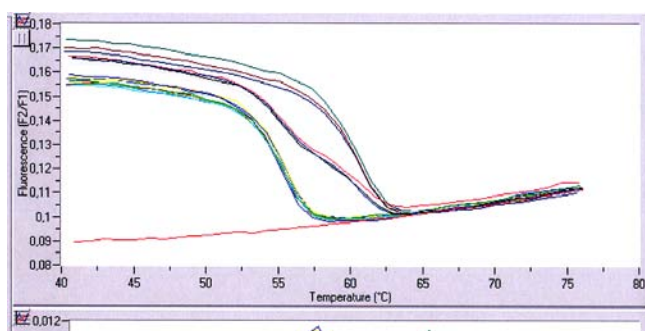
--	--	--	--	--

Skupina	n osob	Real-time	PCR RFLP	shoda
wt/wt	32	32	32	100 %
heterozygot H63D	10	10	10	100 %
heterozygot C282Y	8	8	8	100 %
homozygot H63D	6	6	6	100 %
homozygot C282Y	17	17	17	100 %

Obrázek 14. Příklad analýzy mutace H63D v sérii 16 pacientů. Zdravá alela disponuje T_m přibližně 55°C , T_m mutované alely je přibližně 64°C .



Obrázek 15. Příklad analýzy mutace H63D v sérii 16 pacientů. Zdravá alela disponuje T_m přibližně 55°C , T_m mutované alely je přibližně 61°C .



Závěr: Obrázek č. 14 a 15 dokumentuje shodu výsledků vyšetření viz. tabulka č.5.

V.3. Výsledky biochemických analýz probandů

Klinicko-biochemickým vyšetřením jsme zjistili u vybraného souboru osob požadovaná laboratorní data. Složení souboru, průměrné hodnoty a hodnoty směrodatné odchylky měřených analytů shrnuje tabulka 6.

Tabulka 6. Srovnání biochemických parametrů v sledovaném souboru probandů

	negativní	Heterozygot H63D	Heterozygot C282Y	Homozygot D63D,C282Y
Složení souboru	24 mužů 8 žen	7 mužů 3 ženy	3 muži 5 žen	17 mužů 6 žen

	průměr	SD	průměr	SD	průměr	SD	průměr	SD
Věk	43,1	16,16	43,8	15,05	32,5 ^a	18,7	49,0	11,0
ALT μ kat/l	2,65 ^a	3,52	1,87	1,93	0,47 ^a	0,44	1,10	0,95
ALP μ kat/l	2,20 ^b	1,17	1,67	1,01	2,44	1,61	1,56	0,67
AST μ kat/l	2,51	4,55	1,62	2,47	0,63	0,48	0,87	0,41
Bilirubin μ mol/l	80,14 ^a	162,14	25,0	16,23	36,00	65,26	14,31	8,21
Cholesterol mmol/l	4,57	1,71	4,54	1,57	4,99	1,33	4,50	0,78
Feritin μ g/l	766,26	1272,0	366,73	406,30	285,88 ^a	382,24	700,74	648,88
Fe μ mol/l	25,93 ^c	8,04	29,87	15,75	29,66	16,71	34,83	12,29
FeVK μ mol/l	55,33	16,34	60,47 ^c	8,78	55,79	8,65	49,37	10,56
Saturace %	0,50 ^c	0,20	0,39 ^c	0,19	0,85	0,19	0,72	0,22
GMT μ kat/l	3,77 ^b	4,90	1,52	1,42	0,73	0,85	1,37	1,26
TAG mmol/l	2,54 ^b	2,70	1,26	0,60	2,22	2,34	1,27	0,76
Transferin g/l	2,33	0,72	2,69 ^c	0,34	2,34	0,52	2,05	0,61
* Biopt. Fe μ g/g	1339,69	784,09	2935,20	2477,7	3904,50		8078,70	6643,5

a $p < 0,05$; b $p < 0,02$; c $p < 0,01$
(hodnoceno proti skupině homozygotní)

* vzhledem k nekompletním datům nebyla statistická
analýza pro tento parametr provedena

VI. Diskuze

V roce 2002 byla uveřejněna kolektivem autorů Čimburová M. a kol. (34) studie, která poprvé stanovila počty heterozygotů a homozygotů pro obě mutace HFE genu v ČR. Mutace C282Y v heterozygotním stavu zahrnuje cca 7% naší populace, tj. každá 15 osoba je přenašečem hemochromatózy. Každá 850. osoba je homozygotem pro C282Y. Každý čtvrtý člověk je heterozygotem pro mutaci H63D, každý

130. člověk u nás je pro tuto mutaci homozygotem. Kombinovaných heterozygotů H63D / C282Y je přibližně 3–5 %.

V naší laboratoři bylo od roku 1999 do konce roku 2006 vyšetřeno celkem 488 probandů s podezřením na hereditární hemochromatózu. Z tohoto počtu bylo vyšetřením prokázáno 73 heterozygotů pro mutaci C282Y (15 % z celkového počtu), tj. každá sedmá osoba. Homozygotních pro tuto mutaci bylo 34 probandů (6%), tj. každá čtrnáctá osoba. Mutace H63D v heterozygotním stavu byla diagnostikována u 113 probandů (23%), tj. u každé čtvrté osoby a v homozygotním stavu u 21 osob (4,3%), tj. každá dvacátá třetí osoba z celkového počtu. V souboru byly prokázány 3 heterozygoti pro kombinovanou mutaci C282Y / H63D.

V porovnání s výše uvedenou studií jsme v tomto našem souboru prokázali dvojnásobný počet heterozygotů pro mutaci C282Y a shodný počet heterozygotů pro mutaci H63D. Počet pacientů s homozygotní konstelací jak pro mutaci H63D tak pro mutaci C282Y byl v našem souboru vyšší. Rozdíly ve frekvenci mutací jsou dány nenáhodným výběrem našeho souboru, do kterého byly zařazeny pouze osoby, u kterých bylo prováděno vyšetření na HH právě pro podezření na toto onemocnění.

Genetickému vyšetření vždy předchází vyšetření biochemická, která signalizují poruchy metabolismu železa. Vyšetření mutací v HFE genu pak potvrdí nebo vyvrátí předpokládané diagnózy.

Také v naší studii byly kromě molekulárně biologického vyšetření HH sledovány i vybrané biochemické markery, jejichž vyšší či nižší hodnota svědčí pro poškození jaterní tkáně.

Kumulace železa v organismu, a to především v játrech má za následek zvýšení nebo naopak snížení některých biochemických markerů v závislosti na stupni poškození jater a funkčnosti metabolismu železa. V první řadě je to koncentrace železa, vazebná kapacita pro železo, transferin a feritin, který je významným ukazatelem celkových zásob železa v organismu.

Fyziologické rozmezí pro Fe je 6,6–28,3 $\mu\text{mol/l}$. U homozygotů pro HH byla průměrná koncentrace Fe 34,83 $\mu\text{mol/l}$ tj. v průměru o 23% vyšší než u zdravé populace. U heterozygotů pro mutace H63D a C282Y činilo zvýšení koncentrace železa cca 10% nad fyziologické rozmezí.

Fyziologické rozmezí FeVK je 44,8–73,6 $\mu\text{mol/l}$. Hodnota vazebné kapacity u homozygotů a heterozygotů pro mutaci C282Y se nachází na spodní hranici fyziologických hodnot, u heterozygotů pro H63D zhruba uprostřed fyziologického rozmezí.

Saturace transferinu se fyziologicky pohybuje okolo 33%. U skupiny homozygotů pro HH a heterozygotů pro mutaci C282Y činí hodnota saturace více než dvojnásobek fyziologické hodnoty. Oproti tomu heterozygoti pro mutaci H63D mají hodnotu saturace na horní hranici fyziologického rozmezí.

Fyziologická koncentrace feritinu je 14–284 $\mu\text{g/l}$. U homozygotů je průměrná koncentrace 700,74 $\mu\text{g/l}$ tzn. 2,5x vyšší než je fyziologická koncentrace. U heterozygotů pro mutace C282Y a H63D byla koncentrace feritinu pouze lehce zvýšena nad fyziologickou mez. Transferin má fyziologickou koncentraci v krvi rovnající se 2,0–3,6 g/l. Ve skupině homozygotů byla jeho průměrná koncentrace 2,05 g/l, tzn. na spodní hranici fyziologického rozmezí. Heterozygoti pro H63D a C282Y měli v průměru o 0,30–0,60 g/l vyšší koncentraci transferinu než homozygoti.

Dalšími biochemickými markery, které signalizují postižení jater jsou transaminázy (ALT, AST a GMT) a dále ALP.

Fyziologické rozmezí ALT je 0,18–0,79 $\mu\text{kat/l}$. Ve skupině homozygotů byla průměrná hodnota 1,10 $\mu\text{kat/l}$ tj. cca o 39 % vyšší než u zdravé populace. U heterozygotů pro C282Y byla hodnota ALT ve fyziologickém rozmezí, u heterozygotů pro H63D byla pak více než dvojnásobná. Provedená statistická analýza prokázala, že skupina heterozygotů C282Y měla hodnoty ALT v séru významně nižší než skupina homozygotů.

AST fyziologické rozmezí je 0,18–0,68 $\mu\text{kat/l}$. Průměrná koncentrace u homozygotů činila 0,87 $\mu\text{kat/l}$ tedy o 27 % vyšší než u zdravé populace. Hodnoty u heterozygotů pro C282Y byly ve fyziologickém rozmezí, hodnoty u heterozygotů pro H63D pak byly cca 3x vyšší.

ALP má fyziologické rozmezí 0,71–2,20 $\mu\text{kat/l}$. Hodnoty všech sledovaných skupin se nacházely ve fyziologickém rozmezí.

Fyziologické rozmezí GMT je 0,0–1,77 $\mu\text{kat/l}$. U všech vyšetřovaných osob byly hodnoty GMT v normě.

Následkem ukládání železa v játrech se u postižených osob postupně rozvíjí fibróza a cirhóza jater. Játra tak přestávají plnit svoji funkci v odbourávání bilirubinu a tak dochází ke zvýšení koncentrace bilirubinu v krvi. Současně dochází k poklesu koncentrace cholesterolu.

Fyziologické rozmezí bilirubinu činí 3–17 $\mu\text{mol/l}$. U homozygotů se koncentrace bilirubinu pohybovala ve fyziologickém rozmezí. U heterozygotů pak koncentrace bilirubinu byla o 50 až 100 % vyšší než fyziologická hodnota.

Fyziologické rozmezí cholesterolu je 3,8–5,2 mmol/l . Koncentrace cholesterolu u homozygotů byla v průměru 4,50 mmol/l , tedy zhruba uprostřed fyziologického rozmezí. U heterozygotů pro mutace C282Y a C63D byla hodnota přibližně stejná jako u homozygotů.

Stanovení železa v jaterní tkáni (tzv. bioptické železo) se jako rutinní vyšetření metabolismu železa běžně neprovádí. Toto vyšetření slouží spíše ke stanovení stupně poškození jater.

U homozygotů byla koncentrace bioptického železa v průměru 8078,70 $\mu\text{g/g}$, u heterozygotů pro obě mutace pak v průměru 3000,0 – 4000,0 $\mu\text{g/g}$.

Ze souhrnu výsledků biochemických markerů vyplývá, že nejvýznamnějším ukazatelem svědčícím o kumulaci železa

v organizmu, je podle předpokladu ferritin, který je u pacientů s prokázanou HH v průměru 2,5x vyšší oproti normálu. Podobně i koncentrace železa je u této skupiny vyšší než u ostatních skupin. Naopak nižší je koncentrace transferinu a vazebné kapacity FeVK v porovnání se skupinou heterozygotů, což také svědčí pro diagnózu HH. Největší rozdíl pak vykazuje hodnota biotického železa, která je u homozygotů 2 – 2,5x vyšší než u heterozygotů.

Ostatní biochemické markery jsou pak pro danou diagnózu málo průkazné.

Výpovědní hodnota výsledků biochemických vyšetření není stoprocentní z několika důvodů.

1. U pacientů s prokázanou HH probíhá léčba (venepunkce), tudíž hodnoty metabolismu železa jsou značně rozkolísané.
2. Především u heterozygotů mohou být výsledky biochemických vyšetření ovlivněny jinou probíhající chorobou.

„Kontrolní“ skupina tvořená 32 probandy nesloužila k porovnání zdravé a nemocné populace. U probandů nebyly předchozím vyšetřením prokázány mutace v HFE genu a skupina sloužila k demonstraci pravdivé účinnosti biochemických vyšetření při stanovení diagnózy HH.

Hodnoty biochemických analytů u této skupiny svědčí o poruše metabolismu železa a poškození jater, kdy např. koncentrace ferritinu ($766,26 \pm 1272,0 \mu\text{g/l}$), GMT ($3,70 \pm 4,90 \mu\text{kat/l}$), ALT ($2,65 \pm 3,52 \mu\text{kat/l}$), AST ($2,51 \pm 4,55 \mu\text{kat/l}$) a bilirubin ($80,14 \pm 162,14$), jsou statisticky významně odlišné v porovnání se skupinou homozygotů pro HH. Statisticky významné změny v této skupině oproti skupině homozygotní zahrnovaly kromě výše uvedených také u saturace železa a TAG viz tabulka č. 6.

U „kontrolní“ skupiny se vyskytovaly diagnózy: steatóza jater 5 pacientů, alkoholická cirhóza 3 pacienti, ulcerózní kolitida 1 pacient, chronická hepatitida 5 pacientů, portální hypertenze 3 pacienti, nemoc jater NS 11 pacientů, myelodysplastický syndrom 1 pacient a anemie z nedostatku železa 2 pacienti. Všechny tyto stavy, jak je patrné mohou vést k podobným příznakům jako hereditární hemochromatóza. Z tohoto zjištění vyplývá, že jediným skutečně průkazným stanovením diagnózy HH je molekulárně biologické vyšetření mutací genu pro HFE.

Dalším cílem této práce bylo zavedení vyšetřovací metody založené na real-time PCR pro zefektivnění laboratorní diagnostiky hereditární hemochromatózy. Pro tento účel byly použity primery a sondy firmy TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH (Berlin, SRN). Tato firma deklarovala možnost provedení analýzy obou mutací tzv. multiplex-PCR reakcí tzn. současné stanovení obou mutací v jedné kapiláře. Složení master mixu a koncentrace DNA potřebná k analýze byly optimalizovány (viz výsledková část) a analýza byla prováděna na přístroji LightCycler. Ačkoliv byly dodrženy všechny podmínky deklarované firmou, multiplex PCR reakce svou nízkou amplifikací vykazovala neuspokojivé výsledky. Proto jsme se zaměřili na stanovení mutací v singletové podobě, tj. na analýzu každé mutace zvlášť. Tato cesta vedla ke zdárnému výsledku.

Výhody této nové metodiky založené na real time PCR tkví především v úspoře času. Pro srovnání:

Metoda restriční analýzy PCR- RFLP

Izolace DNA	cca	1hod.
PCR reakce		2hod.
Kontrola amplifikace	cca	1hod.
RFLP		3-16 hod.

Detekce na agar.gelu 2hod

Metoda real time PCR

Izolace DNA cca 1hod.

Vlastní analýza společně s detekcí cca 1 hodina.

Další nespornou výhodou je omezení možnosti kontaminace a eliminace lidské chyby jak při manipulaci se vzorky, tak při odečtu výsledků vyšetření.

VII. Závěry bakalářské práce

- 1) Byla zavedena vyšetřovací metoda založena na real time reakci, která přinesla zefektivnění vyšetření mutací HH.

- 2) Vyhodnocením dostupných výsledků biochemických vyšetření při stanovení diagnózy hereditární hemochromatózy bylo zjištěno, že tyto

hodnoty mají pouze informativní charakter a nijak blíže nedefinují ani nepotvrzují tuto diagnózu.

3) Porovnáním výpovědní hodnoty biochemických vyšetření a hodnoty provedených vyšetření molekulárně biologických jsme dospěli k závěru, že jediným spolehlivě průkazným stanovením správné diagnózy u hereditární hemochromatózy je molekulárně biologické vyšetření HFE genu.

VIII. Literatura

1. **Andrews, N.C., Lery, J.R.:** Iron is hot: Update on the pathophysiology of hemochromatosis. *Blod.*, 96, 1998, 6, s. 1845-1851.

2. **Cazzola, M., Cerani, P., Rovati, A.:** Juvenile genetic hemochromatosis clinically and genetically distinct from classical HLA – related disorder. *Blod.*, 1998, 8, s. 2979 – 2981.
3. **Wordwood, M.:** Haemochromatosis : pathological or beneficial. *Med. Wochschr.*, 128, 1998, s. 1925 – 1935.
4. **Lieu, P.T., Heiskala, M., Peterson, P.A., et al.:** The roles of iron in health and disease. *Mol. Aspects. Med.*, 2001, 22, s. 1 – 87.
5. **Conrad, M.E., Umbreit, J., Moore, E. G.:** Iron absorption and transport. *Am. J. Med. Sci.*, 1999, 318, s. 213 – 229.
6. **Mc Kie, A. T., Barrow, D., Latunde-Doda, G. O., et al.:** An iron – regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science.*, 2001, 291, s. 482 – 488.
7. **Gunshin, M., Mackenzie, B., Berger, U. V., et al.:** Cloning and characterization of mammalian proton-coupled metal-iron transporter. *Nature.*, 1997, 388, s. 482 – 488.
8. **Donovan, A., Brownlie, A., Zhou, Y., et al.:** Positional cloning of zebrafish ferroportin 1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature.*, 2000.
9. **Morgan, E. H., Oates, P. S.:** Mechanisms and regulation of intestinal iron absorption. *Blood. Cells. Mol. Dis.*, 2002, 29, s. 384 – 399.
10. **Lee, P. L., Ho, N. J., Olson, R., et al.:** The effect of transferrin polymorphism on iron metabolism. *Blood. Cells. Mol. Dis.*, 1999, 25, s. 374 – 379.
11. **West, A. P., Bennet, M. J., Sellers, V. M., et al.:** Comparison of the Interactions of transferrin receptor and transferrin receptor 2 with transferrin and hereditary hemochromatosis protein HFE. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, s. 38135 – 38138.
12. **Andrews, N. C.:** Iron metabolism: iron deficiency and iron overload. *Annu. Rev. Genomics. Hum. Genet.*, 2000, 1, s. 75 – 98.
13. **Arosia, P., Levi, S.:** Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage. *Fred Rsdic. Mol. Bio. Med.*, 2002, 33, s. 457 – 463.

14. **Knutson, M., Wessling-Resnick, M.:** Iron metabolism in the reticuloendothelial system. *Cri.Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 2003, 38, s. 61 – 88.
15. **Mc Kie, A. T., Marciani, P., Rolfs, A., et al.:** A novel duodenal iron regulated transporter, IREG 1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol. Cell.*, 2000, 5, s. 299 – 309.
16. **Canonne-Hergaux, F., Gruenheid, S., Ponka, P., et al.:** Cellular and subcellular localization of the Nramp 2 iron transporter in the intestinal brush border and regulation by dietary iron. *Blood.*, 1999, 93, s. 4406 – 4417.
17. **Fletcher, L. M., Halliday, J. W.:** Haemochromatosis: understanding the mechanism of disease and implications for diagnosis and patient management following the recent cloning of novel genes involved in iron metabolism. *J.Intern.Med.*, 2002, 251, s. 181 – 192.
18. **Lebron, J. A., Bennett, M. J., Vaughn, D. E., et al.:** Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterisation of its interaction with transferrin receptor. *Cell.*, 1998, 93, s. 111 – 123.
19. **Krause, A., Neitz, S., Marget, H. J., et al.:** LEAP – 1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett.*, 2000, 480, s. 147 – 150.
20. **Park, C. H., Valore, E. V., Waring, A. J., et al.:** Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J.Biol. Chem.*, 2001, 276, s. 7806 – 7810.
21. **Feder, J. N., Gnirke, A., Thomas, W., et al.:** A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat. Genet.*, 1996, 13, s. 399 – 408.
22. **Baynes, R. D., Bukofzer, G., Bothwell, T. H., et al.:** Iron metabolism in normal and hemochromatotic macrophages. *Amer. J. Hematol.*, 1989, 31, s. 21 – 25.
23. **Mc Nab, A. A., Mc Kelvie, P.:** Iron overload is a risk factor for zygomycosis. *Arch. Ophthalmol.*, 1997.

24. **Vadillo, M., Cobella, X., Pac, V., et al.:** Multiple liver abscesses due to *Yersinia enterocolitica* disclose primary hemochromatosis: three case reports and review. *Clin. Infect. Dis.*, 1994, 18 (6), s. 938 – 941.
25. **Burke, W., Thomson, E., Khoury, M. J., et al.:** Hereditary hemochromatosis: gene discovery and its implications for population – based screening. *JAMA.*, 1998, 280 (2), s. 172 – 178.
26. **Feder, J. N., Tsuchihashi, Z., Irrinki, A., et al.:** The hemochromatosis founder mutation in HLA – H disrupts Beta2 – microglobulin interaction and cell surface expression. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, s. 14025 – 14028.
27. **Feder, J. N., Penny, D. M., Irrinki, A., et al.:** The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity complexes the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1998, 95, s. 1572 – 1477.
28. **Mura, C., Reguenes, O., Ferec, C.:** HFE mutation analysis in 711 hemochromatosis probands: evidence for S65C implication in mild form of hemochromatosis. *Blood.*, 1999, 93, s. 2502 – 2505.
29. **Žďárský, E., Horák, J., Stříteský, J., Heirler, F.:** Stanovení frekvence C282Y mutace pro populaci České republiky a citlivá detekce hemochromatozy z Guthrie karet., *Čas Lék.čes.*, 1999,138, s. 497 – 499.
30. **Datz, C., Lalloz, M. R. A., Vogel, W., et al.:** Predominance of the HLA – H Cys 282 Tyr mutation in Austrian patients with genetic hemochromatosis., *J. Hepatol.*, 1997, 27, s. 773 – 779.
31. **Niederan, C., Niederan, C. M., Lange, S., et al.:** Screening for haemochromatosis and iron deficiency in employees and primary care patients in western Germany., *Ann. Intern. Med.*, 1998, 128, s. 337 – 345.

32. **Bulaj, Z. J.:** Clinical and biochemical abnormalitis in people heterozygous for hemochromatosis., *New Engl. J. Med.*, 1996, 355, s. 1799 – 1805.
33. **Merryweather Clarke, A. T., Pointon, J. J., Shearman, J. D., Robson, K. J.:** Global prevalence of putative hemochromatosis mutations., *J. Med. Genet.*, 1997, 34, s. 275 – 278.
34. **Čimburová, M., Půtová, I., Provazníková, H., Horák, J.:** Hereditary hemochromatosis – the detection of C282Y and H63D Mutations in HFE gene by means of Guthrie cards in population of the Czech Republic., *Genet. Epidemiol.*, 2002, 23, s. 260 – 263.
35. **Bulaj, Z. J.:** Clinical and biochemical abnormalities in people heterozygous for hemochromatosis., *New Engl. J. Med.*, 1996, 355, s.1799 – 1805.
36. **Niderau, C., Fischer, R., Sonneberg, A., et al.:** Survival and causes of death in cirhotic and in non cirhotic patients with primary hemochromatosis. *New Engl. J. Med.*, 1985, 313, s. 1256.
37. **Francanzani, A. L., Conte, D., Frangueli, M., et al.:** Increased cancer risk in cohort of 230 patients with hereditary hemochromatosis in comparison to matched control patients wit non-iron-related chronic liver disease., *Hepatology.*, 2001, 33, s. 647-651.
38. **Niderau, C., Fischer, R., Sonneberg, A., et al.:** Survial and causes of death in cirrhoti and in non-cirrhotic patients with primary hemochromatosis., *New Engl. J. Med.*, 1985, 313, s. 1256.
39. **Bonkovsky, H. L., Troy, N., McNeal, K., et al.:** Iron and development and progression of chronic hepatitis., *C. J. Hepatol.*, 2002, 37, s. 848 – 854.