

30. Poruchy enzymů červené krvinky

Jaroslav Čermák

Červená krvinka má 2 základní systémy, jimiž získává energii. Anaerobní glykolýza (Krebsův cyklus) slouží k tvorbě makroergních fosfátů (ATP), aerobní glykolýza (pentózový cyklus) produkuje NADPH, jenž je důležitým kofaktorem oxidačně-redukčních reakcí a má zásadní význam pro udržení hemoglobinu, enzymů a membránových proteinů v redukovaném, tj. funkčním stavu. Nejčastěji postiženými enzymy jsou Krebsově cyklu pyruvát kináza, vzácněji pak hexokináza, v pentózovém cyklu pak glukózo-6-fosfát dehydrogenáza.

30.1. Deficit pyruvát kinázy (PK)

30.1.1. Úvod

PK je posledním enzymem v cyklu anaerobní glykolýzy a katalyzuje přenos fosfátové skupiny z fosfoenolpyruvátu na ADP, výsledkem je tvorba ATP, základního energetického zdroje erytrocytu. Tvorba PK je kódována PKLR genem, lokalizovaným na chromozómu 1 a ve své aktivní formě tvoří homotetramer složený ze dvou R (erytrocytární) a L (jaterní) podjednotek. Deficit PK je autosomálně recesivní onemocnění vznikající buď u homozygotů s postižením obou podjednotek stejného typu (závažnější průběh s <25 % aktivity PK) či u dvojitých heterozygotů s postižením vždy jedné z obou podjednotek (40-60 % reziduální aktivity PK) /1/.

30.1.2. Základní diagnostická a diferenciálně diagnostická vyšetření

Základními úkoly v diagnostice PK jsou odlišení od jiných typů korpuskulární hemolytické anémie (membránové poruchy – sědičná sférocytóza, dědičná eliptocytóza, dědičná stomatocytóza, kongenitální dyserytropetická anémie (CDA) II. typu) a od imunní hemolýzy.

Periferní krev:

- KO + manuální diferenciální rozpočet + počet retikulocytů (↓ Hb, ↑ stupeň hemolýzy – ↑ počet retikulocytů 4-11 %, ↓ haptoglobin) vyplavení normoblastů do periferní krve, basofilní tečkování erytrocytů.
- Autohemolýza – neupravuje se po přidání glukózy (na rozdíl od HS) /2/

- EMA test (není snížen)
- Serologická vyšetření
 - jaterní testy + LD (zvýšení přímého a nepřímého bilirubinu), urea, kreatinin, ↑ Fe, ↑ feritin
- Další vyšetření:
 - negativní přímý (DAT) a nepřímý antiglobulinový test – k vyloučení imunní příčiny
 - negativita PNH testů (průtoková cytometrie)
 - vyšetření eflo Hb (k vyloučení hemoglobinopatií)
 - vyloučení jiných příčin neonatálního ikteru (hemolytická choroba novorozenců, anatomická obstrukce žlučových cest, metabolické choroby ovlivňující metabolismus bilirubinu)

Vyšetření ve specializovaných laboratořích:

- Vyšetření enzymatické aktivity PK (spektrofotometricky) – nutná korekce na počet RTC, nevyšetřovat časně po transfuzi erytrocytů
- Molekulárně genetické vyšetření (zjištění genetického defektu jednotlivých podjednotek, prenatální diagnostika, vyloučení mutace *SEC23B* genu u CDA II. typu), vyloučení Gilbertovy choroby/3/. Není přítomna jednoznačná korelace mezi genotypem a fenotypem onemocnění /4/.

Další vyšetření:

- USG břicha (k posouzení velikosti sleziny a event. přítomnosti cholelitiázy)

30.1.3. Léčba

a) Splenektomie a cholecystektomie

Splenektomie částečně zmírňuje anémii u nemocných s deficitem PK (pokles počtu podaných transfuzí je patrný po splenektomii u 90 % nemocných, průměrný vzestup hladiny Hb je 16 g/l) /5/. Cholecystektomie je indikována při přítomnosti cholelitiázy, je indikovaná kombinace cholecystektomie při prokázané litiáze se splenektomií. Přístup ke kombinaci splenektomie s profylaktickou cholecystektomií není jednotný, je však nutno zvážit, že splenektomie

neodstraní u nemocných PK kompletně hemolýzu a cholelitiáza vzniká i po splenektomii u cca 50 % nemocných /5/. Indikací ke splenektomii je u deficitu PK anémie se závislostí na transfuzích, event. masivní splenomegalie /6/. Splenektomie má být provedena až po 5.roce věku, pokud je to možné. Nemocní musí být před splenektomií očkováni (pneumokok, meningokok, hemofilus, chřipka) a dále je jim podávána antibiotická profylaxe během výkonu, a po výkonu. Splenektomie musí být zajištěna podáváním antikoagulancií, podávání nízkých dávek kyseliny acetylsalicylové (Anopyrin v dávce 100mg denně) po splenektomii je indikováno, pokud jsou přítomny další trombogenní rizikové faktory do dosažení poklesu počtu trombocytů $<500 \times 10^9/l$, u nemocných bez dalších rizikových faktorů do dosažení počtu trombocytů $<1000 \times 10^9/l$ /5/. Tzv. parciální splenektomie není u nemocných s PK indikována.

b) Podávání transfuzí erytrocytů

Podávání transfuzí erytrocytů je nutno individualizovat podle tolerance anémie nemocným, schopnosti aktivity a úrovně kvality života, není vždy přítomna korelace s hloubkou poklesu hodnot Hb. Asi 85% dětí s deficitem PK dostává transfuze, s rostoucím věkem se počet transfuzí může snižovat. Jsou podávány deleukotizované přípravky kompatibilní v Rh a Kell fenotypech /7/.

c) Chelatační léčba

Přetížení železem se u nemocných s deficitem PK rozvíjí jednak jeho dodávkou opakovanými transfuzemi /8/, jednak díky chronické anémii spojené s vysokým stupněm inefektivní erytropoézy vedoucí k poklesu hladiny hepcidinu a tím ke zvýšené resorpci Fe z GIT /9/. Léčba perorálními chelátory (deferiprone, deferasirox) je indikována u mladších nemocných již při nárůstu hladiny feritinu nad 500 $\mu g/l$, současně je doporučeno monitorovat nemocné jedenkrát ročně vyšetřením NMR pomocí T2* metody.

d) Mitapivat

Mitapivat (Pyrukynd®) je stimulátor R podjednotky enzymu pyruvát kinázy, což vede ke zvýšení energetických zásob erytrocytu. Jeho podávání v klinických studiích vedlo k dlouhodobému vzestupu hodnot hemoglobinu o více než 10 g/l u více než 50 % nemocných a k redukci počtu podávaných transfuzí /11/. Přípravek byl recentně registrován a je podáván perorálně 2x denně v dávce 5-50 mg podle efektivity léčby.

e) Další léčebné přístupy

- podávání kyseliny listové - 10-20 mg denně, zejména při hemolytické krizi
- prevence osteoporózy (vápník + vitamin D)
- léčba aplastické krize: podávání transfuzí erytrocytů a trombocytů (pokud je třeba), růstové faktory, antibiotická a antimykotická profylaxe, i.v. imunoglobuliny.

Alogenní transplantace krvetvorných buněk /10/ dosud není standardním doporučeným léčebným přístupem

30.1.4. Literatura

- 1) Zanella A, Bianchi P, Fermo E et al.: Molecular characterization of the PK-LR gene in sixteen pyruvate kinase-deficient patients. *Br J Haematol* 2001;113: 43-48
- 2) Bianchi P, Elisa Fermo E, Glader B et al.: Addressing the diagnostic gaps in pyruvate kinase (PK) deficiency : consensus recommendations on the diagnosis of PK deficiency. *Am J Hematol* 2019; 94: 149-161.
- 3) Zanella A, Bianchi P : Red cell pyruvate kinase deficiency : from genetics to clinical manifestations. *Bailiers Best Pract & Clin Res* 2000; 13: 57-81.
- 4) Zanella A, Fermo E, Bianchi P al.: Pyruvate kinase deficiency: the genotype-phenotype association. *Blood Reviews* 2007; 21: 217-231.
- 5) Grace RF, Layton DM, Barcellini W: How we manage patients with pyruvate kinase deficiency. *Br J Haematol* 2019; 184: 721-734.; 111: 924-933.
- 6) Iolascon A, Andolio I, Barcellini W et al.: Recommendations regarding splenectomy in hereditary hemolytic anemias. *Haematologica* 2017; 102: 1304-1313.
- 7) Grace RF, Zanella A, Neufeld EJ et al.: Erythrocyte pyruvate kinase deficiency: 2015 status report. *Am J Hematol* 2015. 909: 825-830
- 8) Zanella A, Berzuini A, Colombo MB et al.: Iron status in red cell pyruvate kinase deficiency: study of Italian Cases. *Br J Haematol* 1993; 83: 485-490.
- 9) Rider NL, Strauss KA., Brown K et al.: Erythrocyte pyruvate kinase deficiency in an old-order Amish cohort: longitudinal risk and disease management. *Am J Hematol* 2011; 86: 827-834.
- 10) Van Straaten S, Bierings M, Bianchi P et al.: Worldwide study of hematopoietic allogeneic stem cell transplantation in pyruvate kinase deficiency. *Haematologica* 2018;103: e82-e86.
- 11) Grace RF, Rose C, Layton DM et al.: Safety and Efficacy of Mitapivat in Pyruvate Kinase Deficiency. *N Engl J Med* 2019; 381, 933-944.

30.2. Deficit glukózo-6-fosfát dehydrogenázy (G6PD)

30.2.1. Úvod

G6PD katalyzuje reakci, při níž redukuje nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (NAD) na NADPH. NADPH slouží k redukci oxidované formy glutathionu zpět na redukovanou formu. Oxidace glutathionu je důležitým ochranným mechanismem před poškozením buňky oxidačními činidly, zejména udržuje v redukovaném stavu hemoglobin /1/. Gen pro tvorbu G6PD je lokalizován na X chromozómu a jeho deficit se může díky lyonizaci projevit i u žen /2/. Existuje více než 400 biochemických variant enzymu, dle klinických projevů, jež jsou dány především variabilní expresivitou mutace G6PD, se varianty G6PD dělí do 5 tříd, jež se mohou projevovat záchvaty hemolýzy po požití oxidačních činidel či při infektu, mírnou či středně těžkou chronickou hemolýzou či normální aktivitou enzymu /3/.

30.2.2. Základní diagnostická a diferenciálně diagnostická vyšetření

Základními úkoly v diagnostice deficitu G6PD jsou odlišení od jiných typů korpuskulární hemolytické anémie (jiné enzymopatie, membránové poruchy, hemoglobinopatie, kongenitální dyserytropetická anémie (CDA) II. typu) a od imunní hemolýzy.

Periferní krev:

- KO + manuální diferenciální rozpočet + počet retikulocytů (↓ Hb, ↑ stupeň hemolýzy – ↑ počet RTC, ↓ haptoglobin), mikrosférocyty, Heinzova tělíska
- EMA test (není snížen)
- Serologická vyšetření
 - jaterní testy + LD (zvýšení přímého a nepřímého bilirubinu, ↑ LD), urea, kreatinin, ↑ Fe, ↑ ferritin
- Další vyšetření:
 - negativní přímý (DAT) a nepřímý antiglobulinový test – k vyloučení imunní příčin
 - vyšetření eflo Hb (k vyloučení hemoglobinopatií)
 - vyloučení jiných příčin neonatálního ikteru (hemolytická choroba novorozenců, anatomická obstrukce žlučových cest, metabolické choroby ovlivňující metabolismus bilirubinu)

Vyšetření ve specializovaných laboratořích:

- Vyšetření enzymatické aktivity G6PD (spektrofotometricky) – nutná korekce na počet retikulocytů, nevyšetřovat v období masivní hemolýzy (nález může být negativní) /4/.
- Test na tvorbu Heinzových tělísek (supravitální barvení briliant-kresylovou modří)
- Molekulárně genetické vyšetření (zjištění genetického defektu, prenatální diagnostika, vyloučení mutace *SEC23B* genu u CDA II. typu), vyloučení Gilbertovy choroby. Není přítomna jednoznačná korelace mezi genotypem a fenotypem onemocnění /3/.

30.2.3. Léčba

a) Chronická hemolýza a neonatální ikterus

- chronická hemolýza – kyselina listová 10-20 mg denně
- neonatální ikterus – observace, fototerapie, výměnná transfuze /5/
- chelatační léčba při známkách přetížení železem

b) Akutní hemolytická krize

- hyperhydratace s forsírováním diurézy
- transfuze erytrocytů

Zásadní je prevence vzniku akutní hemolytické krize (farmaka, chemické látky, akutní infekce) /6/. V tabulce 30.1. je uveden přehled nejdůležitějších látek, které vyvolávají u nemocných s deficitem G6PD hemolýzu a jejichž užití je proto u těchto nemocných kontraindikováno.

Medikace:	Chemické látky:
Chlorpropamid	Sojové boby (favismus)
Dabrafenib	Složky henny
Dapson	Naftalín
Metylénová modř	Fenylhydrazin
Nitrofurantoin, Nitrofurazon, Nifarutel	Isobutyl nitrát, amyl nitrát
Fenazopyridin	
Primachin a tafenočin	
Rasburikáza a peglotikáza	

Tabulka 30.1. Seznam přípravků, které jsou kontraindikovány u nemocných s deficitem G6PD /podle 2, 7, 8/.

Transplantace krvevorných buněk a genová terapie nejsou dosud u deficitu G6PD standardní přístup, stejně jako podávání mitapivatu jako stimulatoru energetických zásob.

30.2.4. Literatura

- 1) Beutler E, Mathai CK, Smith JE: Biochemical variants of glucose-6-phosphate dehydrogenase giving rise to congenital nonspherocytic hemolytic disease. *Blood* 1968;31: 131-150.
- 2) Beutler E: Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a historical perspective. *Blood* 2008;111: 16-24.
- 3) Algur N, Avraham I, Hammerman C et al.: Quantitative neonatal glucose-6-phosphate dehydrogenase screening: distribution, reference values, and classification by phenotype. *J Pediatr* 2012;161: 197-200
- 4) Beutler E, Mitchell M.: Special modifications of the fluorescent screening method for glucose-6-phosphate deficiency. *Blood* 1968;32: 816-818.
- 5) Liu H, Liu W, Tang X, Wang T: Association between G6PD deficiency and hyperbilirubinemia in neonates: a meta-analysis. *Pediatr Hematol Oncol* 2015;32:92-98.
- 6) Salen G, Golfstein F, Haurani F et al.: Acute hemolytic anemia complicating viral hepatitis in patients with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Ann Intern Med* 1967;65: 179.
- 7) Burka ER, Weaver Z 3rd, Marks PA: Clinical spectrum of hemolytic anemia associated with glucose-6-phosphate deficiency. *Ann Intern Med* 1966;64: 817-825
- 8) Kattamis CA, Kyriazakou M, Chaidas S: Favism: clinical and biochemical data. *J Med Genet* 1969;6: 34-41.