

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2025

Kateřina Haislová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Srpkovitá anémie
Bakalářská práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Kateřina Haislová**
Osobní číslo: **C22193**
Studijní program: **B0914P360019 Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Srpkovitá anémie**
Téma práce anglicky: **Sickle Cell Anemia**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

- 1) Vypracujte literární rešerši a podrobnější charakteristiku o onemocnění ?Srpkovitá anémie?.
- 2) Definujte téma z genetického a klinického hlediska.
- 3) Pro vytvoření kompilačního textu využijte elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *NCBI Pubmed*, *ScienceDirect*, *Web of Science*, *Scopus*, apod. Jako zdroje využijte zejména odborné články publikované v recenzovaných zahraničních časopisech.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Lucie Stříbrná, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2024**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2025**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

prof. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2025

Prohlašuji:

Práci s názvem „**Srpkovitá anémie**“ jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 30. 6. 2025

Kateřina Haislová v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Velké poděkování patří vedoucí mé bakalářské práce, Mgr. Lucii Stříbrné, Ph.D. za její odborné vedení, ochotu kdykoliv pomoci a cenné rady při vypracování této práce. Dále bych také chtěla touto cestou poděkovat PhDr. Lukášovi Kolaříkovi, DiS z Oddělení klinické hematologie FN Motol za ochotu sdílet své odborné znalosti.

ANOTACE

Tato práce se zaměřuje na detailní prozkoumání mechanismu vzniku srpkovité anémie a na objasnění, jak heterozygotní stav chrání nositele před fatálními projevy malárie. Cílem je prozkoumat roli, kterou hraje srpkovatění červených krvinek, zajištění přirozené selekce a výhody heterozygotní formy pro přežití v malarických oblastech.

KLÍČOVÁ SLOVA

srpkovitá anémie, hemoglobin S, malárie, heterozygot

TITLE

Sickle cell anemia

ANNOTATION

This work focuses on a detailed examination of the mechanism of sickle cell anemia formation and the clarification of how the heterozygous state protects the carrier from fatal manifestations of malaria. The aim is to explore the role that sickling of red blood cells plays, ensuring natural selection, and the advantages of the heterozygous form for survival in malaria-endemic areas.

KEYWORDS

sickle cell anemia, hemoglobin S, malaria, heterozygote

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK	10
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	11
ÚVOD	12
1 PACIENT ČÍSLO NULA	13
2 HEMOGLOBIN	14
2.1 Složky hemoglobinu	14
2.2 Struktura polypeptidových řetězců	14
2.3 Druhy hemoglobinu	15
2.4 Poruchy syntézy hemoglobinu	16
3 MECHANISMUS VZNIKU SRPKOVITÉ ANÉMIE	17
3.1 Hemoglobin S	17
3.1.1 Struktura a tvorba polymerů HbS	18
3.1.2 Mechanismus polymerizace HbS	19
3.1.3 Delay time v rámci polymerizace hemoglobinu	20
3.2 Patologie srpkovitých erytrocytů	21
3.2.1 Vliv HbS na buněčnou membránu erytrocytů	21
3.2.2 Fosfatidylserin na povrchu srpkovitých erytrocytů	22
3.3 Dědičnost bodové mutace $\beta E6V$	23
3.3.1 Propojení genetiky a fenotypové variability klinických projevů	25
4 KLINICKÉ PROJEVY SRPKOVITÉ ANÉMIE	27
4.1 Bolestivé epizody	28
4.2 Organové poškození	28
4.3 Hemolytická anémie	30
4.4 Komplikace v těhotenství	30
5 SRPKOVITÝ GEN V BOJI S MALÁRIÍ	31
5.1 Malárie	32
5.1.1 Životní cyklus <i>Plasmodia</i>	33
5.1.2 Klinické příznaky malárie	35
5.1.3 Cerebrální malárie	36

6 SELEKČNÍ VÝHODA HETEROZYGOTNÍHO GENOTYPU.....	37
6.1 Zvýšení aktivity hemoxygenázy-1	37
6.2 Cytotoxické T – lymfocyty.....	38
6.3 Snížení schopnosti adheze PRBCs	39
6.4 Fagocytóza PRBCs.....	39
6.4.1 Vliv hladiny kyslíku na vývoj <i>Plasmodia</i>	39
6.4.2 Deficit glukóza – 6 – fosfát dehydrogenázy	40
6.4.3 Imunologická podstata fagocytózy.....	40
ZÁVĚR.....	43
SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY.....	44
ZDROJE PŘÍLOH.....	51
PŘÍLOHY	52

SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obr. 1 – Rozmístění globinových genů na chromozomech 11 (nahore) a 16 (dole) i s přítomnými pseudogeny	15
Obr. 2 – Srpkovité erythrocyty v krevním nátěru.....	17
Obr. 3 – Uspořádání vláken v molekule HbS.....	18
Obr. 4 – Schéma se změnami probíhajícími v erythrocytu obsahujícím HbS.....	23
Obr. 5 – Mapa výskytu jednotlivých haplotypů SCD v oblasti Afriky a Indie	24
Obr. 6 – Krevní obrazy pacienta mužského pohlaví, rok narození 2005	27
Obr. 7 – Mapa výskytu malárie v porovnání se srpkovitým genem a jednotlivými haplotypy	32
Obr. 8 – Formování prstencové formy trofozoitu v krevním nátěru	34
Tab. 1 – Genetické polymorfismy spojené s klinickým projevem SCD	25
Tab. 2 – Vztah mezi srpkovitým genem a výskytem malárie u dětí z oblasti Kampala.....	31

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

CO	oxid uhelnatý
dHbS	deoxygenovaný hemoglobin typu S
GAG	triplet guanin-adenin-guanin
GTG	triplet guanin-thymin-guanin
G6PD	glukóza – 6 – fosfát dehydrogenáza
HbA	adultní, hemoglobin u dospělého jedince
HbA2	typ adultního hemoglobinu
HbC	hemoglobin typu C
HbD	hemoglobin typu D
HbE	hemoglobin typu E
HbF	fetální hemoglobin
HbG	hemoglobin typu G
HbS	hemoglobin typu S v srpkovitých erytrocytech
HO-1	hemoxygenáza-1
IRCs	IRreversible sickle Cells, ireverzibilně deformované srpkovité erytrocyty
PRBCs	Parasite-infected Red Blood Cells, parazitované červené krvinky obsahující <i>Plasmodium</i>
PS	fosfatidylserin
SCD	Sickle Cell Disease, srpkovitá anémie
SCT	Sickle Cell Trait, heterozygotní genotyp
VOC	Vaso-Occlusive Crisis, vaso-okluzivní krize

ÚVOD

Srpkovitá anémie je genetické onemocnění, které je způsobeno bodovou mutací v genu pro hemoglobin, což vede k produkci abnormálního hemoglobinu. V podmínkách nízké hladiny kyslíku dochází k polymerizaci tohoto hemoglobinu, díky které se erytrocyty deformují do typického srpkovitého tvaru, jejich zvýšené rigiditě a náchylnosti k hemolýze, a tím i k anémii.

Zatímco srpkovitá anémie je považována za závažné dědičné onemocnění, které vede k poškození červených krvinek, její výskyt v oblastech subsaharské Afriky, části Indie a Latinské Ameriky není náhodný. V posledních desetiletích se ukázalo, že nositelé tohoto genetického defektu – konkrétně jeho heterozygotního genotypu pro srpkovitý gen – mají paradoxně výhodu, která je chrání před smrtelnými formami malárie. Tento jev, známý jako selekční výhoda heterozygotů, představuje fascinující příklad, jak evoluční tlak infekčních nemocí může vést k adaptacím, které mají vliv na genetickou strukturu populace.

Malárie, způsobená různými parazity rodu *Plasmodium*, je stále jednou z nejzávažnějších infekčních nemocí na světě. V tomto kontextu heterozygotní nositelé srpkovité anémie vykazují zvýšenou odolnost vůči těm nejnebezpečnějším formám malárie, jako je malárie cerebrální a malárie se závažnou anémií. Tato ochrana se však neprojevuje pouze nižšími počty parazitovaných červených krvinek, ale je výsledkem komplexní interakce mezi parazitem a imunitním systémem hostitele.

1 PACIENT ČÍSLO NULA

Walter Clement Noel, který se narodil v roce 1884 v karibské Grenadě, se ve svých 20 letech přestěhoval do Ameriky, aby si splnil svůj sen – stát se zubařem. Po několika letech plných chronických zdravotních problémů, bércových vředů vytvořených během plavby a přetrvávajících respiračních problémech navštívil Noel soukromou nemocnici v Chicagu.

V nemocnici ho přijal internista Ernest Irons a po provedení nátěru periferní krve a mikroskopickém pozorování poznamenal, že Noelovy erythrocyty mají abnormální tvary – podobné tvaru hrušky, nějaké jsou protáhlé a některé malé (protokol o vyšetření Noelovy krve, viz **Příloha 1**). Irons proto projednával tento případ s jeho dohlížejícím lékařem, doktorem Herrickem.

Herrick Noelův případ představil na 25. Národním zasedání Asociace amerických lékařů v roce 1910 a později i s rostoucím počtem podobných případů bylo toto onemocnění pojmenováno jako srpkovitá anémie. Ve 40. letech 20. století byla dostatečně objasněna fyzikální i chemická stránka *hemoglobinu S* a dědičnost srpkovité anémie, proto ji vědec Linus Pauling nazval první molekulární nemocí. Tato diagnóza neovlivnila pouze Noelův život, ale také napomohla otevřít nové rozhledy v genetice a vyšetřování krevních anomálií.

Noel, i přes své onemocnění, dokončil studium zubního lékařství a vrátil se do rodné Grenady, kde v květnu roku 1916 zemřel na astenii ze zápalu plic (Steensma *et al.*, 2010).

2 HEMOGLOBIN

Blutfarbstoff (něm. neboli krevní barvivo) objevil německý lékař a chemik Friedrich Ludwig Hünefeld. Objev popisuje ve své knize „Der Chemismus in der thierischen Organisation“ vydané v roce 1840. Na Hünefeldův objev navázali další dva významní němečtí vědci: Otto Funke a Felix Hoppe-Seyler (Sheftel *et al.*, 2012).

Dnes lze hemoglobin charakterizovat jako metaloprotein, který ve své molekule obsahuje ionty dvojmocného železa. Nachází se uvnitř erytrocytů, kde tvoří přibližně 35 % jejich celkového obsahu a mezi jeho hlavní funkce se řadí transport kyslíku do tkání organismů díky jeho schopnosti reverzibilně vázat kyslík. Dále je hemoglobin důležitý pro regulaci pH krve a také pro transport oxidu uhličitého z tkání. Molekula hemoglobinu disponuje čtyřmi vazebnými místy pro navázání kyslíku, proto může tato jedna molekula navázat až 1,34 ml kyslíku. (Fábryová, 2015).

2.1 Složky hemoglobinu

Hem a polypeptidový řetězec o určité délce aminokyselin tvoří podjednotku hemoglobinu, přičemž jedna molekula hemoglobinu se skládá ze 4 těchto podjednotek. Hemová složka tvoří pouze 4 % celé molekuly hemoglobinu, zbytek (96 %) je tvořen bílkovinnou částí.

Hem je nejvýznamnější porfyrinový derivát. Jeho syntéza probíhá v cytoplazmě a mitochondriích hepatocytů a buněk erytroidní linie v kostní dřeni. Proces syntézy hemu končí inkorporací železnatého kationtu do molekuly protoporfyrinu IX pomocí enzymu ferrochelátázy (Ogun *et al.*, 2023).

Syntéza polypeptidových řetězců začíná po dokončení syntézy molekuly hemu. Probíhá v jádře a cytoplazmě erytroidních prekurzorů procesem transkripce a translace genů. V molekule hemoglobinu jsou přítomny celkem 4 polypeptidové řetězce – vždy jeden pár alfa řetězců a pár jiných než alfa řetězců (beta, A-gama, G-gama, delta, zeta). Polypeptidové řetězce určují druh hemoglobinu (Fábryová 2015; Farid *et al.*, 2023).

2.2 Struktura polypeptidových řetězců

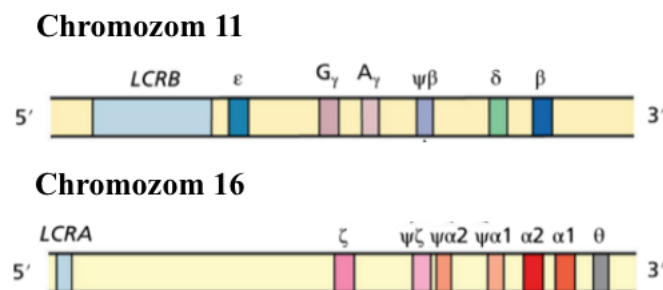
Polypeptidové řetězce jsou složeny z aminokyselin, jejichž pořadí je kódováno strukturálními geny. Podle pořadí a počtu aminokyselin rozlišujeme v lidském těle 6 typů polypeptidových řetězců, rozdělených na 2 chromozomech (Fábryová, 2015), viz **Obr. 1**.

Na chromozomu 16 nalezneme v blízkosti telomery geny pro řetězce alfa (α) a zeta (ζ), alfa genová rodina. Oba řetězce jsou složeny ze 141 aminokyselin, ζ se liší ze 40 % (57 pozic

aminokyselin je odlišných). Odlišnost ζ řetězce se vyskytuje ve strukturálně a funkčně významných místech a způsobuje snížený Bohřův efekt a zvýšenou afinitu ke kyslíku, která je pro embryonální hemoglobiny charakteristická (Clegg *et al.*, 1981; Fábryová, 2015).

Na krátkém raménku chromozomu 11 nalezneme beta genovou rodinu – geny pro řetězce epsilon (ϵ), gama (γ), delta (δ) a beta (β). Všechny řetězce se skládají z 146 aminokyselin. Rozlišujeme dva γ řetězce: GAMA-A (na 136. pozici je alanin) a GAMA-B (na 136. pozici je glycin). Řetězce δ a β se liší z 9,3 % (10 aminokyselin je odlišných) (Fábryová, 2015).

Na obou chromozomech nalézáme tzv. pseudogeny, které se označují řeckým písmenem psi (ψ). Jsou to nefunkční obdoby globinových genů, které sice jsou transkribovány, ale neprojdou fází translace.



Obr. 1 – Rozmístění globinových genů na chromozomech 11 (nahore) a 16 (dole) i s přítomnými pseudogeny (převzato a upraveno podle Bain, 2020)

2.3 Druhy hemoglobinu

Zastoupení fyziologických druhů hemoglobinu se během vývoje plodu a růstu jedince mění. Během embryonálního stádia se hemoglobin vytváří ve žlutkovém vřetku a dochází k produkci embryonálních hemoglobinů. Tyto hemoglobiny mají vyšší afinitu ke kyslíku. Mezi embryonální hemoglobiny řadíme Gower 1, Gower 2 a Portland (Bain, 2020; Perumbeti 2014).

Gower 1 je tvořen dvěma ζ a dvěma ϵ řetězci ($\zeta_2\epsilon_2$). Gower 2 je tvořen dvěma α a dvěma ϵ řetězci ($\alpha_2\epsilon_2$). Oba byly pojmenovány podle názvu londýnské ulice, kde sídlí Fakultní nemocnice. Portland je tvořen dvěma ζ a dvěma γ řetězci ($\zeta_2\gamma_2$). Je pojmenován podle místa svého nálezu (Veřejné vysoké škole v Portlandu) (Bain, 2020; Perumbeti, 2014).

Od 5. týdne nitroděložního vývoje začíná syntéza hemoglobinu ve slezině a játrech. V tomto období narůstá tvorba hlavního hemoglobinu fetální části života – fetálního hemoglobinu (HbF). HbF se skládá ze dvou α a dvou γ řetězců ($\alpha_2^G\gamma_2$ nebo $\alpha_2^A\gamma_2$, podle typu gama řetězce).

Při narození je hladina HbF mezi 50-95 %, v dospělosti by hodnota neměla překročit 1 % (Bain, 2020; Perumbeti, 2014).

Od 20. týdne nitroděložního vývoje přebírá většinu syntézy hemoglobinu kostní dřeň a začíná se tvořit dospělý hemoglobin A (HbA). Rozlišujeme dva typy HbA – HbA₁ a HbA₂. HbA₁ je hlavním hemoglobinem a tvoří 96 – 98 % celkového hemoglobinu v dospělosti. Je tvořen dvěma α a dvěma β řetězci ($\alpha_2\beta_2$). HbA₂ je minoritní hemoglobin, který tvoří maximálně 3,5 % celkového hemoglobinu. Skládá se ze dvou α a dvou δ řetězců ($\alpha_2\delta_2$) (Bain, 2020; Fábryová, 2015).

2.4 Poruchy syntézy hemoglobinu

Změny v genové sekvenci pro syntézu hemoglobinu jsou nejčastější genetickou poruchou na světě a nazýváme je souhrnně hemoglobinopatie. Změny v sekvenci jsou způsobeny ať už bodovými mutacemi (záměnou jednoho nukleotidu), ale i inzercí či delecí části sekvence genů, které kódují α i β genovou rodinu (Kohne, 2011).

Při same-sense bodových mutacích nemá záměna nukleotidu žádný vliv na pořadí aminokyselin v řetězci. Při mis-sense mutaci už ale může jiný nukleotid kódovat zcela odlišnou aminokyselinu, která poté může způsobit tvorbu abnormálního hemoglobinu (např. záměna thyminu za adenin způsobí vznik valinu namísto kyseliny glutamové, což je příčinou tvorby HbS u srpkovité anémie). Dále se mohou objevit non-sense bodové mutace, kdy vzniká stop kodon (může dojít k dřívějšímu přečtení stop kodonu a zastavení transkripce nebo naopak k pozdějšímu přečtení a prodloužení řetězce) (Fábryová, 2015).

Inzerce nebo delece vyvolá posunutí čtecího rámce při translaci, což způsobí syntézu jiných aminokyselin v globinovém řetězci. Stop kodony se tak mohou objevit dříve nebo později a řetězec tak může být kratší nebo naopak delší.

Hemoglobinopatie rozdělujeme na dvě skupiny. První skupinou jsou talasémie, při kterých dochází ke snížené syntéze globinového řetězce – u α -talasémie k snížené syntéze α globinových řetězců, u β -talasémie β globinových řetězců. Do druhé skupiny řadíme onemocnění, která jsou způsobena syntézou abnormálního hemoglobinu a dochází u nich ke strukturální změně hemoglobinové molekuly. Patří sem již zmíněný HbS u srpkovité anémie, HbC, HbE (podobnost s β -talasémií), HbD a HbG (Fábryová, 2015).

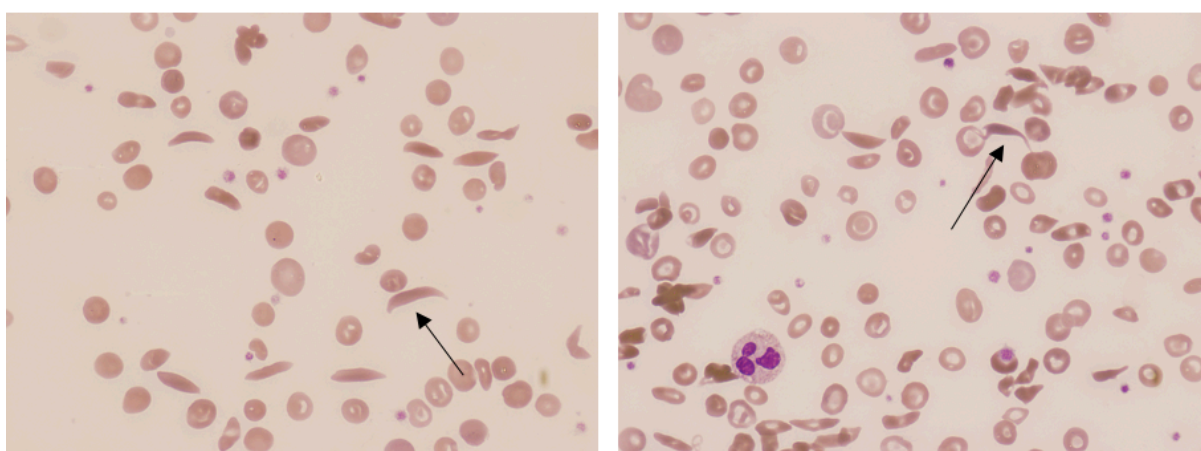
3 MECHANISMUS VZNIKU SRPKOVITÉ ANÉMIE

Srpkovitá anémie byla známa a popisována v afrických komunitách dávno před oficiálním představením Herrickova případu. V západní Africe, místě nejvyššího výskytu, byla onemocnění označována různými názvy – *Abiku*, *Ogbanje* – děti, které přijdou a odejdou. Toto označení souviselo s typickými projevy nemoci (opakované epizody horeček a bolestí, špatný růst s nízkou hmotností a předčasná úmrtí). Dodnes jsou některé komunity ovlivňovány mýty o této nemoci, např., že ji způsobují zlí duchové či špatné chování. Někdy se srpkovitá anémie považuje za nemoc chudých nebo trest od Boha (Egesa *et al.*, 2022).

3.1 Hemoglobin S

Bodová mutace (označovaná jako rs334 nebo $\beta E6V$) na pozici 6. kodonu v β -globinovém řetězci umožní syntézu HbS. Dojde k záměně thyminu za adenin a nový triplet (GTG) tak kóduje valin namísto původní kyseliny glutamové (triplet GAG). Kvůli odlišným vlastnostem těchto dvou aminokyselin má bodová mutace obrovský vliv na strukturu celé hemoglobinové molekuly (Fábryová, 2017).

Kyselina glutamová je hydrofilní, polární aminokyselina s negativním elektrickým nábojem na rozdíl od valinu, který je hydrofobní, nepolární a pozitivně nabitý. Právě hydrofobie valinu narušuje terciární strukturu a stabilitu molekuly hemoglobinu. Díky tomu, že se protein stane hydrofobní, změní se elektrostatická rovnováha a stabilita molekuly hemoglobinu, a tím se zvýší predispozice této podjednotky k agregaci a tvoří se tak nerozpustné polymery. Agregovaný HbS deformuje červené krvinky, snižuje jejich pružnost a způsobuje jejich trvalé poškození a změnu tvaru, která je patrná na **Obr. 2** (Fitzsimmons, *et al.*, 2016; Suhail, 2024).



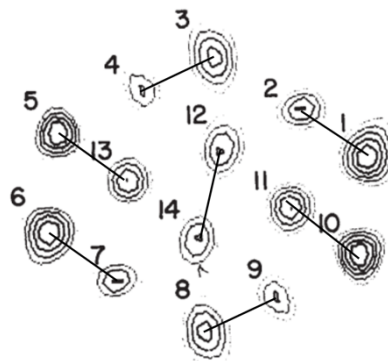
Obr. 2 – Srpkovité erythrocyty (označené černou šipkou) v krevním nátěru, zvětšení 1000x pod imerzí, fotila a pozorovala Kateřina Haislová v mikroskopu Olympus BX53, Fakultní nemocnice v Motole, 2024

Agregovaná forma hemoglobinu se vytváří během deoxygenace, jakmile se z hemoglobinu uvolní kyslík. Když je HbS oxygenovaný, zůstává rozpustný a erytrocyty si udržují svůj charakteristický bikonkávní tvar. Během deoxygenace dochází k odkrytí hydrofobní oblasti, která umožní polymerizaci a změnu tvaru erytrocytů. U homozygotů se tento proces odehrává už při 85% saturaci hemoglobinu kyslíkem, u heterozygotů až při poklesu saturace na 40 % (Fábryová, 2017). Proces srpkovitění se výrazně zrychluje v důsledku opakovaných deoxygenačních cyklů a při zvýšené intracelulární koncentraci HbS (Fitzsimmons *et al.*, 2016).

3.1.1 Struktura a tvorba polymerů HbS

Do agregace HbS se zapojují pouze hemoglobiny v T konformaci, tedy tetramery deoxyhemoglobinu (bez jediné navázané molekuly kyslíku). Tyto tetramery se spojují ve vlákna o průměru 20 nm a vytvářejí kapalné krystaly (Allison, 2002).

Pomocí elektronové mikroskopie byla v roce 1978 objevena struktura agregovaného HbS, jenž se skládá ze 14 pramenů (7 párů), které zaujímají hexagonální uspořádání. Rozlišujeme vnitřní prameny (prameny s číslem 11, 12, 13, 14) a poté prameny vnější, která je obklopují (viz **Obr. 3**). Prameny jsou nejspíše tvořena nejméně z 20 molekul deoxygenovaného hemoglobinu S (Dykes *et al.*, 1978; Williams Jr., 1973).



Obr. 3 – Uspořádání vláken v molekule HbS (převzato a upraveno podle Dykes *et al.*, 1978)

Ke specifické konzistenci a stabilitě HbS přispívají vazebné kontakty mezi jednotlivými vlákny (viz **Příloha 2**). Jakmile dosáhne koncentrace deoxygenovaného hemoglobinu S rovnovážného stavu a netvoří se tedy žádné další polymery, změní se jeho fyzikální vlastnosti a stane se viskózním gelem. Takzvaná krystalová struktura HbS je tvořena směsí 2 fází (kapalná a pevná fáze), které jsou v rovnováze. Pevnou fází tvoří již zmíněná charakteristicky uspořádaná vlákna, kapalná fáze obsahuje jednotlivé molekuly hemoglobinu bez vyšších agregátů. Zajímavé je, že koncentrace HbS v supernatantu po ultracentrifugaci a po sedimentaci vláken nezávislá

na celkové koncentraci HbS ve vzorku. S rostoucí celkovou koncentrací se sice zvýší množství polymerů HbS, ale v supernatantu zůstane koncentrace stále stejná, a právě ta udává rozpustnost, a tedy i stabilitu vláken. Stabilitu vláken také ovlivňuje i teplota – při zvýšení teploty zesílí hydrofobní efekt v celé molekule *hemoglobinu S* a sníží se tak rozpustnost vláken (Creteigny *et al.*, 1993; Eaton, 2020).

3.1.2 Mechanismus polymerizace HbS

Mechanismus samotné polymerizace začíná již při deoxygenaci HbS. V molekule oxygenovaného HbS se nachází pouze jeden solný můstek o délce 2,63 Å. Po deoxygenaci se v molekule dHbS (deoxygenovaný HbS) vytvoří 2 solné můstky, jejichž délka je větší (3,18 Å a 3,22 Å). Solný můstek je elektrostatická interakce, která se vytváří mezi opačně nabitými částmi aminokyselina. V případě SCD se jeden solný můstek tvoří mezi negativně nabitou karboxylovou skupinou kyseliny glutamové na 7. pozici (Glu7) a pozitivně nabitým lysinem na 123. pozici (Lys123) a druhý se utváří mezi kladnou imidazolovou postranní skupinou histidinu na 146. místě (His146) a negativně nabitou karboxylovou skupinou kyseliny asparagové na 94. místě (Asp94). Pro pochopení mechanismu polymerizace se budu zabývat pouze prvním solným můstkem (Glu7-Lys123). Právě prodloužení tohoto solného můstku zeslabuje stabilitu deoxygenovaného hemoglobinu a zvyšuje flexibilitu lokálních oblastí, protože elektrostatické interakce zeslabují s větší vzdáleností (Suhail, 2024).

Díky snížené stabilitě již zmíněného solného můstku se může vytvořit tzv. hydrofobní kapsa z prolinu-valinu-kyseliny glutamové (Pro5-Val-6-Glu7). Celkově je kapsa hydrofobní, protože 2 ze 3 aminokyselin jsou hydrofobní. Tato kapsa interaguje s hydrofobními vazebnými místy na β -řetězci sousední molekuly dHbS, a to konkrétně se zbytky leucinu (Leu88) a fenylalaninu (Phe85). Vazba hydrofobní kapsy s hydrofobními zbytky má dostatečnou afinitu k zahájení polymerizace srpkovitého hemoglobinu, která vede k srpkovatění erytrocytů (Suhail, 2024).

Srpkovitý hemoglobin polymerizuje exponenciálně mechanismem dvojí nukleace – zpočátku se shlukují monomery až vytvoří stabilní jádro neboli nukleus (tento první mechanismus se nazývá homogenní nukleace), takto vytvořené jádro se začne rozrůstat až do polymerového vlákna a na povrchu tohoto vzniklého vlákna se tvoří několik nových malých jader, ze kterých se opět rozrůstají nová polymerová vlákna (heterogenní nukleace). Utváří se již zmíněná hexagonální formace 14 vláken, které se větví do hustých struktur nazývaných domény. S přibývajícím počtem vytvořených vláken se zároveň zvětšuje i plocha pro vznik heterogenních jader, a proto HbS polymerizuje exponenciálně (Ferrone, 2015).

3.1.3 Delay time v rámci polymerizace hemoglobinu

Kinetika polymerizace hemoglobinu S obsahuje jeden charakteristický rys – delay time (doba zpoždění). Ve své podstatě je to latentní období mezi deoxygenací hemoglobinu v erytrocytu a vznikem polymerů HbS. Za fyziologických podmínek dochází k deoxygenaci hemoglobinu postupně. Důsledkem postupné deoxygenace je nedostatek deoxygenovaného HbS k třaskavému nárůstu polymerů a lze tedy uvažovat, že je polymerizace omezena rychlostí deoxygenace krve. Nejkratší čas potřebný pro deoxygenaci erytrocytu je 0,5 sekundy, což je zároveň čas, který erytrocyt potřebuje, aby prošel kapilárou a odevzdal kyslík do tkáně (Ferrone, 2015; Kayar *et al.*, 1994).

Delay time velice úzce souvisí s patofyziologií srpkovité anémie, a to z následujících důvodů. Pokud je delay time delší než doba průchodu erytrocytu kapilárou, nedochází k zachycení červené krvinky v kapiláře. Opačná situace vede k obrovskému nárůstu polymerů právě v kapilárách – nejužších místech cirkulace krve, kde dochází k jejich deoxygenaci. Zároveň je delay time vysoce závislý na koncentraci *hemoglobinu S* v krvi – čím vyšší je koncentrace HbS, tím kratší je delay time a i sebemenší změny fyziologických podmínek u pacienta mohou vyústit v ucpání drobných cév či k silným bolestem a srpkovité krizi (Ferrone, 2015).

Rozlišujeme dva typy doby zpoždění – vlastní a stochastické zpoždění. Vlastní (neboli intrinsická) doba zpoždění je dána samotným exponenciálním průběhem polymerizace. Stochastické zpoždění se projevuje u menších objemů nebo např. v rámci jednoho erytrocytu a vzniká kvůli náhodnému času čekání na vytvoření prvního jádra pro polymerizaci. Aplikuje se, pokud je rychlost homogenní nukleace dostatečně nízká, aby během vlastní doby zpoždění vzniklo jen jedno jádro (Ferrone, 2015).

Podle délky delay time rozlišujeme stavy, které se odehrávají v těle pacienta se srpkovitou anémií. Pokud je delay time dlouhý (více než 15 sekund), je zpoždění polymerizace dostatečné pro návrat erytrocytů do plic, kde se hemoglobin oxiduje a netvoří se žádná patologie. U středně dlouhé delay time (1 – 2 sekundy) sice červené krvinky uniknou z kapilárního řečiště, ale k polymerizaci dochází ve vénách při návratu do plic. I přesto, že nastává rigidita erytrocytů, nedochází k obstrukci žil. Komplikace nastávají, pokud v plicích nejsou zcela rozloženy zbytky polymerů HbS. Tyto zbytky totiž nejen zkracují delay time a urychlují tím polymerizaci při deoxygenaci, ale zároveň úplně odstraní stochastickou část doby zpoždění a umožní okamžitou polymerizaci ihned po částečné deoxygenaci hemoglobinu a v neposlední řadě zvyšují tuhost erytrocytů, jakmile HbS polymerizuje a nabere gelovou konzistenci. Krátká delay time

(pod 1 sekundu) umožňuje polymerizaci erytrocytů ještě v kapilárním řečišti, což způsobuje jejich uvíznutí v mikrocirkulaci a následnou obstrukci (Ferrone, 2015).

3.2 Patologie srpkovitých erytrocytů

Polymerizovaný HbS v erytrocytech nepříznivě ovlivňuje jejich fyziologickou morfolonii. U srpkovité anémie (SCD) mechanicky křehké a hůře deformovatelné erytrocyty přispívají k narušenému průtoku krve. Nedochozí totiž pouze ke změně ve struktuře buněčné membrány erytrocytů, ale HbS rovněž ovlivňuje metabolické dráhy i cytosol uvnitř buněk kvůli jeho schopnosti tvořit volné kyslíkové radikály a tím indukovat oxidační stres. To vše přispívá k mnohonásobně zkrácené životnosti srpkovitého erytrocytů na pouhých 10 – 20 dní z původních 120 dní (Kuypers, 2014).

3.2.1 Vliv HbS na buněčnou membránu erytrocytů

Přítomnost srpkovitého hemoglobinu vede k narušenému transport iontů, změně adhezivních vlastností erytrocytu, a především ke ztrátě membránové asymetrie membránových lipidů, což způsobí expozici fosfatidylserinu (PS) na povrchu. Zajímavostí je, že ne všechny buněčné membrány červených krvinek jsou pozměněny stejně. A protože je populace srpkovitých erytrocytů heterogenní populací, je proto velmi obtížné stanovit přímý klinický vliv HbS na membránu erytrocytů (Kuypers, 2014).

Srpkovité erytrocyty mají zvýšenou adhezi k endoteliálním buňkám a nejvíce k nim adherují v místech s nejpomalejším tokem krve, kterými jsou postkapilární venuly. Po této adhezi nastává další krok, který velmi výrazně přispívá k obstrukci cév. Tyto více adhezivní srpkovité erytrocyty totiž zachytávají tzv. Irreversible Sickle Cells (IRCs, což jsou erytrocyty, které nabývají podoby srpku už i při oxygovaném stavu a nemohou se tak již navrátit do původního bikonkávního tvaru) (Ferrone, 2015; Kuypers, 2014).

K detekci vaskulárních obstrukcí u srpkovité anémie přispívají mikročástice (tzv. membránový prach). Jsou to drobné (velikost do 1 μm) fosfolipidové váčky uvolněné právě z membrány erytrocytů a slouží jako biomarkery spojené se zvýšeným rizikem vzniku trombózy a intravaskulární hemolýzy. Asymetrii fosfolipidové struktury membrány udržují 3 enzymy – flipáza a flopáza (translokázy, flipáza přemisťuje fosfolipidy z vnější strany do cytosolové vnitřní strany membrány a flopáza naopak) a skrambláza (taktéž translokáza, která rovnoměrně redistribuje fosfolipidy mezi oběma vrstvami a ke svému působení vyžaduje aktivaci). Mikročástice vznikají především prostřednictvím působení zmíněných enzymů ve vztahu ke koncentraci vápenatých iontů uvnitř RBC. Zvýšená koncentrace Ca^{2+} iontů aktivuje flopázu

a skramblázu a dochází k přemístění PS na vnější stranu fosfolipidové membrány vlivem flopázy a dále ke ztrátě asymetrie fosfolipidů působením skramblázy. Působením proteáz disociuje ankyrin z vazby na proužek 3 (integrální membránový protein, který se svým N-terminálním koncem váže na deoxygenovaný hemoglobin) a tímto mechanismem se oddělí cytoskelet od membrány. U pacientů se srpkovitou anémií dochází k aktivaci skramblázy, díky které se PS přesune rychleji na vnější stranu membrány a zároveň probíhá inhibice flipázy, takže PS zůstane na vnější straně. Membrána se stává tužší a může vytvářet výběžky, které vedou k tvorbě a uvolnění mikročastic. Riziko membránového prachu spočívá právě v odhaleném fosfatidylserinu, který zvyšuje koagulační stavy a podporuje adhezi erytrocytů na endoteliální buňky (Kuypers, 2014; Rubin *et al.*, 2012).

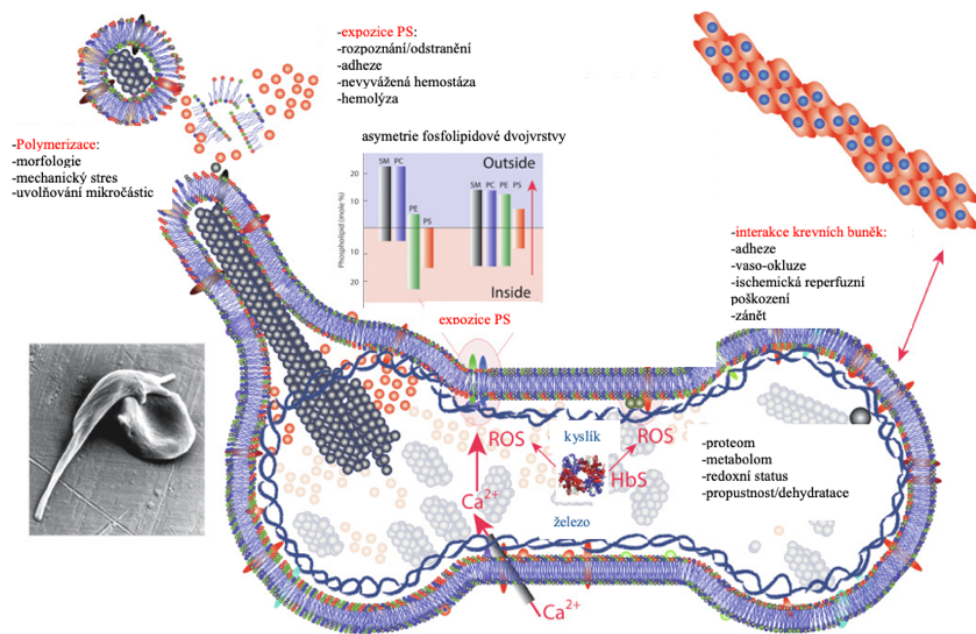
3.2.2 Fosfatidylserin na povrchu srpkovitých erytrocytů

U zdravých červených krvinek signalizuje výskyt fosfatidylserinu (PS) na povrchu buňky zahájení apoptotických procesů. Kromě apoptózy se PS může na povrchu membrány vyskytnout pouze ve výše zmíněném případě – translokace fosfolipidů z vnitřní cytosolové strany fosfolipidové dvojvrstvy na stranu vnější. *In vivo* je zvýšená expozice PS u srpkovité anémie a talasémie. Pomocí průtokové cytometrie a fluorescenčního značení PS bylo prokázáno, že u srpkovité anémie je z celkového počtu erytrocytů pouze 10 % tzv. PS-exponujících. Avšak toto procento se u jednotlivých pacientů může lišit (Kuypers, 2014).

Expozice PS má několik zásadních důsledků na chování erytrocytu. Nejenže napomáhá adhezi na endoteliální buňky, ale fosfatidylserin poskytuje vazebné místo pro faktory srážení krve (zejména aktivované faktory V a X), a tím zvyšuje riziko hyperkoagulace s vaskulárními komplikacemi. Mezi další důsledky patří rozpoznání PS-exponujících erytrocytů bílými krvinkami, které je eliminují a zároveň slouží jako signál makrofágům ve slezině, které je označí a rychle odstraní z oběhu. V neposlední řadě dochází k dehydrataci buňky vlivem ztráty draselných a chloridových iontů, tudíž se buňka zmenší a sníží se pružnost membrány a dále erytrocyt nabývá zvýšené hladiny reaktivních kyslíkových radikálů, což zvyšuje oxidativní stres v buňce (Kuypers, 2014).

Právě přítomnost PS může značit předčasné stárnutí srpkovitého erytrocytu, což by vysvětlovalo jeho zkrácenou životnost a zároveň rozvoj vzniku anémie. PS-exponující erytrocyty můžeme nalézt i v periferní krvi. Jejich přítomnost se projevuje jednak kvůli oslabené funkci sleziny, která snižuje schopnost těla tyto buňky odstranit a zároveň také kvůli tomu, že procesy, které tyto buňky odstraňují mohou být narušeny nebo nestíhají tak velké

množství buněk likvidovat. V návaznosti na úvod této kapitoly je třeba zdůraznit, že právě opakovaná oxygenace a deoxygenace a tedy neustále opakovaná změna tvaru srpkovitých erytrocytů (v závislosti na delay time) naruší lipidovou strukturu fosfolipidové membrány erytrocytu a umožní expozici PS na povrchu membrány, tvorbu mikročastic a následnou adhezi erytrocytů k endoteliálním buňkám společně se zvýšeným rizikem cévní okluze. Všechny tyto mechanismy jsou znázorněny na **Obr. 4** (Kuypers, 2014).



Obr. 4 – Schéma se změnami probíhajícími v erytrocytu obsahujícím HbS (převzato a upraveno podle Kuypers, 2014)

3.3 Dědičnost bodové mutace $\beta E6V$

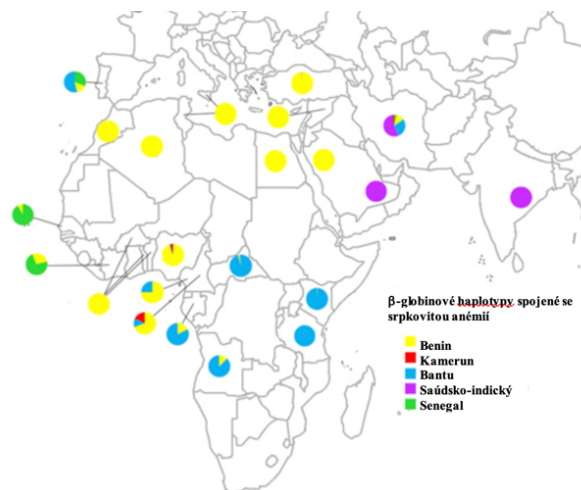
Srpkovitá anémie se řadí mezi autosomálně recesivní onemocnění, kdy se gen pro bodovou mutaci přenáší recesivní alelou. Fenotypově se srpkovitá anémie (tzv. Sickle Cell Disease, SCD) projeví u recesivních homozygotů. Heterozygotní stav se označuje Sickle Cell Trait (SCT) a je formou bez klinického projevu. Zajímavostí na heterozygotním stavu je, že ochraňuje své nositele před smrtelnou formou malárie (Fábryová, 2017).

Mutaci najdeme v genu pro syntézu β -globinového řetězce, který se nachází na 11. chromozomu (11p15.5). Pojem Sickle Cell Disease zahrnuje různé poruchy, jejichž patologie vyplývá z dědičnosti srpkovitého hemoglobinu. Rozeznáváme 3 genotypy, u kterých jedna alela nese mutaci $\beta E6V$, druhá alela nese mutaci jinou: nejčastějším genotypem (cca 70 % případů SCD) je HbS/HbS (srpkovitá anémie), poté HbS/HbC (25 %) a nejméně HbS/ β -talasémie (5 %). Heterozygoti mají genotyp HbA/HbS, protože jedna z alel je

bez mutace a tvoří se dospělý hemoglobin HbA (HbS u nich tvoří zhruba 20 – 40 % z celkového hemoglobinu a toto množství není dostatečné pro vyvolání patologické změny erytrocytů) (Hardouin *et al.*, 2023; Serjeant, 2022).

Ačkoli je srpkovitá anémie monogenně dědičná choroba a vzniká jako následek bodové mutace v jednom genu, její projev ovlivňuje mnoho dalších genetických faktorů. K pleiotropii SCD přispívá např. SNP (bodový polymorfismus), hladina HbF, oxidační stres a v neposlední řadě i rozdílné haplotypy (Hardouin *et al.*, 2023).

Právě haplotypy v β -globinovém řetězci jsou takzvané prognostické faktory, které ovlivňují vývoj onemocnění. Byly objeveny pomocí štěpení DNA na fragmenty prostřednictvím restričních endonukleáz a rozlišujeme 5 haplotypů podle hladiny HbF – vzestupně Bantu, Kamerun, Benin, Senegal a Saúdsko-indický (Hardouin *et al.*, 2023), viz **Obr. 5**.



Obr. 5 – Mapa výskytu jednotlivých haplotypů SCD v oblasti Afriky a Indie (převzato a upraveno podle Gabriel, 2010)

Hladina HbF reguluje schopnost polymerizace deoxygenovaného *hemoglobinu S* různými mechanismy: jednak svou přítomností snižuje koncentraci samotného HbS, ale především zabraňuje jeho polymeraci prostřednictvím inkorporace γ řetězců do struktury molekuly hemoglobinu. Nositelé haplotypů s vyšší hladinou fetálního hemoglobinu, tedy Senegal a Saúdsko-indický, mají v genu HBG2 (kódující γ -globinové řetězce) přítomen polymorfismus restričního místa Xmn1 (rs7482144), kde dochází na 158. pozici genu k záměně C za T, která způsobuje nejen vyšší hladinu HbF, ale i zvýšené množství celkového hemoglobinu a zvýšený počet retikulocytů v periferní krvi. Naopak u haplotypu Bantu, který obsahuje nejméně fetálního hemoglobinu, tento polymorfismus nenajdeme. Tento rozdíl způsobuje mimo jiné právě mnohem závažnější a těžší průběh srpkovité anémie u pacientů s Bantu haplotypem.

Hladiny fetálního hemoglobinu u haplotypů průměrně dosahují následujících hodnot – Saúdsko-indický 30,3 %, Senegal 15,2 %, Kamerun a Benin 7 %, Bantu 5 %, což je oproti fyziologickému necelému 1 % zásadní rozdíl (Akinsheye *et al.*, 2011; Hardouin *et al.*, 2023; Lakkakula *et al.*, 2023; Serjeant, 2022).

3.3.1 Propojení genetiky a fenotypové variability klinických projevů

K bližšímu porozumění a objasnění fenotypové variability tohoto onemocnění se relativně v nedávné době začaly provádět genetické asociační studie, které jsou založené na analýze kandidátních genů. Kandidátní geny jsou takové geny, jejichž profil (funkce nebo i umístění v genomu) naznačuje, že by se potenciálně mohly podílet na vzniku nemoci či biologického procesu. Následující **Tab. 1** zahrnuje genetické polymorfismy, které mohou být spojeny s určitým klinickým projevem SCD. Efektní alela má vliv na průběh onemocnění a je statisticky spojena se změnou určitého znaku, neefektní alela neprokazuje žádnou významnou souvislost se studovaným znakem (Steinberg, 2009; Tsukahara *et al.*, 2024).

Tab. 1 – Genetické polymorfismy spojené s klinickým projevem SCD (převzato a upraveno podle Tsukahara *et al.*, 2024)

klinický projev	lokus	gen	SNP	efektní alela	neefektní alela
hladiny HbF	2p16.1	BCL11A	rs1427407	T	G
	15q14	EMC7	rs766432	C	A
akutní hrudní syndrom	15q26.1	IDH2	rs79915189	C	G
epizody bolesti	2p25.1	ASAP2	rs62118798	A	G
	5q35.1	SLIT3	rs71605708	C	T
	15q26.1	ZNF710	rs62020555	C	T
	15q26.3	LRRK1	rs117797325	T	C
vaso-okluzivní krize	2p25.1	ASAP2	rs62118798	A	G
	15q26.1	ZNF710	rs62020555	C	T
	15q26.3	LRRK1	rs11797325	T	C

Výsledky této studie jsou bohužel zatím pozorovány pouze v relativně krátkém časovém úseku, nicméně do budoucna mají genetické asociační studie nesmírný potenciál. Díky jejich výsledkům se mohou identifikovat geny a dráhy, které lze terapeuticky ovlivnit; (ideální by bylo jejich využití již v prenatálním období pro vytvoření celoživotní personalizované léčby) (Tsukahara *et al.*, 2024).

4 KLINICKÉ PROJEVY SRPKOVITÉ ANÉMIE

Homozygotní stav srpkovité anémie je charakteristický třemi zásadními projevy – bolestivé epizody, progresivní orgánové poškození a chronická hemolytická anémie. Tomuto klinickému obrazu odpovídají i samotné laboratorní nálezy. V krevním obraze pacientů je prokazatelná snížená hladina hemoglobinu, několikanásobně zvýšený počet retikulocytů (známka aktivní snahy kostní dřeně o regeneraci po hemolýze) a v neposlední řadě také zvýšený počet leukocytů a trombocytů v důsledku chronického zánětu a aktivace endotelu. V krevním nátěru lze kromě srpkovitých erytrocytů (drepanocyty) pozorovat anizocytózu a anizochormii erytrocytů, tzn. jejich nestejnou velikost a zabarvení anebo také Howell-Jolyho tělíska. Tyto nálezy se shodují i s výsledky krevních obrazů tehdy dvanáctiletého pacienta Fakultní nemocnice v Motole, kde byl v roce 2017 vyšetřen (jednotlivé krevní obrazy byly provedeny 2. a 3. 5. 2017) (Ballas *et al.*, 2018), viz **Obr. 6**.

Krevní obraz (plná krev):				Diferenciál - analyzátor (plná krev):			
WBC	* 24.5	x10 ⁹ /l	[]*	4.5-13.5	Diferenciál	\	
RBC	* 2.61	x10 ¹² /l	*[]	4.00-5.20	Lymfocyty	* 0.202	-- [*]
HGB	* 78	g/l	*[]	115-155	Monocyty	* 0.151	-- [*]
HCT	* 0.219	l/l	*[]	0.350-0.450	Neutrofilly	0.624	-- [*]
MCV	83.9	fl	[*]	77.0-95.0	Eozinofily	0.012	-- [*]
MCH	29.9	pg	[*]	25.0-33.0	Bazofily	0.004	-- [*]
MCHC	356.2	g/l	[*]	310.0-370.0	IG	* 0.007	-- [*]
RDW	* 26.1	%	[]*	11.5-14.5	Neutrofilly#	* 15.280	x10 ⁹ /l [*]
PLT	* 604	x10 ⁹ /l	[]*	150-450	Eozinofily#	0.290	x10 ⁹ /l [*]
MPV	9.9	fl	[*]	7.8-11.0	Bazofily#	0.090	x10 ⁹ /l [*]
PCT	* 0.600	%	[]*	0.120-0.350	IG#	* 0.160	x10 ⁹ /l [*]
PDW	10.4	fl	[*]	9.0-17.0	Lymfocyty#	4.940	x10 ⁹ /l [*]
P-LCR	23.3	%	[*]	15.0-35.0	Monocyty#	* 3.690	x10 ⁹ /l [*]
NRBC	* 1.1	%	[]*	0.0-0.0	NRBC#	* 0.280	x10 ⁹ /l [*]
Komentář: anisocytosa, poikilocyty, anisochromie, terčovitě erytrocyty, Howel - Jollyho tělíska, četné drepanocyty							

Krevní obraz (plná krev):				Diferenciál - analyzátor (plná krev):			
WBC	* 15.5	x10 ⁹ /l	[]*	4.5-13.5	Diferenciál	\	
RBC	* 3.35	x10 ¹² /l	*[]	4.00-5.20	Lymfocyty	0.261	-- [*]
HGB	* 98	g/l	*[]	115-155	Monocyty	* 0.151	-- [*]
HCT	* 0.276	l/l	*[]	0.350-0.450	Neutrofilly	0.554	-- [*]
MCV	82.4	fl	[*]	77.0-95.0	Eozinofily	0.027	-- [*]
MCH	29.3	pg	[*]	25.0-33.0	Bazofily	0.004	-- [*]
MCHC	355.1	g/l	[*]	310.0-370.0	IG	0.003	-- [*]
RDW	* 20.9	%	[]*	11.5-14.5	Neutrofilly#	8.570	x10 ⁹ /l [*]
PLT	* 575	x10 ⁹ /l	[]*	150-450	Eozinofily#	0.420	x10 ⁹ /l [*]
MPV	10.0	fl	[*]	7.8-11.0	Bazofily#	0.060	x10 ⁹ /l [*]
PCT	* 0.570	%	[]*	0.120-0.350	IG#	* 0.050	x10 ⁹ /l [*]
PDW	11.2	fl	[*]	9.0-17.0	Lymfocyty#	4.040	x10 ⁹ /l [*]
IPF	3.1	%	[*]	2.0-9.0	Monocyty#	* 2.340	x10 ⁹ /l [*]
P-LCR	24.6	%	[*]	15.0-35.0	NRBC#	* 0.190	x10 ⁹ /l [*]
NRBC	* 1.3	%	[]*	0.0-0.0			
RET#	* 21.96	%	[]*	0.98-1.94			
RET#	* 735.7	x10 ⁹ /l	[]*	42.0-70.0			
RET-IRF	* 18.10	%	[]*	2.40-17.50			
RET-LFR	* 81.9	%	[*]	89.4-99.5			
RET-MFR	12.2	%	[*]	1.8-14.4			
RET-HFR	* 5.9	%	[*]	0.0-2.4			
RET-HGB	28.0	pg	[*]	28.0-36.0			

Obr. 6 – Krevní obrazy pacienta mužského pohlaví, rok narození 2005 (poskytnuto z Fakultní nemocnice v Motole, laboratorní vyšetření provedla Ing. Bc. Rusková Markéta, mikroskopicky hodnotila Urbánková Kateřina), 2017

4.1 Bolestivé epizody

Bolestivé epizody se klasifikují na akutní a chronické. Tato kapitola pojednává o vaso-okluzivní krizi (VOC), která se řadí mezi akutní bolestivé epizody a dále jedné významné chronické bolesti – osteonekróze.

Jako vaso-okluzivní krize je definována nově vzniklá bodavá a ostrá bolest, která trvá nejméně 4 hodiny. Dochází k blokadě cév srpkovitými erytrocyty, která vede ke tkáňové hypoxii a vyvolává zánětlivou odpověď. Je to hlavní příčina akutní bolesti, která u pacientů vyžaduje lékařskou péči. K léčbě VOC se podávají parenterální opioidy nebo ketorolak a jiná protizánětlivá léčiva. Mezi hlavní místa působení VOC u dospělých patří břicho, hrudník, záda (převážně bederní oblast), klouby a dlouhé kosti, u batolat je typická bolest v oblasti rukou a nohou, kde způsobuje infarkty, což se projevuje daktylitidou (hand-foot syndrom). Samotná příčina VOC není známá, ale mezi často se vyskytující spouštěče se řadí dehydratace, alkohol a stres nebo i např. dehydratace a menstruační cyklus u pacientek ženského pohlaví. Během VOC klesá hladina hemoglobinu a zvyšuje se počet retikulocytů (tzv. hyperhemolýza) a klesá deformabilita erytrocytů, závažnější důsledky mohou vést k akutnímu selhání orgánů až smrti (Ballas *et al.*, 2018; Tanabe *et al.*, 2019).

Osteonekróza (neboli avaskulární nekróza) vzniká, jestliže se přeruší přívod krve do kostní tkáně. Zastavení přívodu krve může být u pacientů zapříčiněno již zmíněnou vaso-okluzivní krizí, která tak způsobí trombózu, infarkt a následně nekrózu kostní tkáně. Z důvodu zvýšené náchylnosti srpkovatění erytrocytů a omezenému zásobování krví koncovými arteriálními větvemi jsou nejčastější lokací osteonekrózy kostní dřev v hlavici stehenní nebo pažní kosti a těla páteřních obrátů. Zajímavostí je, že s osteonekrózou se do 30 let věku setkalo 15 % pacientů se srpkovitou anémií, z nichž čtvrtina musela v pozdějších letech života dokonce podstoupit náhradu kyčelního kloubu. Pokud není osteonekróza ortopedicky sledována ani nijak jinak zachycena, může způsobit trvalé abnormality chůze a rozdíly v délce končetin a omezit tak mobilitu pacienta (Ballas *et al.*, 2018; Tanabe *et al.*, 2019).

Mezi bolestivé epizody můžeme dále zařadit priapismus a akutní hrudní syndrom.

4.2 Orgánové poškození

U pacientů srpkovité anémie je zasažena celá řada orgánů a také imunitní systém.

Pacienti mají oslabenou imunitu a jsou proto náchylnější k infekcím, které jsou hlavní příčinou úmrtí pacientů (nejčastěji je zvýšené riziko pro pneumonie, meningitidy a sepse).

Kvůli poškozené funkci sleziny mají zvýšenou vnímavost k bakteriím s polysacharidovým pouzdrem (např. *Streptococcus pneumoniae* nebo *Staphylococcus aureus*) a kvůli častému přetížení organismu železem vlivem krevních transfuzí dochází k abnormalitám v imunitě B-lymfocytů a organismus není schopen zpracovávat bakteriální antigeny. Infekce je častým spouštěčem VOC, a proto u pacientů se srpkovitou anémií horečka vyšší než 38,5°C vyžaduje okamžité lékařské vyšetření (Ballas *et al.*, 2018; Tanabe *et al.*, 2019).

Slezina je jeden z prvních zasažených orgánů u SCD. Dochází k tzv. hyposplenismu (snížení funkce sleziny), projeví se už v prvním roce života a progresivně se zhoršuje. Příčinou hyposplenismu je VOC, která blokuje průtok krve slezinou a dochází tak k ischemii, fibróze a postupné atrofii sleziny. Jelikož má slezina několik klíčových funkcí v lidském těle – imunita, cévní regulace a odstraňování starých nebo poškozených erytrocytů, mikroorganismů a cizorodých antigenů v krvi, její poškození proto souvisí se zvýšeným rizikem závažných bakteriálních infekcí. V extrémních případech může dojít až k akutní krizi slezinné sekvestrace, což je život ohrožující rychlé hromadění srpkovitých erytrocytů ve slezině, což způsobí zvětšení sleziny a oběhové selhání. Slezinná sekvestrace se objevuje průměrně ve věku již 1,4 let věku dítěte a je proto často považována za první klinický projev onemocnění (Tanabe *et al.*, 2019).

Prevalence cévních mozkových příhod je lehce přes 4 % u pacientů s SCD. Přesto se pravidelně sledují neurologické funkce pacientů jednak kvůli včasné diagnostice komplikací a zároveň jako prevence mrtvice. Mezi neurologické komplikace postihující pacienty s SCD řadíme: cévní mozkové příhody, tranzitorní ischemickou ataku, tiché mozkové infarkty a neurokognitivní poruchu (Ballas *et al.*, 2018; Tanabe *et al.*, 2019).

Mezi závažné komplikace SCD se také řadí onemocnění ledvin, které může vést až k renálnímu selhání. Nejčastější renální komplikací u pacientů je neschopnost koncentrovat moč, což se projevuje především častým močením, nočním pomočováním a zvýšenou dehydratací. Dále může docházet k hematurii (přítomnost krve v moči) vlivem infekce močových cest. Vlivem zvýšené aktivity kostní dřeně z důvodu anémie lze v moči změřit zvýšenou hladinu kyseliny močové. U pacientů s SCD je důležité pravidelné monitorování funkce ledvin pro včasné zachycení případného ledvinového selhání (Ballas *et al.*, 2018; Tanabe *et al.*, 2019).

V neposlední řadě může docházet k multiorgánovému selhání, tedy dysfunkci alespoň 2 nebo 3 hlavních orgánových systémů. Často k němu dochází několik dní (3-4 dny) po hospitalizaci z důvodu VOC a projeví se náhlým zhoršením stavu pacienta, horečkou, a především poklesem

hladiny hemoglobinu a počtu trombocytů. Multiorgánové selhání se léčí akutní krevní transfuzí, která vede k rychlému obnovení orgánových funkcí (Ballas *et al.*, 2018; Tanabe *et al.*, 2019).

4.3 Hemolytická anémie

Hemolýza významně ovlivňuje projevy i komplikace SCD. Rozpad erytrocytů vede k uvolňování bioaktivních molekul, které podporují rozvoj vážných komplikací, jako je plicní hypertenze, chronické onemocnění ledvin nebo ischemická cévní mozková příhoda (Kato *et al.*, 2017).

Jedním z hlavních důsledků hemolýzy je snížení dostupnosti oxidu dusnatého (NO), který za normálních okolností podporuje vazodilataci. Volný hemoglobin, který se při hemolýze uvolňuje do cirkulace, se váže s NO a inaktivuje se, čímž dochází k vazokonstrikci a oxidačnímu stresu. Dále dochází k uvolnění enzymu argináza-1, který degraduje L-arginin, (substrát pro syntézu NO), čímž dále zhoršuje endoteliální dysfunkci (Kato *et al.*, 2017).

Dalším rizikovým faktorem je uvolněný hem, který aktivuje vrozenou imunitní odpověď a podporuje zánětlivý a proadhezivní stav endotelu. To může vyvolat vaso-okluzivní krizi a akutní plicní poškození. Intravaskulární hemolýza tak způsobuje oxidační stres a podporuje zánětlivé, koagulační a angiogenní procesy, které vedou k remodelaci cévní stěny a zhoršení vaskulární průchodnosti (Kato *et al.*, 2017).

4.4 Komplikace v těhotenství

Těhotenství pacientek s SCD zhoršuje průběh onemocnění. Mnohem častěji se vyskytují vaso-okluzivní krize a zvyšuje se riziko jak plicní embolie, tak preeklampsie (zhoršený vývoj placenty kvůli nedostatečnému prokrvení a okysličení). Kvůli nedostatečnému zásobení placenty vlivem VOC jsou časté potraty nebo předčasné porody. Plod bývá kolem 6. měsíce těhotenství ohrožen nitroděložním růstovým opožděním, což je samo o sobě důvod k předčasnému porodu. Mateřská mortalita se pohybuje okolo 5 – 10 % (Binder *et al.*, 2020)

Samotný porod se doporučuje provést přirozenou cestou, při které plod prochází porodními cestami. U císařského řezu je rodička vystavena zvýšenému riziku infekčních komplikací či krvácení (Binder *et al.*, 2020).

5 SRPKOVITÝ GEN V BOJI S MALÁRIÍ

S přibývajícím počtem případů srpkovité anémie během první poloviny 20. století bylo čím dál těžší objasnit výskyt tak vysoké mutační frekvence srpkovitého znaku erytrocytů. Nebylo zcela jasné, jak může být srpkovitý gen udržován s tak vysokou frekvencí (u mnoha afrických kmenů se frekvence pohybovala mezi 20 až 40 % a u některých indických domorodých skupin až 30 % populace) navzdory vymírání těchto genů v důsledku úmrtí způsobených anémií. Zároveň pacienti zasažení SCD jsou homozygoti a pokud nepředají své geny na potomky, dojde ke ztrátě 2 srpkovitých genů v populaci. Na přelomu 40. a 50. let 20. století se ale vyskytla domněnka, která by mohla zmíněný problém vysvětlit: je zde možnost, že jedinci se srpkovitým znakem mohou mít za určitých podmínek selekční výhodu oproti těm, kteří tento znak nemají (což mimo jiné podporuje i fakt, že srpkovitá anémie se vyskytuje nejvíce v oblastech, kde je rozšířená malárie) (Allison, 1954).

Tuto domněnku podpořili svým výzkumným projektem v roce 1948 Daland a Castle (Daland a Castle, 1948), kteří mapovali četnost parazitů ve skupině 290 dětí (ve věku od 5 měsíců do 5 let) z oblasti kolem hlavního města Ugandy – Kampaly. Výsledky jsou zaznamenány v **Tab. 2**.

Tab. 2 – Vztah mezi srpkovitým genem a výskytem malárie u dětí z oblasti Kampala (převzato a upraveno podle Allison, 1954)

skupina	s parazitemií počet (%)	bez parazitémie počet (%)	celkem počet	mírná hustota parazitů počet (%)	střední až těžká hustota parazitů počet (%)	dominantní druh <i>Plasmodia</i>
se srpkovitým genem	12 (27,9 %)	31 (72,1 %)	43	8 (66,7 %)	4 (33,3 %)	<i>P. malariae</i>
bez srpkovitého genu	113 (45,7 %)	134 (53,3 %)	247	39 (34,5 %)	74 (65,5 %)	<i>P. falciparum</i>

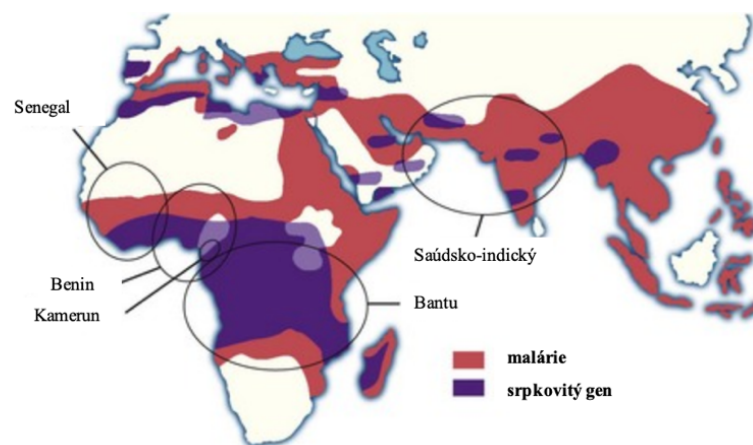
Potvrdilo se tedy, že ve skupině se srpkovitým genem byl výskyt malárie mnohem nižší než ve skupině bez tohoto znaku. Zajímavostí byla ovšem hustota a druh parazitů. U jedinců bez srpkovitého znaku měla třetina (34 %) mírnou parazitémii, u zbytku převažovala střední až vysoká parazitémie. Naopak tomu bylo u jedinců se srpkovitým znakem, kde u 8 z 12 byla prokázána mírná parazitémie. Ze 4 zbylých pacientů, kteří měli střední parazitémii, byli 3 z nich infikováni druhem *Plasmodium malariae* (tento druh je v okolí Kampaly mnohem méně běžný

než *Plasmodium falciparum*). Z tohoto pozorování vyplývá, že srpkovitý gen je účinný především proti *Plasmodium falciparum* na rozdíl od jiných druhů *Plasmodii* (Allison, 1954; Daland a Castle, 1948).

Výše uvedená pozorování zdůrazňují význam hemoglobinu pro *Plasmodia* ve stádiu jejich vývoje v erythrocytech. Je možné, že i erythrocyty obsahující jiné specializované nebo abnormální typy hemoglobinu mohou být vůči malárii odolné. Např. fetální hemoglobin se v mnoha vlastnostech liší od dospělého hemoglobinu, což dokazuje objev z roku 1949 – novorozenci vykazují do konce 2. měsíce života značnou míru rezistence vůči malarické infekci (Allison, 1954; Garnham 2016).

5.1 Malárie

Název malárie pochází z italského mal'aria (neboli špatný vzduch) z doby, kdy nebyl známý původ nemoci. Malárie je nemoc, kterou, jak prokázal italský profesor Grassi, přenášejí komáři rodu *Anopheles*. Místem s největším počtem případů malárie je subsaharská Afrika a dále následuje oblast Afghánistánu, Indie a Indonésie, (viz **Obr. 7**). Podle nejnovějších statistik WHO bylo v oblasti Afriky (nejvíce Nigérie, Demokratická republika Kongo, Niger a Tanzánie) v roce 2023 až 263 milionů případů malárie, z nichž je odhadováno 597 000 úmrtí v důsledku této nemoci (Afrika představovala v roce 2023 až 94 % všech celosvětových případů malárie a 95 % následných úmrtí) (Tuteja, 2007; WHO, 2024).



Obr. 7 – Mapa výskytu malárie v porovnání se srpkovitým genem a jednotlivými haplotypy (převzato a upraveno podle Friedman a Trager, 1981)

Malárie se přenáší kousnutím infikované samice komára rodu *Anopheles*. Parazitě, kteří malárii způsobují jsou eukaryotické jednobuněčné mikroorganismy rodu *Plasmodium*. Za přirozených

podmínek mohou člověka infikovat 4 druhy Plasmodií – *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* a *Plasmodium malariae*. Jednotlivé druhy se od sebe liší především imunologicky, morfologicky, ale také i geografickým rozšířením (Tuteja, 2007).

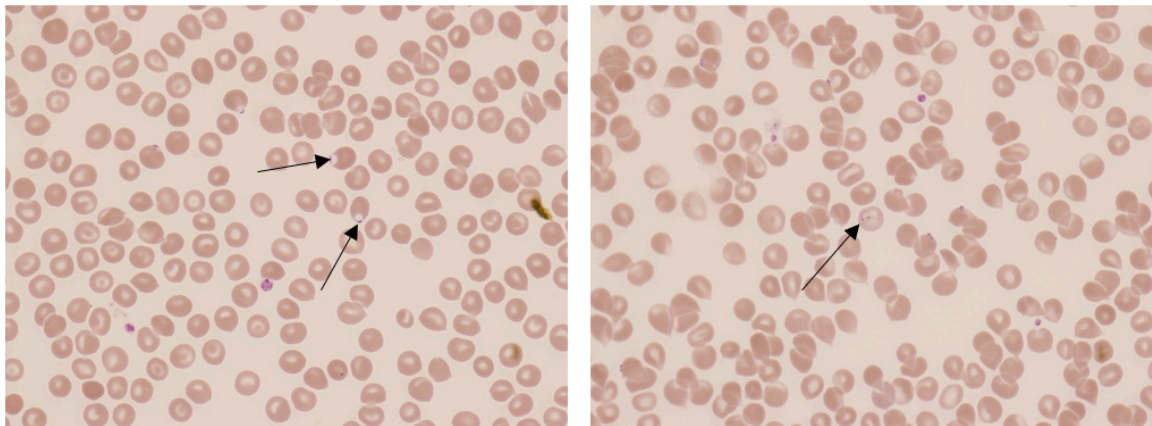
P. falciparum vyvolává závažnou až potenciálně smrtelnou formu malárie a je hlavní příčinou úmrtí na malárii u dětí v Africe. U postižených vyvolává těžkou ztrátu krve a s ní způsobenou anémií. Některé infikované erythrocyty mohou dokonce ucpávat menší krevní cévy, což v oblasti mozku může vyvolat mozkovou malárii, která je smrtelnou komplikací zejména u kojenců. Celosvětově je rozšířený *P. malariae* vyvolávající dlouhodobé infekce, které mohou v těle asymptomaticky přetrvávat i několik desítek let. Nejrozšířenějším, avšak málo smrtelným původcem, je *P. vivax*, naopak nejméně běžným původcem je *P. ovale*, který se vyskytuje primárně v západní Africe (Tuteja, 2007).

5.1.1 Životní cyklus *Plasmodia*

Z infikovaného krevního oběhu hostitele nasává komár gametocyty, které jsou součástí životního cyklu malarického parazita, a které zprostředkovávají přenos malárie. Životní cyklus parazita vyžaduje expresi efektorových proteinů nezbytných k jeho přežití v těle hostitele (pro přežití uvnitř i vně buněk, pro invazi do buněk a v neposlední řadě pro vyhýbání se imunitní odpovědi hostitele). Jelikož se *Plasmodia* řadí do podkmenu Výtrusovců (*Apicomplexa*), je pro ně typická metageneze (střídání pohlavního a nepohlavního rozmnožování). Na konci každé fáze rozmnožování vzniká terminální stádium vývoje prvoka, které je buď infekční pro komára anebo pro člověka (Baker, 2010; Tuteja, 2007).

Po infikování komárem vede k rozvoji malárie a jejích příznaků nepohlavním rozmnožováním parazitů uvnitř jaterních buněk. Sporozoity (terminální stádium vývoje po pohlavním rozmnožování v přenašeči) ze slinných žláz komára rodu *Anopheles* putují krevním oběhem až do jater, kde proniknou do hepatocytů. Specifita sporozoitů k hepatocytům je podmíněna přítomností receptorů pro circumsporozoitový protein v membráně hepatocytů. Tyto receptory se označují jako heparansulfát – proteoglykany a jejich vazba na circumsporozoitový protein probíhá prostřednictvím glykosaminoglykanových řetězců. Zde dochází k jejich zmnožení, tzv. exoerythrocytární schizogonii a každý sporozoit po opakovaném dělení jádra vytvoří několik tisíc merozoitů, které po uvolnění z jater napadají erythrocyty. Doba, po kterou sporozoity setrvávají v hepatocytech, se nazývá prepatentní perioda a liší se v závislosti na druhu *Plasmodia* (u *P. falciparum* je perioda 8 – 25 dní, u *P. malariae* 15 – 30 dní) (Frevort *et al.*, 1993; Tuteja, 2007).

Během putování krevním oběhem do hepatocytů jsou sporozoity před imunitní reakcí hostitele chráněny circumsporozoitovým proteinem. Mechanismus ochrany merozoitů před imunitním systémem hostitele po jejich uvolnění z hepatocytů do krve je složitější. Merozoity se z infikovaných hepatocytů uvolňují ve formě merozomů – balíčků o velikosti 12 – 18 μm obsahujících 100 – 200 merozoitů, které jsou obaleny membránou hostitelského hepatocytu. Membrána merozomu postrádá markery pro fagocytární pohlcování (nedochází k vystavení PS na povrch membrány), což naznačuje, že infikovaný hepatocyt nepodstoupil apoptózu před uvolněním merozomů a zároveň se merozom bez komplikací transportuje skrz Kupfferovy buňky. Merozomy putují krevním oběhem do plic, kde se v plicních kapilárách akumulují a dochází zde k zániku membrány s následným uvolněním merozoitů do krevního oběhu. Merozoity jsou považovány za patogenní stádium *Plasmodia*, které zahajuje klinické projevy malárie, mezi které patří epizody horečky a zimnice (Baer *et al.*, 2007; Tuteja, 2007).



Obr. 8 – Formování prstencové formy trofozoitu (označené černou šipkou) v krevním nátěru, zvětšení 1000x pod imerzí, fotila a pozorovala Kateřina Haislová v mikroskopu Olympus BX53, Fakultní nemocnice v Motole, 2024

Merozoity vstupují do erytrocytů komplexním invazivním procesem, který vyžaduje vysoce specifické molekulární interakce, a proto se právě na tento proces zaměřují výrobní procesy vakcín proti malárii. Uvnitř erytrocytu dochází k nepohlavnímu dělení a vývoji trofozoitu. Na počátku jeho vývoje má charakteristický tvar, který rovněž udává jeho název – prstencová forma (viz **Obr. 8**). Následný vývoj trofozoitu vyžaduje glykolýzu velkého množství importované glukózy, pohlcování cytoplazmy hostitelské buňky a proteolýzu globinové složky hemoglobinu na jednotlivé aminokyseliny. Jelikož je volný hem v krvince pro parazita toxický, je většina uvolněného hemu polymerizována na hemozin (pigment charakteristický pro malarické parazity, který se ukládá ve formě cytoplazmatických granul). Díky několikanásobnému dělení jádra trofozoitu dojde k tvorbě schizontů. Každý schizont obsahuje přibližně 20 merozoitů, které se po lýze erytrocytu uvolní do krevního oběhu a mohou infikovat

další erythrocyty. Typickým příznakem pro tuto životní fázi *Plasmodia* je prudký vzestup tělesné teploty z důvodu zvýšené produkce tumor nekrotizujícího faktoru a jiných cytokinů. Doba, po kterou se v erythrocytu vyvíjí trofozoit, následně schizont a uvolněním merozoitů pro další invazi, se liší u každého druhu *Plasmodia* – u *P. falciparum* trvá jeden tento cyklus 48 hodin, u *P. malariae* až 72 hodin (Pamplona *et al.*, 2007; Tuteja, 2007).

Menšina merozoitů se diferencuje v erythrocytech a tvoří gametocyty nezbytné pro přenos infekce na dalšího hostitele prostřednictvím komárů rodu *Anopheles*. Samotná gametocytogeneze trvá přibližně 10 – 12 dní. Ve středním střevě komára dochází ke splynutí samčí a samičí gamety a vzniká zygota, která se přemění na ookinetu. Ookineta proniká stěnou střevní buňky a vyvíjí se v oocystu. V oocystě vzniká velké množství sporozoitů, které putují do slinných žláz komára a v důsledku komářího štípnutí tak dochází k nákaze dalšího hostitele. Komár je infekční po dobu 1 – 2 měsíců od přítomnosti sporozoitů ve slinných žlázách (Baker, 2010; Tuteja, 2007).

5.1.2 Klinické příznaky malárie

Inkubační doba, během které je pacient bez symptomů nemoci se pohybuje mezi 9 – 40 dny. Poté následuje prodromální stádium s nespecifickými příznaky malárie, mezi které patří bolest hlavy a hrudníku, únava, bolesti kloubů a svalů. Hlavním projevem malárie je horečka, ke které dochází po uvolnění merozoitů do krevního oběhu. Horečka dosahuje u dětí až 40°C. Společně s horečkou se typický malarický záchvat skládá ještě z epizod zimnice a třesu v pravidelných intervalech (48 hodin nebo 72 hodin v závislosti na druhu *Plasmodia*). Průběh malárie doplňuje řada dalších příznaků – průjemy, nevolnost, bledost a splenomegalie. Mohou nastat poruchy v mikrocirkulaci krve doprovázené tkáňovou hypoxií vedoucí k hypoperfuzi orgánů (Basu a Sahi, 2017; Stejskal, 2019).

Těžká malárie jako multisystémové onemocnění způsobuje vážné a často smrtelné komplikace. Její průběh a výsledek závisí na míře dysfunkce orgánů. Nejrizikovější skupinou jsou těhotné ženy a malé děti. Přítomnost parazitů v placentě je spojena s předčasným porodem, nízkou porodní hmotností a zvýšenou novorozeneckou mortalitou. Výhodou je, že si během těhotenství ženy po opakované expozici malárii vyvíjí imunitu, a proto jsou prvoroďičky náchylnější k malárii oproti ženám, které porodily více dětí. U starších dětí se těžká malárie projevuje ve formě záchvatů až po cerebrální formu malárie. U dospělých jedinců dochází navíc ještě k akutnímu selhání ledvin, poruše funkce jater a plicnímu edému (Newton, 2000; Tuteja, 2007).

5.1.3 Cerebrální malárie

Mozková (cerebrální) forma malárie je nejzávažnější komplikací postihující infikované jedince. Tento zánětlivý syndrom, který se může vyvinout během malarické infekce, se projevuje neurologickými poruchami vlivem hyperémie mozkových kapilár a postkapilárních venul parazitovanými červenými krvinkami (PRBCs), erytrocyty bez parazitů a leukocyty. V histologickém preparátu se objevují tzv. rozety, což jsou shluky neinfikovaných erytrocytů obklopující PRBC. Imunohistochemické vyšetření barvení cerebrálních endotelových buněk prokazuje narušení hematoencefalické bariéry, které souvisí s klinickými příznaky tohoto typu malárie. Mezi ně patří křeče (*opistotonus*), abnormální pohyby očí, skřípavé pohyby zubů vlivem silného sevření čelisti, záchvaty, poruchy vědomí až nevratné kóma vedoucí ke smrti (Newton, 2000; Stejskal, 2019).

6 SELEKČNÍ VÝHODA HETEROZYGOTNÍHO GENOTYPU

Genotyp heterozygotů je HbS/HbA, tedy pouze jedna alela děděná po rodičích obsahuje mutaci pro srpkovitý gen. Heterozygotní genotyp je také označován jako Sickle Cell Trait (SCT). Přítomnost HbS u heterozygotů snižuje účinek malarického parazita, a tím poskytuje selekční výhodu, zatímco homozygoti tuto výhodu nemají. Tento jev je nazýván jako balancovaný polymorfismus (Olatunji, 2018).

Selekční výhoda spočívá v relativní ochraně heterozygotů před úmrtím na malárii prostřednictvím biochemických a imunologických mechanismů. Heterozygoti mají prokazatelně menší počet PRBCs v periferní krvi (nízká hladina parazitémie), z čehož lze odvodit nižší výskyt forem těžké malárie (především cerebrální malárie a malárie s těžkou anémií). Ochrana před těžkými formami malárie dále souvisí s faktem, že u heterozygotů vlivem zvýšené srpkovité deformace erytrocytů v prostředí s nízkým obsahem kyslíku nebo sníženou expresí adhezivních proteinů na jejich povrchu je narušena tvorba rozet a nedochází tak k obstrukci mikrocirkulace při cerebrální malárii (Gong *et al.*, 2013; Luzzatto, 2012; Olumese *et al.*, 2016).

PRBCs i srpkovité erytrocyty jsou schopny přilnout k epiteliálním buňkám a zužovat cévy. Vzhledem ke způsobené lokální hypoxii vlivem PRBCs se zvýší anaerobní glykolýza a zároveň s ní i hladina laktátu a tím se rozvine acidóza. Důvodem zvýšené náchylnosti homozygotů k malarické infekci je fakt, že přítomnost parazita v erytrocytech a rozvinutá acidóza napomáhá procesu srpkovatění a s ním spojených komplikací (Olatunji, 2018; Stejskal, 2019).

6.1 Zvýšení aktivity hemoxygenázy-1

Jedním z popsaných mechanismů ochrany heterozygotního genotypu, především v ochraně před cerebrální formou malárie, je rychlejší zvýšení exprese hemoxygenázy-1 (HO-1) vlivem HbS. *Plasmodium* způsobuje rozsáhlou hemolýzu erytrocytů a až 40 % hemoglobinu obsaženého v každém PRBCs může být uvolněno a snadno oxidováno. V roce 1988 bylo navíc prokázáno, že hem se z molekuly oxidovaného HbS uvolňuje 1,7krát rychleji než z HbA. Tento uvolněný volný hem je cytotoxický – pro parazita uvnitř erytrocytu (proto polymerizace na hemozoin), pro hostitele v krevním oběhu. HO-1 reaguje na zvýšenou hemolýzu a zvýšené množství volného hemu a přeměňuje ho na biliverdin, železo a oxid uhelnatý (CO) (Ferreira *et al.*, 2011; Hebbel *et al.*, 1988; Pamplona *et al.*, 2007).

Maximum aktivity HO-1 je dosaženo 6 dní po infekci a dalších 6 dní tato aktivita klesá minimálně. Právě zvýšené množství CO poskytuje ochranu před rozvojem cerebrální malárie,

a to navíc nezávisle na míře parazitémie při infekci. CO se váže na volný hemoglobin a inhibuje jeho oxidaci, čímž zabraňuje uvolňování cytotoxického volného hemu z oxidovaného hemoglobinu. Tímto mechanismem zabraňuje hyperémii mozkových kapilár a společně s ní zabraňuje i narušení hematoencefalické bariéry, díky kterému se rozvíjejí příznaky mozkové malárie. Zvýšená aktivita HO-1 společně s přítomností CO snižuje procento ucpaných mikrovaskulárních cév v mozku z 58 % na 24 % (u pokusů na laboratorních myších) (Ferreira *et al.*, 2011; Pamplona *et al.*, 2007).

CO zároveň inhibuje prozánětlivé cytokiny přispívající ke vzniku a samotné patogenezí cerebrální malárie. Mezi tyto cytokiny patří tumor nekrotizující faktor, lymfotoxin- α a interferon- γ . U všech těchto prozánětlivých cytokinů bylo prokázáno snížení jejich exprese nejméně o 68 % (největší pokles byl zaznamenán u interferonu- γ , konkrétně o 98 %) (Pamplona *et al.*, 2007).

6.2 Cytotoxické T – lymfocyty

Při pokusech na laboratorních myších se ukázalo, že sekvestrace PRBCs v mozku (a tedy přítomnost parazita v endoteliálních mozkových buňkách) spouští kaskádu imunitního mechanismu vyústující v cerebrální malárii (Belnoue *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2011).

Tato kaskáda začíná aktivací endoteliálních buněk v důsledku přítomnosti parazita v mozku. *Plasmodium* silně indukuje produkci prozánětlivých cytokinů (tumor nekrotizující faktor a interferon- γ). Aktivované endoteliální buňky začnou pohlcovat parazitní materiál prezentovaný pomocí molekul MHC třídy I a II, tzv. parazitem odvozené antigeny. Cytotoxické T – lymfocyty poté destruktivně napadají endoteliální buňky, které mají na povrchu přítomny tyto parazitem odvozené antigeny. Lýza endoteliálních buněk je zprostředkována pomocí proteinu perforin, který cytotoxické T – lymfocyty produkují. Perforin a jeho schopnost perforace buněčných membrán endoteliálních buněk způsobí porušení hematoencefalické bariéry a následnou patologii – cerebrální malárii (Belnoue *et al.*, 2002; Potter *et al.*, 2013).

U pacientů s SCT byl zaznamenán snížený celkový počet lymfocytů v periferní krvi. HbS navíc potlačuje aktivaci patogenních cytotoxických T – lymfocytů rozpoznávajících antigeny *Plasmodia*, a tím inhibuje jejich efektorovou odpověď na zvýšené hladiny prozánětlivých cytokinů vlivem zvýšení hladiny volného hemu v séru. Tímto způsobem tak HbS zabraňuje produkci perforinu a narušení hematoencefalické bariéry (Ferreira *et al.*, 2011; Reiner *et al.*, 2025).

6.3 Snížení schopnosti adheze PRBCs

Adherence PRBCs k endotelovým buňkám umožňuje parazitům vyhnout se odstraněním fagocytů ve slezině díky jejich uchycení v cévách. PRBCs totiž na svém povrchu exprimují parazitem kódovaný protein zvaný *Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1*, který umožní adhezi krvinek na endotelové buňky s glykoproteinem CD36. Hlavní komplikací vyvolanou adhezí je aktivace endotelu, která vyvolá zánět v mozku, který je důležitým faktorem v progresi k těžké malárii (Gong *et al.*, 2013; Cho, 2012).

Snížená schopnost PRBCs k adhezi na povrch buněk byla poprvé prokázána u jiné hemoglobinopatie, a to konkrétně u HbC. PRBCs mají redukovanou expresi *Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1* a s ní související nižší schopnost vázat se na endotelové buňky. Zmírněná exprese tohoto proteinu je způsobena poruchami cytoskeletu erytrocytu (konkrétně dochází k narušení reorganizaci aktinu u PRBCs a tím omezenému transportu vezikul s proteinem na povrch membrány). Snížená adheze PRBCs na povrch buněk tak vede k jejich zvýšenému odstranění slezinou a vysvětluje tak nižší hustotu parazitů a nižší výskyt těžkých forem malárie u heterozygotů (Gong *et al.*, 2013).

6.4 Fagocytóza PRBCs

Jakákoli odchylka od fyziologického lidského erytrocytu inhibuje růst *Plasmodia* v této buňce, proto přítomnost HbS zhoršuje jeho podmínky pro přežití. Ochrana před malárií souvisí i s již zmíněnou fyzikální vlastností HbS vytvářet kapalně krystaly při deoxygenaci, a tím zahájit proces srpkovitěho tvarování erytrocytů. Spotřeba kyslíku společně se snížením intracelulárního pH vlivem přítomnosti parazita uvnitř erytrocytu urychluje srpkovitění PRBCs. Ochranu před parazitem zajišťuje fagocytóza srpkovitých infikovaných erytrocytů především prostřednictvím slezinných makrofágů. U SCD není tento mechanismus ochrany umožněn z důvodu hyposplenismu (Friedman, 1978; Luzzatto, 1979).

6.4.1 Vliv hladiny kyslíku na vývoj *Plasmodia*

Hladina kyslíku v infikovaném erytrocytu také ovlivní vývoj parazita. Toto tvrzení podporuje pokus s běžnými fyziologickými kyslíkovými podmínkami v žilní cirkulaci krve. Zde je totiž hladina kyslíku výrazně snížena a atmosféra běžně obsahuje kolem 5 % O₂. Při tak nízké koncentraci kyslíku dochází u většiny heterozygotních (SA) erytrocytů k tvorbě srpků a pro erytrocytární 48hodinový cyklus *P. falciparum* je tato změna tvaru erytrocytu kritická. Dochází ke zpomalení růstu *Plasmodia* z prstencové fáze do zralého trofozoitu. V důsledku toho lze v erytrocytech heterozygotů prokázat jen velmi málo parazitů s fyziologickou

morfologií, protože většina z nich zahyne a je kondenzována. Způsob, jakým dochází k zpomalení růstu *Plasmodia*, je přisuzován teorii inhibice endocytárního procesu příjmu potravy (Friedman, 1978).

Snížením podílu PRBCs infikovaných zralými trofozoity (výše zmíněným mechanismem) zvyšuje heterozygotní genotyp podíl těchto buněk, které jsou zachyceny a následně zničeny fagocytózou ve slezině. Záchyt buněk infikovaných trofozoity ve slezině je zároveň způsobeno sníženou afinitou těchto buněk k endotelu cév a jsou právě zcela zachyceny až ve slezině. Tím dochází k potlačení parazitémie v dalším životním stádiu parazita a zároveň ke zmírnění příznaků malárie (Diakité *et al.*, 2016).

6.4.2 Deficit glukóza – 6 – fosfát dehydrogenázy

Glukóza – 6 – fosfát dehydrogenáza (G6PD) je enzym, který redukuje NADP⁺ na NADPH v pentózovém cyklu, a tím chrání erythrocyty před oxidačním stresem. Právě deficit G6PD, který je geneticky podmíněný, poskytuje ochranu proti těžké formě malárie. Zajímavostí ve vztahu mezi SCD a G6PD je, že pokud v oblastech s výskytem malárie klesá frekvence alely pro srpkovitý gen, zvyšuje se frekvence alely pro deficit G6PD. Proto je SCT významně spojena s vyšší pravděpodobností výskytu deficitu G6PD (Adu *et al.*, 2016; Balgir, 2012).

PRBCs infikované prstencovým stádiem parazita s deficitem G6PD jsou fagocytovány 2,3krát častěji než PRBCs bez deficitu G6PD. U erythrocytů s deficitem tohoto enzymu jsou zvýšené markery fagocytární eliminace (především autologní IgG a fragmenty komplementu C3). Zároveň mají deficitní PRBCs sníženou antioxidační ochranu vlivem nízké hladiny redukovaného glutathionu, díky které může docházet k poškození membrány erythrocytu, jeho *opsonizaci* a následné fagocytóze prostřednictvím monocytů v periferní krvi. Jelikož prstencová stádia *Plasmodia* nejsou pro fagocyty toxické (na rozdíl od již zralých trofozoitů kvůli pigmentu hemozoinu), jejich zvýšené odstranění může zabránit maturaci parazita a efektivně chránit svého nositele před těžkými formami malárie (Cappadoro *et al.*, 1998).

6.4.3 Imunologická podstata fagocytózy

Zvýšená fagocytóza u heterozygotů z uvedených důvodů je způsobena řadou událostí v následujícím pořadí: zvýšený rozpad hemoglobinu, vazba hemichromů a volného železa na membránu, agregace proteinu band 3 a depozice autoprotilátek a fragmentů komplementu C3b. Zvýšená *opsonizace* a odstraňování PRBCs slezinou může vést ke zvýšené prezentaci antigenů a dřívějšímu rozvoji získané imunity ve srovnání s jedinci, kteří nemají mutaci pro HbS.

U heterozygotních stavů byly navíc prokázány snížené hladiny periferních monocytů a dendritických buněk (jak během malárie, tak během zdravého období) nejspíše z důvodu jejich přesunu do sleziny (Ayi *et al.*, 2004; Gong *et al.*, 2013).

Ze zvýšeného rozpadu hemoglobinu vlivem přítomnosti parazita se hromadí hemichrom. Hemichrom je denaturovaná forma methemoglobinu vznikající při oxidačním poškození erytrocytu, který se váže na jeho vnitřní stranu membrány. Právě tato vazba spustí shlukování membránového proteinu band 3 a umožní vazbu autologních IgG protilátek a komplementu, což vede k opsonizaci erytrocytu pro fagocytózu (Bunn, 2013; Hebbel, 2013).

Během nitrobuněčného vývoje *P. falciparum* dochází k významným konformačním změnám membránového proteinu band 3. Tento protein podléhá několika úpravám – dochází ke shlukování membránových částic, oxidativní agregaci a také k odhalení specifické oblasti proteinu, která je v neinfikovaných erytrocytech běžně skryta. Konformační změny mohou být detekovány pomocí omezené proteolýzy trypsinem, která štěpí protein na specifických, povrchově exponovaných místech. Trypsinové štěpení PRBCs odhalilo specifický fragment o velikosti 35 kDa, což svědčí o zpřístupnění skrytého místa v konformaci band 3. Zajímavé je, že míra citlivosti proteinu k trypsinovému štěpení se liší mezi kmeny parazita, což naznačuje, že konformační změny band 3 mohou být závislé na konkrétním kmenu *P. falciparum* a mohou ovlivňovat preferenci vazby infikovaných buněk na různé receptory (např. CD36) (Winograd a Sherman, 2004).

Oblast proteinu band 3, která zahrnuje aminokyseliny 547 – 553, je důležitá pro vazbu infikovaných erytrocytů na endotel. Zároveň se tato oblast překrývá s místy štěpení trypsinem (pozice 551 a 562), což naznačuje, že právě tato část proteinu podléhá změnám, které mohou vést ke zvýšené adhezi parazitovaných buněk a k vyšší reaktivitě s přirozenými IgG protilátkami (Winograd a Sherman, 2004).

Z IgG protilátek dosahují vysokých hodnot pouze protilátky proti proteinu *Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1*, proti jiným parazitickým antigenům nejsou zvýšené hodnoty IgG protilátek prokázány. Tento zvýšený typ protilátek ukazuje na zvýšenou humorální odpověď heterozygotů proti proteinům na povrchu PRBCs. Rychlý nárůst těchto protilátek v nižším věku infikovaného podmiňuje zvýšení ochranného účinku heterozygotů s rostoucím věkem a potvrzuje, že přispívá k lepšímu rozvoji získané imunity (Gong *et al.*, 2013; Taylor *et al.*, 2013; Williams, 2006).

Exprese proteinu *Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1* na povrchu PRBCs zabraňuje aktivaci komplementu, proto zvýšená hladina autologních IgG protilátek proti tomuto proteinu umožní aktivaci komplementu (všech 3 drah – klasické, alternativní a lektinové). Jedním z hlavních způsobů, jak protilátky působí proti merozoitům, je aktivace klasické dráhy komplementového systému. Navázání protilátek na antigenní epitopy na povrchu merozoitů vede k depozici složek komplementu, jako je C1q, a následnému sestavení C3-konvertázy, která urychluje kaskádu vedoucí k *opsonizaci* a případné lýze parazita. Přítomnost C1q na merozoitech silně koreluje s ochranou proti symptomatické malárii, a to nezávisle na titru samotných protilátek. Ochranný účinek této imunologické reakce byl pozorován zejména u dětí žijících v endemických oblastech, kde dochází k postupnému rozvoji imunity díky opakovanému vystavení parazitu. Silná komplement – aktivující odpověď byla asociována s nižším rizikem reinfekce i rozvojem těžké malárie. Navíc byla prokázána schopnost některých protilátek působit synergicky s komplementem při inhibici adheze PRBCs k endotelovým receptorům, což je klíčový krok v patogenezi cerebrální malárie (Korir *et al.*, 2014; Larsen *et al.*, 2019).

Komplementový systém je tak nejen nepostradatelnou součástí vrozené imunity, ale i potenciálním cílem pro vývoj vakcín proti malárii. Vakcíny cílené na antigenní struktury *Plasmodia*, které jsou schopné vyvolat silnou imunitní odpověď, mohou podpořit aktivaci komplementu, což následně zlepší schopnost imunitního systému eliminovat *P. falciparum*. Výběr antigenů pro vakcíny je tedy klíčový pro zajištění účinnosti imunizace, a to jak z hlediska vyvolání protilátek, tak zajištění jejich schopnosti efektivně aktivovat komplement. Další strategií vývoje vakcíny proti malárii je přímo cílit na komplementové proteiny, které regulují samotnou kaskádu nebo jsou přítomny na povrchu erytrocytů (např. komplementový receptor 1 a komplementový regulační protein CD55). Právě u heterozygotů je exprese těchto komplementových proteinů na povrchu erytrocytů zvýšena (Kurtovic *et al.*, 2020).

ZÁVĚR

Tato bakalářská práce ukazuje, jak genetická predispozice k srpkovité anémii, konkrétně mutace v genu pro hemoglobin, ovlivňuje nejen zdravotní stav jedince, ale i jeho schopnost odolávat malárii.

Srpkovitá anémie je způsobena bodovou mutací v genu pro β -globin, která vede k tvorbě abnormálního hemoglobinu. Tento hemoglobin způsobuje změnu tvaru červených krvinek, které se při nízkém přísunu kyslíku mění na srpkovité formy, což brání jejich schopnosti efektivně přenášet kyslík. Avšak u heterozygotů tento defekt není tak výrazný, což znamená, že červené krvinky jsou většinou funkční, ale stále vykazují určitou odolnost vůči malárii. Mechanismus ochrany proti malárii je komplexní a zahrnuje několik faktorů.

Jedním z hlavních ochranných mechanismů je nižší schopnost parazita *Plasmodium falciparum* růst v erythrocytech s abnormálním hemoglobinem. Tento proces je spojený s vyšším oxidačním stresem v těchto buňkách, což vede k jejich rychlejšímu odstranění fagocyty, a tím k redukci doby, po kterou parazit může v těle hostitele přežít a množit se. Dále změny ve vlastnostech červených krvinek heterozygotů zahrnují sníženou adhezi parazitem infikovaných erythrocytů k endoteliálním buňkám, což zamezuje obstrukci a zánětlivým reakcím, které jsou klíčové pro rozvoj těžkých forem malárie.

Imunitní odpověď nositelů heterozygotního genotypu je také posílena. Proti povrchovým antigenům parazita se tvoří vyšší hladiny protilátek, což zlepšuje *opsonizaci* a fagocytózu infikovaných erythrocytů. Tyto protilátky spolu s mechanickými změnami na membráně erythrocytů, hrají roli v rychlejší odstranění infikovaných buněk a ve zvýšení imunitní ochrany.

V závěru lze shrnout, že heterozygotní genotyp pro srpkovitou anémii poskytuje svým nositelům významnou ochranu proti těžkým formám malárie, a to prostřednictvím kombinace biochemických změn v erythrocytech, zlepšené imunitní odpovědi a fyziologických mechanismů, které omezují šíření parazita. Tento jedinečný příklad evolučního kompromisu ukazuje, jak může genetická mutace, vedoucí k vážným zdravotním problémům, poskytnout výhodu v jistých environmentálních podmínkách, jako jsou endemické oblasti s výskytem malárie.

SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

ADU, P.; SIMPONG, D. L.; TAKYI, G. a EPHRAIM, R. K. D. 2016. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and sickle cell trait among prospective blood donors: a cross-sectional study in berekum, Ghana. *Advances in Hematology*, **1**(2016), s. 7302912. ISSN 1687-9104 [online]. [cit. 2025-04-05]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2016/7302912>.

AKINSHEYE, I. ALSULTAN, A.; SOLOVIEFF, N.; NGO, D.; BALDWIN, C. T.; SEBASTIANI, P.; CHUI, D. H. K. a STEINBERG, M. H. 2011. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. *Blood*, **118**(1), s. 19-27. ISSN 0006-4971 [online]. [cit. 2025-02-13]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1182/blood-2011-03-325258>.

ALLISON, A. C. 1954. Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection. *British medical journal*, **1**(4857), s. 290-294.

ALLISON, A. C. 2002. The discovery of resistance to malaria of sickle-cell heterozygotes. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, **5**(30), s. 279-287. [online]. [cit. 2025-03-29]. Dostupné z: <https://nosyevolucion.wordpress.com/wp-content/uploads/2013/09/allison-2002-the-discovery-of-resistence-to-malaria-of-sickle-cell-heterozygotes1.pdf>.

AYI, K.; TURRINI, F.; PIGA, A. a ARESE, P. 2004. Enhanced phagocytosis of ring-parasitized mutant erythrocytes: a common mechanism that may explain protection against falciparum malaria in sickle trait and beta-thalassemia trait. *Blood*, **104**(10), s. 3364-3371. ISSN 0006-4971 [online]. [cit. 2025-04-08]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1182/blood-2003-11-3820>.

BAER, K.; KLOTZ, C.; KAPPE, S. H. I.; SCHNIEDER, T.; FREVERT, U. a SIBLEY, L.D. 2007. Release of hepatic *Plasmodium yoelii* merozoites into the pulmonary microvasculature. *PLoS Pathogens*, **3**(11), s. e171. ISSN 1553-7374 [online]. [cit. 2025-03-28]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030171>.

BAIN, B. J. 2020. Haemoglobin and the genetics of haemoglobin synthesis. *Haemoglobinopathy Diagnosis*, s. 2-4. ISBN 9781119579953.

BAKER, D. A. 2010. Malaria gametocytogenesis. *Molecular and biochemical parasitology*, **172**(2), s. 57-65. ISSN 01666851 [online]. [cit. 2025-03-28]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.03.019>.

BALGIR, R. S. 2012. Community expansion and gene geography of sickle cell trait and G6PD deficiency, and natural selection against malaria: experience from tribal land of India. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Cardiovascular & Hematological Agents)*, **1**(10), s. 3-13. [online]. [cit. 2025-04-05]. Dostupné z: <https://doi.org/10.2174/187152512799201190>.

BALLAS, S. K. a CONNES, P. 2018. Sickle cell disease: Classification of clinical complications and approaches to preventive and therapeutic management. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, **68**(2-3), s. 105-128. ISSN 13860291 [online]. [cit. 2025-03-11]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3233/CH-189002>.

- BASU, S. a SAHI, P. K. 2017. Malaria: an update. *The Indian Journal of Pediatrics*, **7**(84), s. 521-528. [online]. [cit. 2025-03-29]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12098-017-2332-2>.
- BELNOUE, E.; KAYIBANDA, M.; VIGARIO, A. M.; DESCHEMIN, J. C.; ROOIJEN, N.; VIGUIER, M.; SNOUNOU, G. a RÉNIA, L. 2002. On the pathogenic role of brain-sequestered $\alpha\beta$ CD8⁺ T cells in experimental cerebral malaria. *The Journal of Immunology*, **11**(169), s. 6369-6375.
- BINDER, T.; SALAJ, P. a VAVŘINKOVÁ, B. 2020. Hematologické poruchy a nemoci v těhotenství. *Nemoci v těhotenství: a řešení vybraných závažných peripartálních stavů*. Praha: Grada Publishing. s. 94-95. ISBN 978-80-271-2009-3.
- BUNN, H. F. 2013. The triumph of good over evil: protection by the sickle gene against malaria. *Blood*, **121**(1), s. 20-25. ISSN 0006-4971 [online]. [cit. 2025-04-08]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1182/blood-2012-08-449397>.
- CAPPADORO, M.; GIRIBALDI, G.; O'BRIEN, E.; TURRINI, F.; MANNU, F.; ULLIERS, D.; SIMULA, G.; LUZZATTO, L. a ARESE, P. 1998. Early phagocytosis of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficient erythrocytes parasitized by *Plasmodium falciparum* may explain malaria protection in G6PD deficiency. *Blood*, **92**(7), s. 2527-2534. ISSN 1528-0020 [online]. [cit. 2025-04-05]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1182/blood.V92.7.2527>.
- CLEGG, J. B. a GAGNON, J. 1981. Structure of the zeta chain of human embryonic hemoglobin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **78**(10), s. 6076-6080. ISSN 0027-8424 [online]. [cit. 2024-11-01]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.78.10.6076>.
- CRETEGNY, I. a EDELSTEIN, S. J. 1993. Double strand packing in hemoglobin S fibers. *Journal of molecular biology*, **3**(230), s. 733-738.
- DALAND, G. A. a CASTLE, W. B. 1948. A simple and rapid method for demonstrating sickling of the red blood cells: the use of reducing agents. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, **9**(33), s. 1082-1088.
- DIAKITÉ, S. A. S.; NDOUR, P. A.; BROUSSE, V.; GAY, F.; ROUSSEL, C.; BILIGUI, S.; DUSSIOT, M.; PRENDKI, V.; LOPERA-MESA, T. M.; TRAORÉ, K.; KONATÉ, D.; DOUMBIA, S.; CROS, J.; DOKMAK, S. a FAIRHURST, R. M. 2016. Stage-dependent fate of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells in the spleen and sickle-cell trait-related protection against malaria. *Malaria Journal*, **15**(1), s. 1-10. ISSN 1475-2875 [online]. [cit. 2025-04-04]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1522-0>.
- DYKES, G.; CREPEAU, R. H. a EDELSTEIN, S. J. 1978. Three-dimensional reconstruction of the fibres of sickle cell haemoglobin. *Nature*, **272**(5653), s. 506-510.
- EATON, W. A. 2020. Hemoglobin S polymerization and sickle cell disease Science paper: a retrospective on the occasion of the 70th anniversary of Pauling's Science paper. *American Journal of Hematology*, **95**(2), s. 205-211. ISSN 0361-8609 [online]. [cit. 2025-02-20]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/ajh.25687>.
- EGESA, W. I.; NAKALEMA, G.; WAIBI, W. M.; TURYASIIMA, M.; AMUJE, E.; KICONCO, G.; ODOCH, S.; KUMBAKULU, P.; ABDIRASHID, S.; ASIIMWE, D. a MUSSA, A. 2022. Sickle cell disease in children and adolescents: a review of the historical,

clinical, and public health perspective of sub-saharan Africa and beyond. *International Journal of Pediatrics*, **2022**(1) s. 1-26. ISSN 1687-9759 [online]. [cit. 2025-01-04]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2022/3885979>.

FÁBRYOVÁ, V.; BOŽEK, P. a KOLLÁROVÁ A. 2015. *Hemoglobín a jeho choroby*. Bratislava: A-medi management. ISBN 978-80-971836-4-6.

FÁBRYOVÁ, V. 2017. *Anémie*. Martin: Osveta. ISBN 978-80-8063-452-0.

FARID, Y.; BOWMAN, N. S. a LECAT, P. 2023. Biochemistry, hemoglobin synthesis. *StatPearls*. [online]. [cit. 2024-10-29]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK536912/>.

FERREIRA, A.; MARGUTI, I.; BECHMANN, I.; JENEY, V.; CHORA, Â.; PALHA, N. R.; REBELO, S.; HENRI, A.; BEUZARD, Y. a SOARES Miguel P. 2011. Sickle hemoglobin confers tolerance to Plasmodium infection. *Cell*, **145**(3), s. 398-409. ISSN 00928674 [online]. [cit. 2025-03-31]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.049>.

FERRONE, F. A. 2015. The delay time in sickle cell disease after 40 years: a paradigm assessed. *American Journal of Hematology*, **90**(5), s. 438-445. ISSN 0361-8609 [online]. [cit. 2025-02-25]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/ajh.23958>.

FITZSIMMONS, R.; AMIN, N. a UVERSKY, V. N. 2016. Understanding the roles of intrinsic disorder in subunits of hemoglobin and the disease process of sickle cell anemia. *Intrinsically Disordered Proteins*, **4**(1), s. e1248273. ISSN 2169-0707 [online]. [cit. 2025-01-13]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/21690707.2016.1248273>.

FREVERT, U; SINNIS, P; CERAMI, C; SHREFFLER, W; TAKACS, B a NUSSENZWEIG, V. 1993. Malaria circumsporozoite protein binds to heparan sulfate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes. *The Journal of experimental medicine*, **177**(5), s. 1287-1298. ISSN 0022-1007 [online]. [cit. 2025-03-28]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1084/jem.177.5.1287>.

FRIEDMAN, M. J. 1978. Erythrocytic mechanism of sickle cell resistance to malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **75**(4), s. 1994-1997. ISSN 0027-8424 [online]. [cit. 2025-04-03]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.75.4.1994>.

FRIEDMAN, M. J. a TRAGER, W. 1981. The Biochemistry of Resistance to Malaria. *Scientific American*, **3**(244), s. 154-165. [online]. [cit. 2025-03-25]. Dostupné z: <https://www.jstor.org/stable/24964333>.

GABRIEL, A. a PRZYBYLSKI, J. 2010. Sickle-Cell Anemia: A Look at Global Haplotype Distribution. *Nature Education*, **3**(3), s. 2.

GARNHAM, P. C. C. 2016. Malarial immunity in Africans: effects in infancy and early childhood. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, **43**(1), s. 47-61. ISSN 0003-4983 [online]. [cit. 2025-03-22]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/00034983.1949.11685394>.

GONG, L.; PARIKH, S.; ROSENTHAL, P. J. a GREENHOUSE, B. 2013. Biochemical and immunological mechanisms by which sickle cell trait protects against malaria. *Malaria Journal*, **12**(1), s. 1-9. ISSN 1475-2875 [online]. [cit. 2025-04-08]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-317>.

- HARDOUIN, G.; MAGRIN, E.; CORSIA, A.; CAVAZZANA, M.; MICCIO, A. a SEMERARO, M. 2023. Sickle cell disease: from genetics to curative approaches. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, **24**(1), s. 255-275. ISSN 1527-8204 [online]. [cit. 2025-02-12]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-120122-081037>.
- HEBBEL, R. P. 2013. Sickle hemoglobin instability: a mechanism for malarial protection. *Redox Report*, **8**(5), s. 238-240. ISSN 1351-0002 [online]. [cit. 2025-04-08]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1179/135100003225002826>.
- HEBBEL, R. P.; MORGAN, W. T.; EATON, J. W. a HEDLUND, B. E. 1988. Accelerated autoxidation and heme loss due to instability of sickle hemoglobin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **1**(85), s. 237-241.
- CHO, S. 2012. CD36 as a therapeutic target for endothelial dysfunction in stroke. *Current Pharmaceutical Design*, **18**(25), s. 3721-3730. ISSN 13816128 [online]. [cit. 2025-04-08]. Dostupné z: <https://doi.org/10.2174/138161212802002760>.
- KATO, G. J.; STEINBERG, M. H. a GLADWIN, M. T. 2017. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. *Journal of Clinical Investigation*, **127**(3), s. 750-760. ISSN 0021-9738 [online]. [cit. 2025-03-18]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1172/JCI89741>.
- KAYAR, S. R.; HOPPELER, H.; JONES, J. H.; LONGWORTH, K.; ARMSTRONG, R. B.; LAUGHLIN, M. H.; LINDSTEDT, S. L.; BICUDO, J. E. P. W.; GROEBE, K.; TAYLOR, C. R. a WEIBEL, E. R. 1994. Capillary blood transit time in muscles in relation to body size and aerobic capacity. *Journal of Experimental Biology*, **194**(1), s. 69-81. ISSN 0022-0949 [online]. [cit. 2025-02-25]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1242/jeb.194.1.69>.
- KOHNE, E. 2011. Hemoglobinopathies. *Deutsches Ärzteblatt international*, **108**(31-32), s. 532-540. ISSN 1866-0452 [online]. [cit. 2024-11-15]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3238/arztebl.2011.0532>.
- KORIR, J. C.; NYAKOE, N. K.; AWINDA, G.; WAITUMBI, J. N. a BEJON, P. 2014. Complement activation by merozoite antigens of Plasmodium falciparum. *PLoS ONE*, **9**(8), s. e105093. ISSN 1932-6203 [online]. [cit. 2025-04-10]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105093>.
- KURTOVIC, L.; BOYLE, M. J.; OPI, D. H.; KENNEDY, A. T.; THAM, W. H.; REILING, L.; CHAN, J. A. a BEESON, J. G. 2020. Complement in malaria immunity and vaccines. *Immunological Reviews*, **293**(1), s. 38-56. ISSN 0105-2896 [online]. [cit. 2025-04-10]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/imr.12802>.
- KUYPERS, F. A. 2014. Hemoglobin S polymerization and red cell membrane changes. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, **28**(2), s. 155-179. ISSN 08898588 [online]. [cit. 2025-03-04]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2013.12.002>.
- LAKKAKULA, B. V. K. S. a PATTNAIK, S. 2023. The HBG2 rs7482144 (C>T) polymorphism is linked to HbF levels but not to the severity of sickle cell anemia. *Journal of Pediatric Genetics*, **12**(2), s. 129-134. ISSN 2146-4596 [online]. [cit. 2025-03-11]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1055/s-0041-1733950>.
- LARSEN, M. D.; QUINTANA, M. P.; DITLEV, S. B.; BAYARRI-OLMOS, R.; OFORI, M. F.; HVIID L. a GARRED, P. 2019. Evasion of classical complement pathway activation on

- Plasmodium falciparum-infected erythrocytes opsonized by PfEMP1-specific IgG. *Frontiers in Immunology*, **1**(9), s. 3088. ISSN 1664-3224 [online]. [cit. 2025-04-10]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03088>.
- LUZZATTO, L. 1979. Genetics of red cells and susceptibility to malaria. *Blood*, **54**(5), s. 961-976. ISSN 0006-4971 [online]. [cit. 2025-04-02]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1182/blood.V54.5.961.961>.
- LUZZATTO, L. 2012. Sickle cell anaemia and malaria. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, **4**(1), s. e2012065. ISSN 2035-3006 [online]. [cit. 2025-04-02]. Dostupné z: <https://doi.org/10.4084/mjhid.2012.065>.
- NEWTON, C. R. J. C. 2000. Neurological aspects of tropical disease: cerebral malaria. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, **69**(4), s. 433-441. ISSN 00223050 [online]. [cit. 2025-03-31]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1136/jnnp.69.4.433>.
- OGUN, A. S.; JOY, N. V. a VALENTINE, M. 2023. Biochemistry, heme synthesis. *StatPearls*. [online]. [cit. 2024-10-04]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537329/>.
- OLATUNJI, P. O. 2018. Malaria and the sickle gene: polymorphism balance in favour of eradication. *Annals of Health Research*, **4**(2), s. 88-96. ISSN 2536-6149 [online]. [cit. 2025-03-31]. Dostupné z: <https://doi.org/10.30442/ahr.0402-1-12>.
- OLUMESE, P. E.; ADEYEMO, A. A.; ADEMOWO, O. G.; GBADEGESIN, R. A.; SODEINDE, O. a WALKER, O. 2016. The clinical manifestations of cerebral malaria among Nigerian children with the sickle cell trait. *Annals of Tropical Paediatrics*, **17**(2), s. 141-145. ISSN 0272-4936 [online]. [cit. 2025-04-02]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/02724936.1997.11747877>.
- PAMPLONA, A.; FERREIRA, A.; BALLA, J.; JENEY, V.; BALLA, G.; EPIPHANIO, S.; CHORA, A.; RODRIGUES, C. D.; GREGOIRE, I. P.; CUNHA-RODRIGUES, M.; PORTUGAL, S.; SOARES, M. P. a MOTA, M. M. 2007. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Nature medicine*, **6**(13), s. 703-710.
- PERUMBETI, A. 2014. Hemoglobinopathies and thalassemia syndromes. *Pathobiology of Human Disease*, s. 1506-1531. ISBN 9780123864574 [online]. [cit. 2024-11-01]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386456-7.07906-5>.
- POTTER, S.; CHAUDHRI, G.; HANSEN, A. a HUNT, N.H. 2013. Fas and perforin contribute to the pathogenesis of murine cerebral malaria. *Redox Report*, **4**(6), s. 333-335. ISSN 1351-0002 [online]. [cit. 2025-04-01]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1179/135100099101535070>.
- REINER, A. P.; RAFFIELD, L. M.; EKUNWE, L.; OLSON, N. C.; AUER, P. L. a DOYLE, M. F. 2025. Alterations of Tcell subsets associated with sickle cell trait. *Blood and Genomics Discovery*, **9**(1), s. 10001-10001. ISSN 3078-221X [online]. [cit. 2025-04-01]. Dostupné z: <https://doi.org/10.70322/bgd.2025.10001>.
- RUBIN, O.; CANELLINI, G.; DELOBEL, J.; LION, N. a TISSOT, J. D. 2012. Red blood cell microparticles: clinical relevance. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, **39**(5), s. 342-347. ISSN 1660-3818 [online]. [cit. 2025-03-04]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1159/000342228>.

- SERJEANT, G. R. 2022. Phenotypic variation in sickle cell disease: the role of beta globin haplotype, alpha thalassemia, and fetal hemoglobin in HbSS. *Expert Review of Hematology*, **15**(2), s. 107-116. ISSN 1747-4086 [online]. [cit. 2025-02-12]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/17474086.2022.2040984>.
- SHEFTEL, A. D.; MASON, A. B. a PONKA, P. 2012. The long history of iron in the universe and in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General subjects*, **1820**(3), s. 161-187. ISSN 1872-8006 [online]. [cit. 2024-07-05]. Dostupné z: doi: 10.1016/j.bbagen.2011.08.002.
- STEENSMA, D. P.; KYLE, R. A. a SHAMPO, M. A. 2010. Walter Clement Noel—first patient described with sickle cell disease. *Mayo Clinic Proceedings*, **85**(10), s. e74-e75. ISSN 00256196 [online]. [cit. 2024-10-15]. Dostupné z: <https://doi.org/10.4065/mcp.2010.0554>.
- STEINBERG, M. H. 2009. Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. *The Scientific World JOURNAL*, **9**, s. 46-67. ISSN 1537-744X [online]. [cit. 2025-03-11]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1100/tsw.2009.10>.
- STEJSKAL, F. 2019. Neurologické komplikace malárie. *Neurologie pro praxi*, **2**(20), s. 102-106.
- SUHAIL, M. 2024. Biophysical chemistry behind sickle cell anemia and the mechanism of voxelotor action. *Scientific Reports*, **14**(1), s. 1-18. ISSN 2045-2322 [online]. [cit. 2025-03-07]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-52476-8>.
- TANABE, P.; SPRATLING, R.; SMITH, D.; GRISSOM, P. a HULIHAN, M. 2019. Understanding the complications of sickle cell disease. *AJN, American Journal of Nursing*, **119**(6), s. 26-35. ISSN 0002-936X [online]. [cit. 2025-03-11]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1097/01.NAJ.0000559779.40570.2c>.
- TAYLOR, S. M.; CERAMI, C.; FAIRHURST, R. M. a CHITNIS, C. E. 2013. Hemoglobinopathies: slicing the gordian knot of Plasmodium falciparum malaria pathogenesis. *PLoS Pathogens*, **9**(5), s. e1003327. ISSN 1553-7374 [online]. [cit. 2025-04-08]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003327>.
- TSUKAHARA, K.; CHANG, X.; MENTCH, F.; SMITH-WHITLEY, K.; BHANDARI, A.; NORRIS, C.; GLESSNER, J. T. a HAKONARSON, H. 2024. Identification of genetic variants associated with clinical features of sickle cell disease. *Scientific Reports*, **14**(1), s. 1-8. ISSN 2045-2322 [online]. [cit. 2025-03-11]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-70922-5>.
- TUTEJA, R. 2007. Malaria – an overview. *The FEBS Journal*, **274**(18), s. 4670-4679. ISSN 1742-464X [online]. [cit. 2025-03-25]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05997.x>.
- WILLIAMS JR., R. C. 1973. Concerted formation of the gel of hemoglobin S. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **5**(70), s. 1506-1508.
- WILLIAMS, T. N. 2006. Human red blood cell polymorphisms and malaria. *Current Opinion in Microbiology*, **9**(4), s. 388-394. ISSN 13695274 [online]. [cit. 2025-04-08]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.06.009>.

WINOGRAD, E. a SHERMAN, I. W. 2004. Malaria infection induces a conformational change in erythrocyte band 3 protein. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **138**(1), s. 83-87. ISSN 01666851 [online]. [cit. 2025-04-09]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2004.07.008>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (WHO). 2024. *Malaria*. World health organization. [online]. [cit. 2025-03-25]. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria>.

ZDROJE PŘÍLOH

Příloha 1:

THE BLOOD PROJECT. 2022. *First Description of Sickle Cell Disease*. [online]. [cit. 2024-10-15]. Dostupné z: <https://www.thebloodproject.com/cases-archive/first-description-of-sickle-cell-disease/postscript/>.

Příloha 2:

CRETEGNY, Isabelle a EDELSTEIN, Stuart J. 1993. Double strand packing in hemoglobin S fibers. *Journal of molecular biology*, **3**(230), s. 733-738.

PŘÍLOHY

Příloha 1: Protokol o vyšetření Noelovy krve s nakreslenými srpkovitými erytrocyty vpravo dole

The Presbyterian Hospital, Chicago, Ill.

EXAMINATION OF BLOOD.

Case Number _____ Date *12/31* 19*31*

Name of Patient *Noel* Room or Ward *7*

MACROSCOPICAL AND QUANTITATIVE.

Appearance *pale* Coagulability _____

Erythrocytes per cu. mm. (Thoma Zeiss) *2,880,000*

Leucocytes per cu. mm. (Thoma Zeiss) *15,250*

Hemoglobin (Von Fleischl) _____

Specific gravity _____

Color index _____

MICROSCOPICAL.

Fresh Specimen.

Erythrocytes—Color _____ Shape *very irregular many elongated*

Size *irregular - average size* Rouleaux formation *none*

Leucocytes—Apparent increase in number *average size about normal*

Ratio of granular to non-granular _____

Fibrin _____ Blood-platelets _____ Pigment _____

Plasmodium malarie _____

Miscellaneous _____

3700 cells & many small refs. & still much (unclear reds?) (red count preparation)

Příloha 2: Vazebné kontakty mezi dvojicemi vláken v HbS

Table 1
Contacts within 5 Å between double strands

Contact	Z value	Closest residues	Carragher contact
1-10 [6-5]	+Z	α_272 His β_287 Thr	+
1-11 [6-13]	+Z	α_253 Ala β_158 Pro	
2-3 [7-8]	-Z	α_160 Lys α_151 Gly	
2-11 [7-13]		(none within 5 Å)	+
2-12 [7-14]	+Z	β_259 Lys β_259 Lys	
2-12 [7-14]	-Z	α_147 Asp α_154 Gln	
3-12 [8-14]	+Z	β_287 Thr α_24 Pro	+
4-5 [9-10]	-Z	α_24 Pro α_254 Gln	
4-12 [9-14]		(none within 5 Å)	
4-13 [9-11]	-Z	α_14 Pro β_276 Ala	
11-12 [13-14]	+Z	α_118 Gly β_15 Pro	+
11-11 [13-12]	+Z	β_154 Gln α_280 Lys	

The contacts are designated between strands as numbered in Fig. . For each contact attributed with the Dykes-Rodgers data (atoms within 5 Å), the Z value (position along the Z axis) indicates whether the molecule in the second strand is above (+Z) or below (-Z) the molecule in the first strand, e.g. for the contact 1-10 (or 6-5) +Z indicates that the molecule of strand 10 (or 5) is at a higher Z value than the molecule of strand 1 (or 6). The nearest residues indicate the point of closest contact between the 2 strands of the contacts, e.g. for the contact 1-10, the α_272 His is on strand 1 and the β_287 Thr on strand 10. The subscripts refer to the orientation of the β -6 Val at the contact that defines subunit β_2 , as well as α_2 on the same α - β dimer. A plus (+) sign in the last column indicates that a contact between strands was reported by Watowich *et al.* (1989) based on the Carragher parameters.