

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Katarzyna Sikorska

**ZNACZENIE NADMIERNEGO GROMADZENIA ŻELAZA
I POLIMORFIZMU GENU HFE W PRZEWLEKŁYCH
CHOROBYCH WĄTROBY ZE SZCZEGÓLNYM
UWZGLĘDNIENIEM PRZEWLEKŁEGO WIRUSOWEGO
ZAPALENIA WĄTROBY TYPU C**

Rozprawa habilitacyjna

Klinika Chorób Zakaźnych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Kierownik: dr hab. med. Tomasz Smiatcz

GDAŃSK 2012

Wydano za zgodą
Senackiej Komisji Wydawnictw
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Wydawca: Gdański Uniwersytet Medyczny
Druk: Dział Wydawnictw GUMed
Gdańsk, ul. Marii Skłodowskiej-Curie 3a
Zlecenie KW/95/12

SPIS TREŚCI

WYKAZ PUBLIKACJI AUTORSKICH BĘDĄCYCH PRZEDMIOTEM ROZPRAWY	5
WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW.....	7
1. WSTĘP.....	8
1.1. Homeostaza żelaza w organizmie człowieka.....	8
1.2. Rola wątroby w utrzymaniu homeostazy żelaza.....	10
1.3. Przewlekłe zapalenie wątroby typu C.....	11
1.4. Nadmierne gromadzenie żelaza i polimorfizm genu HFE w przewlekłych chorobach wątroby.....	12
2. CEL BADAŃ.....	16
3. MATERIAŁ I METODY.....	17
4. OMÓWIENIE WYNIKÓW.....	19
4.1. Występowanie zaburzeń gospodarki żelazowej w postaci nadmiernego jego gromadzenia u pacjentów z przewlekłymi chorobami wątroby.....	19
4.2. Występowanie mutacji genu HFE w populacji chorych na przewlekłe choroby wątroby.....	22
4.3. Znaczenie badań histopatologicznych i obrazowania metodą rezonansu magnetycznego w diagnostyce zespołów nadmiernego gromadzenia żelaza.....	25
4.3.1. Badanie histopatologiczne.....	25
4.3.2. Badanie MRI.....	26
4.4. Ocena wpływu zaburzeń gospodarki żelazowej i mutacji genu HFE na przebieg przewlekłego zapalenia wątroby typu C w kontekście postępu choroby i efektywności leczenia przeciwwirusowego.....	27
4.5. Perspektywa dalszych badań.....	30
5. PODSUMOWANIE.....	31
6. WNIOSKI.....	32
7. PIŚMIENNICTWO.....	33
8. PRACE BĘDĄCE PRZEDMIOTEM ROZPRAWY HABILITACYJNEJ.....	45

WYKAZ PUBLIKACJI AUTORSKICH BĘDĄCYCH PRZEDMIOTEM ROZPRAWY

1. **Sikorska K.**, Stalke P., Lakomy E. A., Michalska Z., Witzczak-Malinowska K., Stolarczyk J.: Disturbances of iron metabolism in chronic liver diseases. *Med. Sci. Monit.* 2003, Suppl. 3, 64-67. (KBN/MNiSW 5)
2. **Sikorska K.**, Stalke P., Jaśkiewicz K., Romanowski T., Bielawski K. P.: Could iron deposits in hepatocytes serve as a prognostic marker of HFE gene mutations? *Hepatogastroenterology* 2008, 55, 1024-1028. (IF 0,680; KBN/MNiSW 15)
3. **Sikorska K.**, Stalke P., Iżycka-Świeszewska E., Romanowski T., Bielawski K. P.: The role of iron overload and HFE gene mutations in the era of pegylated interferon and ribavirin treatment of chronic hepatitis C. *Med. Sci. Monit.* 2010, 16, CR137-143. (IF 1,699; KBN/MNiSW 20)
4. Szurowska E., **Sikorska K.**, Iżycka-Świeszewska E., Nowicki T., Romanowski T., Bielawski K. P., Studniarek M.: The role of MR imaging in detection of hepatic iron overload in patients with cirrhosis of different origins. *BMC Gastroenterol.* 2010, 27, 10:13. (IF 2,468; KBN/MNiSW 20)
5. **Sikorska K.**, Romanowski T., Stalke P., Iżycka-Świeszewska E., Bielawski K.P.: Iron overload and HFE gene mutations in Polish patients with liver cirrhosis. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* 2011, 10, 270-275. (IF 1,514)
6. **Sikorska K.:** Association of HFE gene mutations with liver cirrhosis depends on induction of iron homeostasis disturbances. *Hepat. Mon.* 2012, 12, 213-214. (IF 0,793)
7. **Sikorska K.**, Romanowski T., Bielawski K. P.: Pathogenesis and clinical consequences of iron overload in chronic hepatitis C: impact of host and viral factors related to iron metabolism. *Biotechnologia* 2011, 92, 54-65. (KBN/MNiSW 6)
8. **Sikorska K.**, Stalke P., Bielawski K.P.: Is there any association between HCV multiplication and iron induced liver injury in chronic hepatitis C? *J. Hepatol.* 2011, 55, 235-236. (IF 9,334; KBN/MNiSW 32)

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- IRP1/IRP2 – *iron regulatory protein1/2* / białka regulujące metabolizm żelaza
- TfR1 – *transferrin receptor 1* / receptor transferyny 1
- TfR2 – *transferrin receptor 2* / receptor transferyny 2
- DMT1 – *divalent metal ion transporter* / nośnik metali dwuwartościowych
- NTBI – *nontransferrin bound iron* / żelazo niezwiązane z transferyną
- TNF α – *tumor necrosis factor α* / czynnik martwicy nowotworów α
- IL-1 α – interleukina 1 alfa
- IL-1 β – interleukina 1 beta
- IL-6 – interleukina 6
- IGF-1 – *insulin growth factor 1* / insulinopodobny czynnik wzrostu 1
- TRH – *Thyrotropin-releasing hormone* / tyreoliberyna
- HCV – *hepatitis C virus* / wirus C zapalenia wątroby
- HCC – *hepatocellular carcinoma* / rak wątrobowokomórkowy
- ERK 1/2 – *extracellular signal regulated kinases* / kinazy regulowane sygnałem zewnątrzkomórkowym
- MAPK – *mitogen activated protein kinase* / kinaza białkowa aktywowana mitogenami
- Pzw C – przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby typu C
- NAFLD – *nonalcoholic fatty liver disease* / niealkoholowa choroba tłuszczeniowa wątroby
- IRHIO – *insulin resistance hepatic iron overload* / gromadzenie żelaza w wątrobie towarzyszące zespołowi insulinooporności
- HIC – *hepatic iron concentration* / zawartość żelaza w wątrobie
- HII – *hepatic iron index* / wątrobowy indeks żelaza
- TIS – *total iron score* / całkowita zawartość żelaza
- MRI – *magnetic resonance imaging* / obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego
- SVR – *sustained viral response* / trwała odpowiedź wirusologiczna

1. WSTĘP

1.1. Homeostaza żelaza w organizmie człowieka

Żelazo jest niezbędnym mikroelementem podstawowych reakcji metabolicznych żywych organizmów. Wśród składników skorupy ziemskiej żelazo, pod względem ogólnej zawartości, zajmuje czwarte miejsce, a wśród metali drugie. Łatwo dostępny i rozpuszczalny w wodzie jon żelaza dwuwartościowego (Fe^{2+}) stał się wzorcowym kofaktorem dla białek. Jako żelazo hemowe, pierwiastek bierze udział w transporcie tlenu, wiązaniu i uwalnianiu tlenu cząsteczkowego, reakcjach hydroksylacji endogennych substancji i ksenobiotyków, a także w przenoszeniu elektronów w łańcuchu oddechowym. W postaci niehemowej, żelazo wbudowane w centra żelazowo-siarkowe (Fe-S) enzymów, uczestniczy w transferze elektronów, reakcjach dehydratacji i wiązania azotu [21,38,66].

Zaburzenia homeostazy żelaza w organizmie mogą prowadzić do rozwoju poważnych chorób, nie tylko w sytuacji jego niedoboru, ale także gdy ma miejsce nadmierna akumulacja tego pierwiastka w organizmie. Za potencjalną toksyczność żelaza odpowiada jego wysoki potencjał oksydoredukcyjny, skutkujący nadprodukcją reaktywnych form tlenu. Powstają one fizjologicznie w trakcie metabolizmu komórkowego. Gdy akumulacja żelaza w komórkach przekracza możliwości jego utylizacji dochodzi do nadmiernego generowania reaktywnych form tlenu i mechanizmy inaktywujące je mogą okazać się niewystarczające [86]. W warunkach rozwijającego się wówczas stresu oksydacyjnego ma miejsce peroksydacja lipidów błonowych, białek i DNA, uszkodzenie struktur komórkowych i aktywacja reakcji naprawczych. Następstwem destabilizacji struktur komórkowych może być śmierć komórek w mechanizmach martwicy lub apoptozy. Oksydacyjne uszkodzenia DNA zwiększają ryzyko mutagenyzy i karcynogenezy [95,103,124].

Utrzymanie właściwej zawartości żelaza w komórkach jest możliwe dzięki rozbudowanemu systemowi kontrolującemu wchłanianie żelaza z przewodu pokarmowego, transport przez błony komórkowe, pulę krążącego w osoczu żelaza związanego z transferyną, wychwyt pierwiastka z przestrzeni zewnątrzkomórkowej, magazynowanie w postaci nietoksycznego i bezpiecznego dla komórki związku żelaza z ferrytyną oraz uruchamianie zgromadzonych zasobów w razie wzrostu zapotrzebowania. Do komórek najsilniej zaangażowanych w pobieranie żelaza, jego uwalnianie i magazynowanie należą enterocyty, erytroblasty, hepatocyty i makrofagi. Komórki te charakteryzują się zróżnicowaną aktywnością białek biorących udział w wewnątrzustrojowym obrocie żelaza.

Żelazo gromadzi się w wielu tkankach (płuca, nerki, serce, trzustka, gruczoły wydzielania dokrewnego), jednak głównymi rezerwuarami pozostają szpik kostny i wątroba. Od 1/4 do 1/3 ilości żelaza jest zmagazynowanej w komórkach wątroby – hepatocytach i makrofagach, głównie w postaci nieaktywnej, związanej z ferrytyną i hemosyderyną. W

krążących erytrocytach i szpiku kostnym zawarte jest ok. 2,5 g żelaza, z krążącą osoczną transferyną zaś pozostają związane 3 mg pierwiastka [10].

Metabolizm żelaza w komórkach ssaków jest kontrolowany przez dwa białka regulatorowe – IRP1 i IRP2 (*iron regulatory protein*). Pula żelaza wolnego, przejściowego pomiędzy żelazem zewnątrzkomórkowym i żelazem komórkowym związanym z białkami, stanowi niewielką frakcję (< 5%) całkowitej puli żelaza komórkowego. Jest ona dostosowana do metabolicznych potrzeb komórki i musi podlegać ograniczeniom, ze względu na udział w tworzeniu wolnych rodników [72]. Poprzez mechanizm bezpośredniej interakcji IRP1 i IRP2 ze zmienną pulą wolnego żelaza w cytoplazmie komórki, białka te uczestniczą w posttranskrypcyjnej regulacji syntezy m.in. receptora transferyny 1 (TfR1, *transferrin receptor 1*), ferrytyny, nośnika metali dwuwartościowych (DMT1, *divalent metal ion transporter*) i ferroportyny. Kontrola syntezy białek nośnikowych pozwala na utrzymanie fizjologicznego stężenia wolnego żelaza w komórce [39,112].

W osoczu głównym białkiem transportującym żelazo jest transferyna (apotransferyna). Cząsteczka transferyny jest glikoproteiną i wiąże się w sposób odwracalny z dwoma jonami żelaza trójwartościowego (holotransferyna). W warunkach fizjologicznych wysycenie surowiczej transferyny żelazem wynosi od 20 do 30%.

Import żelaza do komórek, poza dojrzałymi enterocytami, dokonuje się poprzez związanie holotransferyny z komórkowym receptorem transferyny. Znane są dwa receptory transferyny: TfR1 i TfR2. W większości komórek intensywność wchłaniania żelaza jest regulowana poprzez zmienną ekspresję TfR1. TfR2 syntetyzowany jest głównie w hepatocytach [73].

Utrzymanie stałej, pożądanej puli żelaza krążącego w osoczu zapewnia hepcydyna, peptyd produkowany przez hepatocyty, który swoiście łącząc się z ferroportyną inicjuje proces degradacji jej cząsteczki i zahamowanie swobodnego uwalniania żelaza z komórki (hepatocyta, makrofaga, enterocyta) [28]. Wzrost stężenia żelaza w surowicy i reakcja zapalna są najsilniejszymi stymulatorami ekspresji hepcydyny. Niedotlenienie, niedobór żelaza oraz pobudzenie erytropoezy prowadzą do spadku produkcji hepcydyny. Regulacja ekspresji genu hepcydyny odbywa się dzięki złożonym mechanizmom, w które zaangażowanych jest szereg cząsteczek sygnalizacyjnych, czynników transkrypcyjnych i białkowych modulatorów. Jednym z ważnych białek swoistych dla komórek wątroby, kontrolujących sygnalizację regulującą transkrypcję m.in hepcydyny jest hemojuwelina, białko, którego zmutowaną postać opisano w 2004 roku u chorych z ciężką postacią hemochromatozy młodzieńczej [37].

Brak hepcydyny oznacza utratę możliwości modulowania natężenia eksportu żelaza z komórek. Może odbywać się on wówczas nieprzerwanie dzięki zachowanej aktywności ferroportyny. Wzrasta stężenie żelaza we krwi, wraz z nim wysycenie transferyny, a gdy te

zaburzenia utrwalają się – dochodzi do stopniowo narastającego gromadzenia żelaza w wątrobie i innych narządach.

1.2. Rola wątroby w utrzymaniu homeostazy żelaza

Hepatocyty pełnią nadrzędną funkcję w utrzymaniu wewnątrzustrojowej homeostazy żelaza. Są głównym magazynem żelaza i zasadniczym miejscem zmiennej, zależnej od różnych bodźców ekspresji hepcydyny – kluczowego regulatora transportu żelaza poza komórkę. Hepatocyt wychwytuje żelazo w postaci zarówno związanej jak i niezwiązanej z transferyną (NTBI, *nontransferrin bound iron*). Wychwyt żelaza związanego z transferyną odbywa się poprzez receptory TfR1 i TfR2, wykazujące ograniczone podobieństwo. Ekspresja TfR1 w hepatocycie jest niższa niż TfR2 i zmniejsza się, gdy ilość żelaza rośnie we krwi. Niektórzy badacze wątpią, aby ten receptor fizjologicznie mógł być głównym odpowiedzialnym za wychwyt żelaza przez hepatocyt [39,105]. TfR2 ma mniejsze powinowactwo do żelaza związanego z transferyną niż TfR1, ale dużo większą wydajność w transportowaniu żelaza związanego z transferyną do hepatocyta [73]. Zasadniczą różnicą w funkcjonowaniu receptorów jest brak zwrotnej regulacji syntezy TfR2 przez ilość żelaza w komórce. Mimo zahamowania syntezy TfR1 w komórkach przy wzroście zawartości żelaza, dalsze wchłanianie żelaza, związanego z transferyną, zależne od TfR2 w błonie hepatocytów jest możliwe. Specyficzną aktywnością TfR2 można tłumaczyć znaczny udział wątroby w patogenezie nadmiernego gromadzenia żelaza, m.in. w dziedzicznej hemochromatozie [55].

Znaczny wzrost wysycenia transferyny w surowicy i przekroczenie zdolności wiązania żelaza wiążą się ze zwiększeniem puli wolnego żelaza osocowego, wchodzącego w skład NTBI. Zadaniem hepatocytów jest szybki wychwyt tej postaci żelaza i neutralizacja zagrożenia wynikającego z łatwości generowania aktywnych form tlenu [39].

W hepatocytach żelazo zostaje zmagazynowane w kompleksie z ferrytyną. Pierwotną i najlepiej opisaną funkcją ferrytyny jest utrzymanie wewnątrzkomórkowej homeostazy żelaza poprzez kontrolę nad pulą wolnego żelaza. Wiązanie żelaza z ferrytyną niweluje szkody wynikające z potencjału oksydoredukcyjnego pierwiastka. Zachowana też jest jego biodostępność, gdy wzrasta w organizmie zapotrzebowanie na żelazo (np. w intensyfikacji erytropoezy). Ostatnie odkrycia wskazują na szersze znaczenie ferrytyny, jako białka zaangażowanego w ochronę komórki w warunkach stresu i zapalenia. Regulacja produkcji ferrytyny nie jest związana wyłącznie z ilością żelaza w organizmie, ale zależy również od reakcji zapalnej i aktywności cytokin (TNF α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6), oksydantów, czynników wzrostu (IGF-1), i hormonów (T3, TRH, insulina). Wykazano, że indukcja ferrytyny ma miejsce zarówno na poziomie transkrypcji, jak i na etapie posttranskrypcyjnej regulacji syntezy i wydzielania [121,130].

1.3. Przewlekłe zapalenie wątroby typu C

Przewlekłe zakażenie wirusem typu C zapalenia wątroby (HCV, *hepatitis C virus*) jest rozpoznawane u ponad 170 mln ludzi na świecie i stanowi jedną z głównych przyczyn przewlekłej choroby wątroby z postępującym włóknieniem oraz rozwoju marskości wątroby i raka wątrobowo-komórkowego [127]. Według danych WHO szacuje się, że ok. 3,1% populacji świata uległo zakażeniu HCV do roku 1980, w dużej mierze poprzez donacje zakażonej wirusem krwi i produktów krwiopochodnych [27]. Liczba nowych zakażeń jednak stale wzrasta na całym świecie, dochodzi do nich w trakcie zabiegów z przerwaniem ciągłości skóry, nie tylko medycznych, także w trakcie tatuażu, kolczykowania itd. Ryzykowne zachowania seksualne i stosowanie odurzających preparatów drogą dożylną wiążą się również z większym prawdopodobieństwem nabycia zakażenia HCV [15]. Ograniczanie transmisji zakażenia jest utrudnione przez brak możliwości zastosowania swoistej profilaktyki, gdyż nie udało się dotąd wytworzyć ani skutecznej szczepionki, ani swoistej immunoglobuliny.

Przewlekłe zapalenie wątroby typu C (pzw C) rozwija się w konsekwencji zakażenia HCV w około 60-80% przypadków. W części z nich przebieg choroby jest niepomyślny, z postępowym włóknieniem i wzrastającym ryzykiem rozwoju marskości wątroby i raka wątrobowokomórkowego.

W Polsce zakażenie HCV staje się poważnym problemem zdrowotnym. 1,9% polskiej populacji uległo zakażeniu przed 2000 rokiem, co wykazały badania Bielawskiego [19]. Zapadalność na wirusowe zapalenie wątroby typu C wzrasta i obecnie kształtuje się w przedziale 5-7 przypadków nowo rozpoznawanych ostrych i przewlekłych zakażeń HCV na 100 000 mieszkańców rocznie [69]. Rośnie liczba zgonów związanych bezpośrednio z zakażeniem HCV. W 2008 roku raportowano 155 przypadków śmiertelnych, ale te dane są najpewniej zaniżone i niekompletne [85,119].

Schyłkowa niewydolność wątroby, będąca skutkiem zakażenia HCV jest jednym z najczęstszych wskazań do zabiegu przeszczepienia wątroby w USA i Europie, w tym w Polsce [1,77,89,132,134]. Wirus C zapalenia wątroby jest także jednym z najważniejszych czynników ryzyka rozwoju raka pierwotnego wątroby. Blisko połowa pacjentów poddawanych transplantacji wątroby z powodu raka wątrobowokomórkowego jest zakażona HCV [26,135].

Patogeneza przewlekłej choroby wątroby wywołanej zakażeniem HCV jest bardzo złożona. Składają się na nią wieloczynnikowe mechanizmy komórkowej i humoralnej odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Istotną rolę w rozwoju procesu uszkodzeniowego w wątrobie przypisuje się także indukcji stresu oksydacyjnego wywołanego przez zakażenie HCV [70,71,81].

Szczególną uwagę zwraca się na patologiczne spichrzanie żelaza w pzw C w kontekście częstego współistnienia obu czynników chorobotwórczych, efektywności leczenia przeciwwirusowego, jak i ryzyka rozwoju nieodwracalnych następstw – marskości wątroby i raka wątrobowokomórkowego [16,25,88,97]. Początek udokumentowanych obserwacji zaburzeń gospodarki żelazowej u pacjentów z rozpoznaniem przewlekłego zapalenia wątroby typu C przypada na lata 1992-1996. Zwracano uwagę na występowanie podwyższonego stężenia żelaza i ferrytyny w surowicy oraz nadmierne gromadzenie żelaza w hepatocytach i komórkach układu siateczkowo-śródbłonkowego wątroby u 10-40% chorych pzw C oraz w 50% przypadków współistnienia HCC i zakażenia HCV, także częste współistnienie patologicznego spichrzania żelaza u pacjentów ze schyłkową niewydolnością wątroby w przebiegu zakażenia HCV [11,23,42,83,106,120,122]. Jednakże obserwacje i formułowane przez badaczy tezy dotyczące patogenezy i prognostycznego znaczenia spichrzania żelaza w przewlekłym zapaleniu wątroby typu C nie są jednoznaczne. Ocena wpływu magazynowania żelaza na skuteczność stosowanych leków przeciwwirusowych także ulega zmianie ze względu na rosnącą siłę działania udoskonalonych form terapii, początkowo przez dołączenie rybawiryny, w następnej kolejności wprowadzenie interferonów pegylowanych.

1.4. Nadmierne gromadzenie żelaza i polimorfizm genu HFE w przewlekłych chorobach wątroby

Patologiczne gromadzenie żelaza u człowieka może mieć charakter wrodzony, uwarunkowany genetycznie, lub nabyty. Hemochromatoza wrodzona (dziedziczna, pierwotna) jest zdefiniowana jako zespół objawów chorobowych rozwijających się w przebiegu akumulacji żelaza w komórkach mięsaszowych wielu narządów: wątroby, trzustki, serca, gonad, przysadki mózgowej. Jej podłożem są mutacje przynajmniej 5 różnych genów, których białkowe produkty regulują ogólnoustrojową homeostazę żelaza (hepcydyna, hemojuwelina, TfR2, ferroportyna) [65,105]. Jest to jedna z najczęstszych wrodzonych chorób metabolicznych [101]. Wśród przyczyn zgonu, będących następstwem nadmiernego gromadzenia żelaza, najczęściej wymieniane są marskość wątroby, rak wątrobowokomórkowy, cukrzyca, niewydolność krążenia [94,133].

Niewątpliwie wątroba jako kluczowy narząd zaangażowany w magazynowanie żelaza i utrzymanie stałej, fizjologicznej i biologicznie bezpiecznej puli żelaza w osoczu stanowi czuły wskaźnik nadmiernego gromadzenia pierwiastka, będąc jednocześnie podatną na szybki rozwój następstw toksyczności żelaza. Im dłużej trwa ekspozycja na nadmiar żelaza w hepatocytach, tym większe jest ryzyko postępującego włóknienia wątroby i rozwoju marskości wątroby z guzkową przebudową narządu, zaburzeniami architektoniki zrazików i wątrobowego krążenia krwi, zmniejszeniem ilości czynnego mięszu z wystąpieniem

objawów niewydolności narządu. Nadmiar żelaza w wątrobie jest także związany ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na raka wątrobowokomórkowego [75,76].

Krokiem milowym w badaniach nad etiopatogenezą choroby było zidentyfikowanie mutacji genu HFE w 1996 roku w ponad 80% przypadków klinicznie rozpoznanej hemochromatozy [52]. Białko HFE będące produktem tego genu składa się z 343 aminokwasów formujących ciężki łańcuch, trzy domeny zewnątrzkomórkowe ($\alpha 1$, $\alpha 2$ i $\alpha 3$), domenę wewnątrzblonową i krótką część cytoplazmatyczną [100]. Niedawno wykazano, że dla utrzymania fizjologicznej homeostazy żelaza bardzo istotna jest prawidłowa ekspresja HFE w hepatocytach [125]. HFE wydaje się pełnić rolę mediatora wychwytu przez komórki żelaza związanego z transferyną, poprzez interakcję z TfR1 [79]. Obecnie wiadomo, że mutacja genu kodującego białko HFE prowadzi do obniżenia ekspresji hepcydyny, głównie w wątrobie, nieadekwatnie do zasobów żelaza w organizmie [5,30]. Dla wyjaśnienia mechanizmu regulacji hepcydyny w hepatocytach zależnego od HFE zaproponowano model interakcji TfR1 i TfR2 z HFE [114]. Samo białko HFE nie ma zdolności wiązania żelaza, ale jest kompetycyjnym inhibitorem przyłączania transferyny wysyczonej żelazem do TfR1 [53]. Gdy wzrasta wysycenie transferyny wiąże się ona z TfR1 wypierając białko HFE i jednocześnie stabilizując TfR2 [35]. Właśnie połączenie HFE z TfR2 ma indukować ekspresję hepcydyny poprzez uruchomienie kaskady kinaz regulowanych sygnałem zewnątrzkomórkowym 1 i 2 (ERK 1/2, *extracellular signal regulated kinases*) oraz p38 kinazy białkowej aktywowanej mitogenami (MAPK, *mitogen activated protein kinase*) [35,58].

Najsilniejszy wpływ na nadmierne gromadzenie żelaza u pacjentów z HFE-hemochromatozą dziedziczną ma mutacja zmiany sensu polegająca na zamianie cysteiny na tyrozynę C282Y (Cys282Tyr) w obu allelach. U jej nosicieli dochodzi do istotnego przekształcenia struktury przestrzennej białka HFE, uniemożliwiającego prawidłową interakcję HFE z TfR1 [126]. W populacji kaukaskiej mutacja C282Y pojedynczego allela jest wykrywana z częstością od 1:12 do 1:20, a obu alleli w przedziale od 1:200 do 1:400. Wśród Afroamerykanów mutacja jest rozpoznawana zdecydowanie rzadziej, w stosunku 1:4000 [64]. U mieszkańców Europy częstość występowania zmutowanego allelu C282Y jest wyraźnie zróżnicowana i kształtuje się w przedziale od 0% w południowej Europie do 12,5% w Irlandii [45]. Mutację homozygotyczną C282Y wykrywano od 60% do 96% chorych prezentujących typowe objawy hemochromatozy, mieszkańców Europy, Ameryki Północnej i Australii [2,31]. Obecność mutacji nie jest jednoznaczna z rozpoznaniem choroby, gdyż nie wszyscy osobnicy będący homozygotami C282Y rozwiną jej objawy. Określanie ryzyka fenotypowej ekspresji budzi wiele kontrowersji, wyniki badań są istotnie zróżnicowane. Beutler i wsp. porównujący częstość współwystępowania objawów hemochromatozy z mutacjami genu HFE sugerują zaledwie 1% szansy na ich fenotypowe ujawnienie [18].

Badania obserwacyjne prowadzone wśród mieszkańców Europy, USA, Kanady, Australii i Nowej Zelandii wskazują na występowanie objawów gromadzenia żelaza u 38% – 50%, a możliwość rozwinięcia się wielonarządowej patologii spowodowanej spichrzaniem żelaza u 10% do 33% homozygot C282Y [9,98,131]. Ryzyko wystąpienia zaburzeń gospodarki żelazowej jest zdecydowanie większe dla płci męskiej (28% vs 1%) [8]. Przyczyna braku fenotypowej ekspresji nie jest jednoznacznie określona, poszukuje się znaczenia wpływu innych genów modyfikujących przebieg choroby i czynników zwiększających ryzyko wystąpienia zaburzeń gospodarki żelazowej (wiek, płeć, zakażenia wirusami hepatotropowymi, spożywanie alkoholu, współwystępowanie zespołu metabolicznego) [43,56,102]. Tempo rozwoju patologii narządowej jest zróżnicowane i zależne od aktywności cytokin prozapalnych i związanych z fibrogenezą (TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-10, TGF- β 1) [22,68,99,103] oraz sprawnie funkcjonujących mechanizmów antyoksydacyjnych [13,111].

U około 4% chorujących na HFE hemochromatozę, wykrywa się mieszaną mutację heterozygotyczną C282Y w połączeniu z mutacją H63D (His63Asp) – gdzie ma miejsce zastąpienie histydyny asparaginą. W odróżnieniu od zmutowanego białka C282Y nie wykazano dla mutantu H63D charakterystycznych zaburzeń w syntezie, transporcie wewnątrzkomórkowym, ekspresji błonowej HFE [126]. W oparciu o wyniki tych badań molekularnych początkowo zakładano, że mutacja H63D samodzielnie nie prowadzi do patologicznego gromadzenia żelaza. Jednak wykrywanie allele H63D z większą częstością w populacji chorych na HFE hemochromatozę w porównaniu z populacją ogólną wskazywało na potencjalny udział tego polimorfizmu w patofizjologii spichrzania żelaza. Przewidywane ryzyko wystąpienia u mieszanych heterozygot objawów różnie nasilonego patologicznego gromadzenia żelaza szacowane jest od 1 do 2% [104]. Sama mutacja H63D występuje w populacji rasy kaukaskiej z częstością 15% – 20% [45]. U homo i heterozygotycznych jej nosicieli możliwe jest wystąpienie łagodnych objawów spichrzania żelaza, głównie pod postacią zaburzeń biochemicznych parametrów gospodarki żelazowej [62]. Dyskutowane jest znaczenie tych mutacji jako dodatkowego czynnika patogennego, który może mieć wpływ na zwiększenie ryzyka rozwoju marskości wątroby i raka wątrobowokomórkowego w przypadku współistnienia zakażenia wirusami zapalenia wątroby HCV, HBV i nadmiernego spożycia alkoholu [46,47,49,60,84].

Trzecim, co do częstości wykrywania polimorfizmem HFE jest S65C (Ser65Cys). Występowanie zmutowanego allele S65C wśród osobników rasy kaukaskiej jest szacowane w przedziale od 0,6% do 1,6%, a wśród pacjentów z objawami nadmiernego gromadzenia żelaza z częstością około 5% [67,92]. Sugerowany jest związek tego polimorfizmu z łagodną odmianą zaburzeń gospodarki żelazowej, szczególnie przy współdziedziczeniu mutacji C282Y [12].

Inne polimorfizmy HFE opisywane są rzadko, a wykrywa się je zwykle u pacjentów z typowymi klinicznymi objawami hemochromatozy, u których nie potwierdzono klasycznego genotypu HFE-hemochromatozy [45].

Rozwój wiedzy o patogenezie spichrzania żelaza oraz wdrażanie nowych metod diagnostycznych, molekularnych i obrazowych zwiększają szansę wczesnego rozpoznania choroby, przed wystąpieniem objawów nieodwracalnych: cukrzycy, marskości, niewydolności krążenia. Podjęcie leczenia zmniejszającego zasoby żelaza u chorych z niezaawansowaną patologią narządową zdecydowanie poprawia rokowanie i wydłuża czas przeżycia.

Nadmierne gromadzenie żelaza może mieć też charakter wtórny do innych chorób, wrodzonych lub nabytych. Do wrodzonych chorób układu czerwonokrwinkowego, którym towarzyszą objawy hemosyderozy należą talasemie, wrodzona sferocytoza, wrodzony niedobór dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej [36,110]. Wśród chorób nabytych, w obrazie których stwierdza się hemosyderozę wymieniane są niedokrwistość syderoblastyczna oraz niektóre przewlekłe choroby wątroby: przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby typu C, niealkoholowa choroba tłuszczowa wątroby, alkoholowa choroba wątroby, porfirie wątrobowe [3,34,61].

Częstość występowania nadmiernego gromadzenia żelaza w populacji chorych, mieszkańców Pomorza, z przewlekłą patologią wątroby, przede wszystkim z rozpoznaniem przewlekłego zapalenia wątroby typu C, jego wpływ na przebieg choroby oraz związek z mutacjami genu HFE stały się tematem prac przeprowadzonych w Klinice Chorób Zakaźnych, których część już opublikowana jest podstawą prezentowanej rozprawy habilitacyjnej.

2. CEL BADAŃ

Celem badań, których wyniki stanowią podstawę rozprawy habilitacyjnej było:

Badanie częstości występowania zaburzeń gospodarki żelazowej w postaci nadmiernego jego gromadzenia wśród chorych z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C, B, niealkoholową stłuszczeniową oraz toksyczną chorobą wątroby i podejrzeniem hemochromatozy dziedzicznej.

Określenie częstości występowania mutacji genu HFE w populacji chorych na przewlekłe choroby wątroby i ich związku z zaburzeniami gospodarki żelazem.

Ocena przydatności wybranych metod diagnostyki histopatologicznej i obrazowania metodą rezonansu magnetycznego w rozpoznawaniu zespołów nadmiernego gromadzenia żelaza.

Ocena wpływu zaburzeń gospodarki żelazowej i mutacji genu HFE na przebieg przewlekłych chorób wątroby, w tym przewlekłego zapalenia wątroby typu C, w kontekście postępu choroby, efektywności leczenia przeciwiwirusowego, ryzyka rozwoju odległych następstw – marskości wątroby i raka wątrobowokomórkowego.

3. MATERIAŁ I METODY

Badania kliniczne przeprowadzono w Klinice Chorób Zakaźnych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku. Do badań rekrutowano chorych przyjmowanych do Kliniki w celu przeprowadzenia diagnostyki przewlekłego uszkodzenia wątroby. U pacjentów wykonywano badanie morfologii krwi obwodowej, oznaczenia aktywności enzymów funkcji wątroby, stężenie bilirubiny, glukozy, cholesterolu, trójglicerydów, żelaza, TIBC, ferrytyny oraz określano wysycenie transferyny w surowicy. Dla potrzeb analizy zdefiniowano w publikacjach biochemiczne wykładniki nadmiernego gromadzenia żelaza, oceniane w surowicy krwi. Serologiczne markery zakażenia wirusami zapalenia wątroby typu B (HBV) i C (HCV) były oznaczane z wykorzystaniem testów immunoenzymatycznych. Rozpoznanie zakażenia HCV opierało się o wykrycie przeciwciał anti-HCV w surowicy. Replikację HCV potwierdzano wykryciem obecności HCV RNA w surowicy testem PCR. W diagnostyce zakażenia HBV w surowicy pacjentów wykonywano oznaczenia serologiczne: HBsAg, HBeAg, przeciwciała anti-HBc i molekularne badanie metodą PCR potwierdzające obecność HBV DNA. Ustalenie rozpoznania etiologii choroby wątroby, w przypadkach innych niż związane z zakażeniami HBV, HCV, opierało się na wywiadzie uwzględniającym współistniejące choroby, spożycie alkoholu, narażenie na preparaty hepatotoksyczne (leki, narkotyki, inne związki chemiczne). Diagnostyka różnicowa uwzględniała również badania w kierunku choroby Wilsona i autoimmunologicznych chorób wątroby (autoimmunologiczne zapalenia wątroby, marskość żółciowa pierwotna) zgodnie z obowiązującymi zasadami. Szczegółową charakterystykę pacjentów przedstawiają poszczególne publikacje, będące podstawą rozprawy habilitacyjnej.

Ocenę histopatologiczną wycinków wątroby wykonywano w Zakładzie Patofizjologii Akademii Medycznej w Gdańsku (prof. Julian Stolarczyk; publikacja 1) oraz w Zakładzie Patologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (prof. Kazimierz Jaśkiewicz, dr Ewa Iżycka-Świeszewska; publikacje 2, 3, 4, 5). Natężenie gromadzenia złogów żelaza określano z wykorzystaniem metody półilościowej oceny depozytów żelaza, w skali punktowej od 0 do 4, w wycinkach wątroby, barwionych błękitem pruskim (0 – brak w hepatocytach, 1 – do 25% hepatocytów, 2 – 25-50% hepatocytów, 3 – 50-75% hepatocytów, 4 – >75%, masywne spichrzanie) [80].

Oznaczenia mutacji genu HFE z wykorzystaniem technik amplifikacji DNA metodą PCR i analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) przeprowadzono w Pracowni Diagnostyki Molekularnej Katedry Biotechnologii Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG-GUMed (kierownik dr hab. Krzysztof P. Bielawski; opis metody publikacja 2).

Badanie przydatności techniki rezonansu magnetycznego dla oceny spichrzania żelaza w wątrobie wykonano w Zakładzie Radiologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (dr n. med. Edyta Szurowska; publikacja 4).

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgody Niezależnej Komisji Bioetycznej Do Spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (NKEBN 443/2004, NKEBN 270/2010).

4. OMÓWIENIE WYNIKÓW

4.1. Występowanie zaburzeń gospodarki żelazowej w postaci nadmiernego jego gromadzenia u pacjentów z przewlekłymi chorobami wątroby

Zagadnienie to było przedmiotem analizy w publikacjach 1, 2, 3, 5. Przesłanką do przeprowadzenia tego badania był brak wcześniejszych systematycznych opracowań, określających częstość występowania objawów nadmiernego gromadzenia żelaza w populacji chorych na przewlekłe choroby wątroby, mieszkańców Polski, szczególnie w kontekście zmieniającej się epidemiologii zakażeń wirusami hepatotropowymi. Ocenę częstości występowania nadmiernego gromadzenia żelaza, w oparciu o histopatologiczne badanie wycinka wątroby, przeprowadzono metodą analizy retrospektywnej dokumentacji 351 chorych, hospitalizowanych z powodu przewlekłych chorób wątroby o różnej etiologii w Klinice Chorób Zakaźnych w Gdańsku, w latach 2000-2001 (publikacja 1). Potwierdzono stosunkowo częste tkankowe spichrzanie żelaza w tej grupie pacjentów. W 99/351 (28%) przypadkach opisano depozyty żelaza w hepatocytach, głównie o małym i umiarkowanym nasileniu (Fe 1-2 pkt. w ocenie półilościowej u 86/99; 87%), a w 45/92 (45%) towarzyszyło im nieprawidłowe, podwyższone stężenie żelaza w surowicy. W grupie tej dominowały osoby z rozpoznaniem przewlekłego zapalenia wątroby typu C (pzw C) (39/99; 40%). Ograniczeniem pracy był jej retrospektywny charakter i wynikający z tego brak wyników oznaczeń ferrytyny u wszystkich chorych (oznaczenie ferrytyny wykonano w 42/99 przypadkach). Przydatność stężenia ferrytyny i wysycenia transferyny jako mierników zawartości żelaza w organizmie jest w niektórych stanach chorobowych ograniczona. Znaczny wzrost stężenia ferrytyny, nawet >1000 ng/ml, przejściowo towarzyszyć może ostrym uszkodzeniom miąższowym wątroby lub ostrym stanom zapalnym. Podobnie wysycenie transferyny w ostrej reakcji zapalnej ulegać może obniżeniu, mimo, że nie dochodzi tu do faktycznego deficytu żelaza. Wzrost produkcji hepcydyny, silnie indukowany przez reakcję zapalną prowadzi do unieczynnienia ferroportyny, zahamowania eksportu żelaza z makrofagów i enterocytów, a w efekcie zmniejszenia dostępności żelaza dla patogenów chorobotwórczych [128]. W przewlekłych schorzeniach wątroby nie obserwuje się tak istotnych zaburzeń swoistości wymienionych parametrów, stąd wzrasta ich wartość diagnostyczna w ocenie zasobów żelaza. W świetle nierzadkiego wykrywania depozytów pierwiastka w hepatocytach, uzyskane wyniki wskazywały na potrzebę wprowadzenia do rutynowej diagnostyki chorób wątroby podstawowych parametrów biochemicznych, oceniających w surowicy stan gospodarki żelazem: stężenia żelaza, ferrytyny i wysycenia transferyny.

W kolejnych pracach, które miały charakter analiz przekrojowych i porównawczych, badano związek spichrzania żelaza w wątrobie, z wymienionymi wyżej wykładnikami

biochemicznymi gospodarki żelazem, oznaczanymi w surowicy u chorych z przewlekłymi chorobami wątroby. Obecność depozytów żelaza w hepatocytach istotnie korelowała ze wzrostem: stężeń żelaza, ferrytyny i wysycenia transferyny w surowicy, niezależnie od etiologii uszkodzenia wątroby (publikacja 2). W analizowanym materiale porównującym 182 pacjentów z przewlekłymi chorobami wątroby, w grupach z depozytami żelaza i bez depozytów, dominowali chorzy zakażeni wirusem zapalenia wątroby typu C (44/91; 48%). Tę obserwację tłumaczy nie tylko specyficzny profil diagnostyczno-leczniczy Kliniki Chorób Zakaźnych związany z opieką nad chorymi zakażonymi wirusami zapalenia wątroby. Blisko 50% udział chorych z pzw C, w grupie pacjentów z wykrytymi depozytami, potwierdza częste występowanie zaburzeń gospodarki żelazem, rozwijających się w przebiegu zakażenia HCV, także wśród polskich pacjentów. Ocenę częstości tych zaburzeń w większej liczebnie grupie chorych z pzw C przedstawiono w publikacji 3. Zaburzenia gospodarki żelazowej w grupie chorych z rozpoznaniem przewlekłego zapalenia wątroby typu C były wykrywane stosunkowo często, w ponad 40% przypadków, co jest liczbą nieco większą w porównaniu z danymi literaturowymi. Gromadzenie żelaza w hepatocytach miało charakter przeważnie łagodny lub umiarkowany ($Fe < 2$ pkt. w ponad 80% przypadków). Częstość występowania zaburzeń gospodarki żelazowej w pzw C nie różniła się jednak istotnie w porównaniu do grupy pacjentów z chorobą wątroby o innej etiologii. Na brak różnic wpłynął prawdopodobnie dobór grupy kontrolnej. W publikacji 3 do grupy kontrolnej włączano kolejnych 71 chorych diagnozowanych w Klinice Chorób Zakaźnych z powodu przewlekłej choroby wątroby, niezwiązanej z zakażeniem HCV. W grupie kontrolnej znalazło się 16 osób z objawami sugerującymi rozpoznanie hemochromatozy bądź z poprzetoczeniową hemosyderozą. W grupie kontrolnej dominowali ponadto chorzy z rozpoznaniem niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby (30/71, 42%), co także mogło mieć wpływ na większą częstość wykrywania podwyższonych stężeń, żelaza i ferrytyny w surowicy krwi. Takie obserwacje odnoszą się do zespołu insulinooporności, w którym zaburzenia metaboliczne prowadzą do rozwoju stłuszczenia wątroby, z towarzyszącym nadmiernym gromadzeniem żelaza (IRHIO, *insulin resistance hepatic iron overload*) [87,91]. Badania nad mechanizmami leżącymi u podłoża akumulacji żelaza w części przypadków NAFLD wykazały zmniejszenie ekspresji ferroportyny, jedyne go znanego białka zaangażowanego w eksport żelaza z komórek, w tym hepatocytów oraz spadek ekspresji hemojuweliny, kluczowego regulatora efektywnej syntezy hepcydyny [6].

Interesująca jest znaczna liczebność grupy pacjentów z rozpoznaniem dziedzicznej hemochromatozy w materiale badanym, opisanym w publikacji 2. Rozpoznanie to ustalono u 30/182 (16%) osób, z czego u 25/30 potwierdzono spichrzanie żelaza w wątrobie. Mimo, że przeprowadzono wśród mieszkańców Polski badania populacyjne oceniające występowanie mutacji genu HFE, nie wiadomo z jaką częstością rozpoznaje się dziedziczną

hemochromatozę, w tym szczególnie postać związaną z genem HFE [90,109]. W Polsce badano znaczenie patogenetyczne mutacji HFE w grupie chorych z rozpoznaniem cukrzycy typu 2, nie wykazując istotnego wpływu zmian genowych na zapadalność. Oceniano także zaburzenia gospodarki żelazowej wśród ambulatoryjnych pacjentów Kliniki Gastroenterologii, wykrywając je u 37 osób spośród 848 włączonych do analizy. W wyselekcjonowanej grupie 37 chorych troje było homozygotycznymi nosicielami mutacji C282Y [136]. Z kolei w grupie 178 pacjentów poddanych transplantacji wątroby hemochromatoza była rozpoznana w 3 przypadkach (1,7%) [96]. Choć niewydolność wątroby w przebiegu marskości narządu stanowi jeden z elementów schyłkowej fazy hemochromatozy, jednostka ta nie stanowi częstego wskazania do leczenia transplantacyjnego. Powodem tego może być nie tyle bardzo rzadkie jej występowanie, co współistniejąca niewydolność innych narządów (niewydolność serca, powikłania naczyniowe w przebiegu cukrzycy) oraz zaawansowanie pierwotnej choroby nowotworowej wątroby, dyskwalifikujące chorych z zabiegów przeszczepienia wątroby [40,74].

Wydaje się jednak, że właśnie patologia wątroby może najlepiej odzwierciedlać zaburzenia ogólnoustrojowej homeostazy żelaza, ze względu na rolę, jaką narząd ten odgrywa w jej regulacji. Szczegółowa diagnostyka uszkodzenia wątroby staje się prawdopodobnie najbardziej swoistym narzędziem, pozwalającym na wczesne wykrywanie dziedzicznej hemochromatozy, dzięki ujawnianiu się objawów choroby we wczesnym jej stadium. Stąd uzasadnione było przesłedzenie zaburzeń gospodarki żelazowej w grupie pacjentów z przewlekłymi chorobami wątroby. Niespodziewanie częste rozpoznanie hemochromatozy w tej grupie chorych wynikało także z faktu częstego poddawania się tych chorych pełnej procedurze diagnostycznej, z biopsją wątroby, pomimo jej inwazyjności. Znaczne nieprawidłowości w badaniach laboratoryjnych krwi, sugerujące nadmierne gromadzenie żelaza, a towarzyszące uszkodzeniu wątroby, stanowiły bowiem, przy braku dostępnych rutynowo badań genetycznych, wskazanie do potwierdzenia tkankowego spichrzenia żelaza, by ustalić pewne rozpoznanie i podjąć właściwe leczenie.

Publikacja 5 dotyczyła zagadnienia patologicznego gromadzenia żelaza w marskości wątroby. Potwierdzono częste występowanie zarówno biochemicznych (badanych we krwi), jak i ocenianych w tkance wątroby wykładników nadmiaru żelaza. Parametry te stwierdzano częściej w porównaniu z grupą kontrolną (inne choroby wątroby) i były one jednym z niezależnych predyktorów marskości wątroby. Częściej też biochemicznym nieprawidłowościom towarzyszyło gromadzenie depozytów żelaza w hepatocytach, mimo że nierzadko satysfakcjonująca ocena histopatologiczna zawartości żelaza w wycinkach wątroby, pobranych od chorych z marskością, jest utrudniona ze względu na nasilone włóknienie i nierównomierny rozkład depozytów żelaza w hepatocytach. Choć liczebność grupy była ograniczona, wyniki obserwacji stanowią cenną wskazówkę w kontekście kwalifikacji

pacjentów z marskością wątroby do leczenia transplantacyjnego. Badania wskaźników przeżycia po przeszczepieniu wątroby wskazują na większe ryzyko wystąpienia poważnych i zagrażających życiu komplikacji u pacjentów z zespołem patologicznego gromadzenia żelaza [7,28,51,54,116,117]. Wykazano, że zmniejszanie zasobów żelaza u chorych z marskością wątroby, najbardziej możliwe na etapie wyrównania funkcji narządu, zmniejsza ryzyko zakaźnych i kardiologicznych komplikacji po zabiegu przeszczepienia wątroby, w dalszej perspektywie ma poprawić wskaźniki przeżycia [40]. Dlatego tak ważna jest w marskości wątroby kompletna i szczegółowa diagnostyka stwierdzanych nieprawidłowości w gospodarce żelazem, mimo że wielu autorów interpretuje obecność depozytów żelaza w wątrobie jedynie jako wykładnik zaawansowania choroby wątroby, a nie wyraz utrwalonych zaburzeń ogólnoustrojowej homeostazy.

4.2. Występowanie mutacji genu HFE w populacji chorych na przewlekłe choroby wątroby

Stwierdzenie stosunkowo częstego występowania zaburzeń gospodarki żelazem, wśród chorych obserwowanych z powodu przewlekłych chorób wątroby, stanowiło przesłankę do przeprowadzenia badań określających częstość występowania mutacji genu HFE w tej grupie pacjentów. Ich wyniki opisano w publikacjach 2, 3, 5, 6. Wstępne opracowanie zagadnienia występowania mutacji genu HFE w populacji chorych na przewlekłe choroby wątroby, mieszkańców Pomorza, leczonych w Klinice Chorób Zakaźnych AMG, wskazywało na to, że różne mutacje genu HFE, nie tylko z definicji związane z rozpoznaniem dziedzicznej hemochromatozy, występują częściej we wspomnianej pacjencie w porównaniu z wynikami badań populacyjnych, przeprowadzonych w Polsce na Śląsku i Pomorzu Zachodnim [99,100,115]. Przedstawione wyniki potwierdzały istotną wartość skryningu biochemicznego w wykrywaniu dziedzicznej hemochromatozy u pacjentów z przewlekłą chorobą wątroby. Wskazywały też na zasadność wykonywania, w ramach rutynowej diagnostyki uszkodzenia wątroby, oznaczeń podstawowych biochemicznych parametrów gospodarki żelazowej.

Badania, w których określano częstość występowania różnych mutacji genu HFE kontynuowane w liczniejszych grupach także dowodziły pozytywnej selekcji nosicieli tych mutacji wśród pacjentów z przewlekłymi chorobami wątroby. W badanej grupie liczącej 182 osoby z rozpoznaniem przewlekłych chorób wątroby o różnej etiologii mutacje genu HFE wykryto łącznie u 86 osób (47%), w podgrupie ze stwierdzanymi depozytami w hepatocytach u 60/91 osób (66%), w grupie bez depozytów u 36/91 osób (40%) (publikacja 2). Wśród chorych z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C nosiciele dzikich alleli wolnych od mutacji, w liczbie 88, stanowili zaledwie 58% grupy badanej (publikacja 3). Tak wyraźna pozytywna selekcja nosicieli mutacji w grupie chorych z przewlekłą patologią wątroby

skłania do przekonania o możliwym patogenetycznym związku chorób wątroby z mutacjami genu HFE. Szczególnie interesująca jest analiza tego związku w oparciu o prospektywne badanie obserwacyjne, śledzenie tempa rozwoju odległych następstw przewlekłej patologii wątroby: marskości wątroby, raka wątrobowokomórkowego, które kontynuują w wybranych grupach pacjentów.

W badanej przez mnie grupie chorych z marskością wątroby o różnej etiologii także obserwowano pozytywną selekcję nosicieli homozygotycznej mutacji HFE C282Y/C282Y w porównaniu z wynikami wcześniej cytowanych badań populacji ogólnej, z terenów Pomorza Zachodniego i Śląska (publikacja 5, 6). Stwierdzenie biochemicznych lub tkankowych wykładników spichrzania żelaza, co nie jest rzadką obserwacją kliniczną w marskości wątroby, uzasadnia wykonanie badań pozwalających na jednoznaczne ustalenie etiologii tych zaburzeń, rozstrzygnięcia czy ich charakter jest pierwotny, uwarunkowany genetycznie, ogólnoustrojowy, czy wtórny, ograniczony tylko do narządu (wątroby).

Z grupy 61 pacjentów z marskością wątroby o różnej etiologii, wyodrębniono niewielką liczebną grupę chorych (n=16), obciążonych dodatkowo rozpoznaniem raka wątrobowokomórkowego, w większości przypadków (14/16) na etapie znacznego zaawansowania choroby nowotworowej, które było powodem dyskwalifikacji z leczenia transplantacyjnego. Mimo tego, że we wszystkich przypadkach marskości z towarzyszącymi mutacjami C282Y/C282Y i C282Y/H63D rozwinął się nowotwór wątroby, istotna statystycznie zależność pomiędzy rozpoznaniem raka wątrobowokomórkowego, a występowaniem różnych zmutowanych alleli HFE wśród chorych z marskością wątroby nie została potwierdzona. Może to wynikać ze zbyt małej liczebności grupy i faktu, że analiza miała charakter badania przekrojowego. Przedstawione wyniki wymagają z pewnością dalszej weryfikacji. Boige V i wsp. nie potwierdzali, w oparciu o badanie obejmujące 133 chorych, jakoby mutacje C282Y i H63D stanowiły czynnik ryzyka wystąpienia raka wątrobowokomórkowego u chorych z rozpoznaniem marskości wątroby [20]. Z kolei Nahon i wsp. opublikowali wyniki obserwacji 301 chorych także z marskością wątroby (średni czas obserwacji od momentu rozpoznania marskości wątroby 66,1 (±45,1) miesięcy dla osób z alkoholową chorobą wątroby; 85,5 (±42,1) miesięcy dla osób z pzw C) stwierdzając, że gromadzenie żelaza w wątrobie i mutacja C282Y były związane z większym ryzykiem rozwoju HCC, ale tylko u chorych z ALD (*alcoholic liver disease*) [93]. Metaanaliza, która objęła między innymi 50 obserwacji przekrojowych 6969 przypadków chorych z chorobami wątroby o różnej etiologii i na różnym etapie zaawansowania i 41017 osób z grup kontrolnych, a której celem było opisanie związku genotypów HFE hemochromatozy z ryzykiem rozwinięcia się 31 różnych chorób, potwierdziła związek mutacji C282Y/C282Y z wystąpieniem HCC (iloraz szans=11; przy 99% przedziale ufności zakres 3,7-34). Iloraz szans wystąpienia choroby wątroby u homozygotycznego nosiciela mutacji C282Y/C282Y

wynosił 3,9, w zróżnicowaniu zależnie od patologii wątroby od 4 do 11 (wśród chorób wątroby wymieniono przewlekłe zapalenie wątroby typu C, niealkoholową chorobę stłuszczeniową wątroby, raka wątrobowokomórkowego) [46].

Publikacje 2, 3, 5 są prezentacją wyników badania mutacji S65C w grupach chorych z patologią wątroby, jedyne wykonane wśród mieszkańców Polski. Wykrywana była ona z częstością 2,2%, co odpowiada wynikom uzyskanym w badaniach populacyjnych w Europie. Powiązanie tej mutacji z zaburzeniami gospodarki żelazem pozostaje dyskusyjne. W grupie chorych z pzw C częstość jej występowania była podobna do stwierdzanej w grupie kontrolnej.

Związek mutacji H63D, S65C z gromadzeniem depozytów żelaza w wątrobie w przewlekłych chorobach tego narządu jest dyskutowany. W przypadku chorób o innej, niż zakażenie HCV, etiologii, część autorów potwierdza tę korelację [4,50,61,113].

Ciekawą obserwacją kliniczną jest fakt wykrycia, w materiale przeze mnie opracowanym, (i) heterozygotycznej mutacji S65C u młodej kobiety w wywiadzie podającej leczenie z powodu anemii aplastycznej z rozpoznaniem hemosyderozy po wielokrotnych przetoczeniach krwi, (ii) w postaci mieszanej S65C/H63D u pacjenta z wieloletnią obserwacją marskości wątroby o nieustalonej etiologii oraz (iii) w 1 przypadku u chorego z pzw C, powikłanym porfirią skórną późną i rozwojem raka wątrobowokomórkowego przed dokonaniem marskości wątroby.

Poszukiwanie genetycznego tła wykrywanych zaburzeń gospodarki żelazem ma sens w kontekście podejmowania decyzji terapeutycznych. Wykrycie takiego dodatkowego czynnika genetycznego, który może potencjalnie odpowiadać za gromadzenie żelaza, co sugerowane jest w przypadku występowania innych niż C282Y/C282Y mutacji genu HFE u chorych z przewlekłą chorobą wątroby i towarzyszącymi objawami spichrzania żelaza, nie tylko otwiera możliwość wykorzystania formy leczenia zmniejszającego jego wewnątrzustrojowe zasoby poprzez upusty krwi. Zidentyfikowanie czynnika genetycznego pociągające za sobą wybór określonej opcji terapeutycznej, ma także znaczenie prognostyczne ze względu na to, że wykazywany jest związek nadmiernego gromadzenia żelaza z większym ryzykiem szybszego rozwoju miażdżycy naczyń, wystąpienia niektórych nowotworów złośliwych (piersi, jelita, wątroby) i chorób neurodegeneracyjnych oraz ze wzrostem podatności na zakażenia o różnej etiologii i ciężkim przebiegu [128].

4.3. Znaczenie badań histopatologicznych i obrazowania metodą rezonansu magnetycznego w diagnostyce zespołów nadmiernego gromadzenia żelaza

4.3.1. Badanie histopatologiczne

Ilościowe oznaczenie zawartości żelaza w biopercie wątroby (HIC, *hepatic iron concentration*) metodą spektrofotometryczną uchodziło za złoty standard diagnostyczny, szczególnie przed wprowadzeniem testów genetycznych [17]. Wykorzystywano także wskaźnik uwzględniający wiek pacjenta w szacowaniu zasobów żelaza (HII, *hepatic iron index*; HIC/wiek) [107]. Histopatolodzy używają różnych skal określających obecność żelaza w hepatocytach, komórkach układu siateczkowo-śródbłonkowego, komórkach zatok. Najbardziej rozbudowana jest wielopunktowa klasyfikacja Deugniera, pozwalająca na obliczenie wskaźnika TIS (*total iron score*), charakteryzującego się dobrą korelacją z HIC [41]. W tej klasyfikacji punktowej uwzględnia się obecność i gradient depozytów żelaza, osobno w hepatocytach, komórkach zatok i elementach przestrzeni wrotnych: tkance łącznej, kanalikach żółciowych i ścianach naczyń. Dużą przydatnością kliniczną cechują się jednak mniej rozbudowane skale klasyfikujące ilość żelaza od 0 do 4 punktów zasadniczo w hepatocytach [32,123]. Szczegółowego porównania skal punktowych podjął się Lee [80].

Ocena histopatologiczna wycinka wątroby dostarcza informacji służących określeniu typu spichrzenia pierwiastka oraz stopnia zaawansowania choroby rozwijającej się w następstwie patologicznego gromadzenia żelaza.

Dla określenia przydatności badania histopatologicznego, w wykrywaniu depozytów żelaza i wyjaśnianiu ich etiologii, uwzględniano w moich badaniach jedynie gromadzenie żelaza w hepatocytach, gdyż te komórki służą jako najważniejszy i najbardziej swoisty magazyn żelaza, w sytuacji gdy jego zasoby w organizmie przekraczają zapotrzebowanie. Gromadzenie żelaza w makrofagach, komórkach zatok, kanalikach żółciowych i ścianach naczyń częściej bywa wtórne do procesów uszkodzeniowych i zapalno-martwiczych w wątrobie oraz transfuzji krwi. Przedstawione w publikacjach 2, 3 wyniki potwierdzały związek obecności i natężenia gromadzenia depozytów żelaza w hepatocytach z przekraczającymi górny zakres normy stężeniami żelaza, ferrytyny oraz wysyceniem transferyny. Depozyty żelaza stanowiły także marker prognostyczny w odniesieniu do mutacji genu HFE. W grupie z depozytami nosiciele obu dzikich alleli występowały istotnie rzadziej. Wynikało to z częstszego wykrywania allelu C282Y w grupie z depozytami. Porównywane grupy nie różniły się istotnie częstością występowania allelu H63D. Spostrzegana korelacja wyników badań biochemicznych, histopatologicznych i genetycznych potwierdza przydatność kliniczną badania, opartego o prostszą klasyfikację punktową niż tę zaproponowaną przez Deugniera i wsp. z obliczaniem TIS, w różnicowaniu pierwotnych i wtórnych zespołów

gromadzenia żelaza. Podobnie autorzy innych opracowań wykazali korelację biochemicznych wykładników gromadzenia żelaza z obecnością złogów żelaza w wątrobie, ocenianych półilościowo wśród chorych z rozpoznaniem przewlekłego zapalenia wątroby typu C i osób z chorobą wątroby, nadużywających alkoholu [44,84,88]. W pracach tych nie odnoszono się do związków mutacji HFE z natężeniem gromadzenia żelaza w hepatocytach. Wiele publikacji przedstawia wyniki badań oceniających możliwy wpływ mutacji genu HFE na rozwój zaburzeń gospodarki żelazem poprzez ocenę jej parametrów badanych we krwi. Wpływ na uzyskiwane wyniki i stan wiedzy ma zróżnicowanie częstości występowania mutacji genu HFE, niespotykanych w populacji Afroamerykanów czy Azjatów. Szwedzcy autorzy analizowali związek mutacji S65C z nadmierną akumulacją żelaza, wykazując u 6/7 badanych nosicieli tej mutacji niewielkie lub umiarkowane jego gromadzenie [12]. Bonkovsky i wsp. opublikowali wyniki obserwacji, którą objęto najliczniejszą jak dotąd grupę chorych z pzw C (n=1145; Afroamerykanie stanowili 15%) z zaawansowanym włóknieniem (>2). Stwierdzono silną korelację surowiczych wykładników nadmiaru żelaza z depozytami pierwiastka w wątrobie oraz związek obu tych czynników z występowaniem mutacji genu HFE. Wykazano wiarygodność półilościowej oceny zawartości żelaza w tkance [24].

Szczególnie ważną informacją z klinicznego punktu widzenia było wykrycie w badanej przeze mnie grupie w wieku < 40 r.ż. mutacji C282Y/C282Y wyłącznie u osób, u których stwierdzano depozyty żelaza w hepatocytach (w tym także o niewielkim nasileniu ich gromadzenia). Wraz z upływem lat i wydłużaniem życia badanych osób bardziej prawdopodobny staje się wpływ innych czynników (alkohol, zakażenia, dieta), nie tylko uwarunkowań genetycznych, na rozwój spichrzania żelaza w komórkach wątroby. Tym bardziej uzyskane wyniki przekonują do czujnej interpretacji stwierdzanych zaburzeń gospodarki żelazowej i korzystania zarówno z prostej metody, stanowiącej element oceny histologicznej – barwienia bioptatu wątroby na obecność żelaza z półilościową oceną jego zawartości, jak i badania genetycznego.

4.3.2. Badanie MRI

Biopsja wątroby jest badaniem inwazyjnym, obciążonym ryzykiem błędu próby, wynikającym z niejednorodności struktury narządu i zmiennej wielkości wycinka. Nową, nieinwazyjną metodą pozwalającą oceniać zawartość żelaza w wątrobie jest obrazowanie przy użyciu techniki rezonansu magnetycznego (MRI, *magnetic resonance imaging*) [57]. Czułość metody wynosi około 89%, a swoistość 80%.

W publikacji 4 skupiono się na ocenie przydatności klinicznej tej techniki, w grupie chorych z marskością wątroby. W sytuacji znacznego zaawansowania włóknienia wątroby maleje szansa na uzyskanie reprezentatywnego wycinka (uzyskuje się często materiał

rozkawałkowany), wzrasta też ryzyko powikłań krwotocznych biopsji wątroby. Analizę przeprowadzono w oparciu o wyniki obserwacji 44 chorych z rozpoznaniem marskości wątroby o różnej etiologii, u których dokonano półilościowej oceny zawartości żelaza w badaniu histopatologicznym oraz w badaniu MRI. Metoda echa gradientowego okazała się wartościowa w rozpoznawaniu akumulacji żelaza w tkance wątroby. Sekwencja GRE T2-zależna wykazała się dużą swoistością w różnicowaniu stopnia nasilenia spichrzenia żelaza w wątrobie. Badanie MRI stanowić może, w określonych sytuacjach klinicznych (zaawansowane włóknienie wątroby, marskość wątroby, przeciwwskazania do biopsji wątroby), alternatywę dla badania diagnostycznego, oceniającego zawartość żelaza w wycinku wątroby, pobranym drogą biopsji przezskórnej. Istotnym ograniczeniem w upowszechnieniu użycia tego badania jest jego koszt.

4.4. Ocena wpływu zaburzeń gospodarki żelazowej i mutacji genu HFE na przebieg przewlekłego zapalenia wątroby typu C w kontekście postępu choroby i efektywności leczenia przeciwwirusowego

Badania nad związkiem mutacji genu HFE z przebiegiem przewlekłego zapalenia wątroby typu C wśród mieszkańców Pomorza zostały opisane w publikacjach 3, 5, 7, 8. W publikacji 3 przedstawiono wyniki badania, oceniającego między innymi częstość występowania mutacji HFE w grupie pacjentów, mieszkańców Polski, z rozpoznaniem przewlekłego zapalenia wątroby typu C. Nosiciele alleli C282Y występowały dwukrotnie rzadziej wśród zakażonych HCV, w porównaniu z grupą kontrolną, do której włączano kolejnych pacjentów z przewlekłą patologią wątroby, niezwiązaną z zakażeniem HCV. Niemniej w porównaniu z wynikami badań populacji zdrowej z Pomorza Zachodniego i Śląska wyraźny był trend do częstszego wykrywania mutacji, o najistotniejszym klinicznym znaczeniu: C282Y/C282Y i C282Y/H63D, w grupie zakażonych HCV. Takich różnic nie wykazano dla mutacji H63D.

Zaburzeniom gospodarki żelazem w grupie zakażonych HCV odpowiadała wyższa aktywność ALT, jako wykładnika uszkodzenia hepatocytów. Nie korelowały one natomiast z aktywnością zapalną ocenianą w badaniu histopatologicznym wycinka wątroby (publikacja 3). Brak wyraźnego związku wykładników nadmiaru żelaza, wykrywanych w surowicy, z histopatologicznie ocenianym zapaleniem wątroby może wynikać przynajmniej z dwóch przyczyn. Najsilniejszym induktorem zapalenia pozostaje samo zakażenie HCV i rozwijająca się w jego następstwie złożona odpowiedź immunologiczna. Patogenne działanie żelaza w chorobach wątroby wynika głównie z bezpośredniej cytotoksyczności, indukcji stresu oksydacyjnego i stymulacji fibrogenyzy, na pewno na etapie niezaawansowanego spichrzenia.

Intensyfikacja procesu zapalnego w wątrobie, będąca efektem patologicznego gromadzenia żelaza, ma miejsce dopiero w sytuacji znacznego nasilenia hemosyderozy [29,108].

Stopień włóknienia wątroby korelował z występowaniem podwyższonych wartości parametrów gospodarki żelazem w surowicy. Znaczenie patologicznego spichrzania dla przebiegu pzw C jest odmiennie określane przez różnych autorów. Większość z nich dowodzi istotnego wpływu nadmiernej akumulacji żelaza w wątrobie na postęp włóknienia narządu [23,63,97]. W pracy opublikowanej w 2007 r., w której objęto obserwacją ponad 500 chorych z pzw C, po analizie wpływu na rozwój włóknienia wielu czynników (płeć, wiek, czas zakażenia HCV, spożycie alkoholu, współistnienie zespołu metabolicznego), Guyader i wsp. uznali, że nadmiar żelaza nie stanowi sam w sobie niezależnego czynnika profibrogennego, jest natomiast elementem choroby towarzyszącym bardzo aktywnemu procesowi zapalno-martwiczemu i nasilonemu włóknieniu. Autorzy ci jednak w analizie nie dokonywali rozdziału żelaza na gromadzone w hepatocytach, sinusoidalne i mezenchymalne, posługiwali się skumulowanym wskaźnikiem TIS (*total iron score*), wyliczonym po zsumowaniu punktacji za obecność depozytów w wymienionych trzech przedziałach [63].

Wydaje się, że rokowniczą ocenę znaczenia wpływu nadmiaru żelaza na progresję włóknienia wątroby należy indywidualizować, zależnie od charakteru zaburzeń gospodarki żelazowej. Niewątpliwie czynniki genetycznie predysponujące do spichrzania żelaza zmieniają obraz kliniczny pzw C i tempo rozwoju niepomyślnych następstw. Diwakaran i wsp. wykazali, że pacjenci zakażeni HCV z potwierdzonym rozpoznaniem dziedzicznej hemochromatozy, byli młodsi i prezentowali mniej nasilone gromadzenie żelaza w wątrobie w momencie rozpoznania marskości [43]. Ponadto należy różnicować patogenne działanie puli żelaza krążącego w surowicy od żelaza magazynowanego w hepatocytach i jego niezwiązanej puli komórkowej [33,82]. Istotne jest określanie stanu gospodarki żelazowej w oparciu o komplet biochemicznych wykładników (stężenie żelaza, ferrytyny i wysycenie transferyny), badanych w surowicy i zasoby żelaza gromadzone w tkance. Jak wspomniano wcześniej oksydacja jonów żelazawych Fe^{2+} i zwiążanie z ferrytyną jest mechanizmem chroniącym komórki przed toksycznym działaniem żelaza wolnego. W badanej przeze mnie grupie pacjentów z pzw C obecność depozytów żelaza w hepatocytach korelowała z podwyższonymi: stężeniem żelaza, ferrytyny i wysyceniem transferyny w surowicy. Depozyty żelaza oceniane w skali punktowej na >2 stwierdzano jedynie u 10/138 chorych poddanych biopsji wątroby. W przeważającej liczbie grupie gromadzenie żelaza było mało lub umiarkowanie nasilone. Nie obserwowano związku natężenia zapalenia czy włóknienia z obecnością depozytów żelaza. Wydaje się więc, że jeśli istnieje związek przyczynowo-sprawczy pomiędzy nadmiarem gromadzonego żelaza, a postępem włóknienia wątroby, to jest on bardziej zależny od zaburzonej homeostazy żelaza w surowicy niż obecności depozytów w hepatocytach, w sytuacji gdy ich gromadzenie nie jest zaawansowane. Należy

jednak pamiętać o ograniczeniach histopatologicznej metody oceniającej zawartość żelaza w hepatocytach biopsatu wątroby w bardzo zaawansowanym włóknieniu wątroby, o czym pisałam wcześniej (pkt.2).

W grupie chorych z rozpoznaniem pzw C, mieszkańców Pomorza, opisanych w publikacjach (publikacje 3, 5) wykazano, że mutacje genu HFE nie są głównym czynnikiem determinującym zaburzenia homeostazy żelaza, obserwowane w tej chorobie.

W badanej grupie zakażonych HCV jedynie u nosicieli allelu C282Y, zarówno heterozygotycznych jak i homozygotycznych, wykazano istotne podwyższenie stężenia żelaza, ferrytyny i wysycenia transferyny w surowicy. Ta korelacja silnie wpływała też na brak związku parametrów nadmiernego gromadzenia żelaza ocenianych w surowicy z nosicielstwem dzikich alleli genu HFE. Rola innych genotypów HFE w rozwoju zaburzeń gospodarki żelazem w pzw C nie jest tak jednoznacznie określona. Wyniki badań prezentowanych przez różnych autorów często są przeciwstawne [59,60,118,120,122]. Niepodważalny pozostaje niekorzystny rokowniczo wpływ współistnienia mutacji C282Y/C282Y na przebieg pzw C [43], (publikacja 8). W przedstawionym materiale badanym, obejmującym chorych zakażonych HCV związek mutacji genu HFE z gromadzeniem żelaza w hepatocytach wykazano wyłącznie dla homozygot C282Y/C282Y.

Wyniki prezentowanych badań nie potwierdziły związku mutacji genu HFE z nasileniem aktywności zapalnej, zaawansowaniem włóknienia w grupie chorych z pzw C. Natomiast nosiciele mutacji genu HFE, nie tylko genotypu hemochromatozy dziedzicznej, okazali się być częściej nieskutecznie leczonymi przeciwwirusowo interferonem i rybawiryną (publikacja 3, 8). Te wyniki nie w pełni korespondują z obserwacjami części autorów, którzy sugerują przeciwnie, uznanie mutacji H63D za element korzystnego profilu immunologicznego, warunkującego efektywność terapii interferonem [24,78]. W badanej przeze mnie grupie pacjentów zakażonych HCV, u 23/56 nosicieli wyłącznie mutacji H63D stwierdzano surowicze zaburzenia gospodarki żelazowej. 16/47 chorych było skutecznie, a 31/47 nieskutecznie przeleczonych i w tej drugiej grupie istotnie częściej stwierdzano podwyższone parametry żelazowe w surowicy (3/16 vs 20/31; $p < 0.05$, $\chi^2 = 7.11$) (9 chorych nie było kwalifikowanych do leczenia). Wynika z tego, że wpływu mutacji H63D na skuteczność leczenia interferonem i rybawiryną nie można rozpatrywać w oderwaniu od występowania lub nie cech nadmiernego gromadzenia żelaza. Allel H63D występuje w populacji kaukaskiej stosunkowo często, nie zaobserwowano większej częstości wykrywania tej mutacji wśród osób z chorobami wątroby. Tylko u części nosicieli obserwuje się zaburzenia gospodarki żelazowej, zmiana bowiem konformacji białka HFE w wyniku tej mutacji nie wpływa tak silnie na zaburzenia jego funkcji. W badanej grupie z pzw C, mieszkańców Pomorza, podwyższone stężenia żelaza, ferrytyny i wysycenia transferyny w surowicy były negatywnym prognostycznie czynnikiem w odniesieniu do powodzenia

leczenia przeciwwirusowego. Wymienieni wcześniej autorzy postulujący korelację mutacji H63D z dobrym efektem leczenia przeciwwirusowego dokonywali analizy bez rozdzielania na grupy chorych według nieprawidłowości parametrów żelazowych. Jednoznaczne ustalenie wpływu H63D na odpowiedź na leczenie przeciwwirusowe w relacji do zaburzeń gospodarki żelazowej wydaje się pożądane w kontekście terapii personalizowanej i dostępu do nowych leków (inhibitorów proteazy). Dodane do standardowej terapii interferonem i rybawiryną istotnie zwiększają wskaźnik SVR, są jednak bardzo kosztowne. Zapewne w najbliższym czasie nie będzie możliwe zastosowanie ich u wszystkich pacjentów, a raczej w grupie odpowiednio wyselekcjonowanej.

Publikacja nr 7 stanowi przegląd wyników badań eksperymentalnych i obserwacji klinicznych konsekwencji patologicznego gromadzenia żelaza w przewlekłym zapaleniu wątroby typu C.

4.5. Perspektywa dalszych badań

Szczególnym zainteresowaniem objęto problem związku patogenezy przewlekłego zapalenia wątroby typu C z nadmiernym gromadzeniem żelaza w kontekście jego uwarunkowań genetycznych, nie tylko zależnych od mutacji genu HFE, wpływu na replikację wirusa HCV, nasilenie stresu oksydacyjnego w tkance wątroby i skuteczność leczenia przeciwwirusowego. Artykuł opisujący korelację stłuszczenia wątroby z nadmiernym gromadzeniem żelaza w przewlekłym zapaleniu wątroby typu C oczekuje na recenzję. Praca poddająca analizie ekspresję hepcydyny i oksygenazy hemu w tkance wątroby w odniesieniu do zaburzeń gospodarki żelazem i nasilenia zmian chorobowych u chorych z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C, jako prezentacja posterowa została nagrodzona na Ogólnopolskim Kongresie Biochemii i Biologii Komórki w 2011 roku. Obecnie jest przygotowywana do publikacji w czasopiśmie. Kontynuację prac stanowi projekt zatytułowany „Badanie związku polimorfizmu genu IL28-B z zaburzeniami homeostazy żelaza w przewlekłym zapaleniu wątroby typu C, w odniesieniu do przebiegu choroby i skuteczności leczenia przeciwwirusowego”, finansowany przez NCN (2011/01/B/NZ6/00320), którego realizację jako kierownik rozpoczęłam w styczniu 2012 roku.

5. PODSUMOWANIE

Zaburzenia gospodarki żelazem wskazujące na jego nadmierne gromadzenie w postaci nieprawidłowości stwierdzanych zarówno w surowicy jak i w tkance nie są rzadką obserwacją u chorych z przewlekłymi chorobami wątroby. Ze względu na kluczową rolę pełnioną przez wątrobę w regulacji homeostazy żelaza podstawowe badania gospodarki żelazowej wykonywane u pacjentów z przewlekłymi chorobami tego narządu zwiększają szansę na wczesne wykrycie patologicznego gromadzenia pierwiastka, jeśli jest ono uwarunkowane genetycznie. Ma to znaczenie prognostyczne, gdyż pozwala na wczesne podjęcie odpowiedniego leczenia, zapobiegającego rozwinięciu się zaawansowanego uszkodzenia wielu narządów. Częstość wykrywania w badanym materiale mutacji genu HFE, najważniejszej dla patogenezy dziedzicznej hemochromatozy, uzasadnia zwiększenie dostępności do badania genetycznego. Rozważenie wskazań do leczenia zmniejszającego zasoby żelaza powinno uwzględniać niekorzystny wpływ nadmiernej akumulacji żelaza na rozwój patologii także innych narządów poza wątrobą, postęp miażdżycy, zwiększone ryzyko karcynogenezy i upośledzenie sprawności mechanizmów odpornościowych w zwalczaniu zakażeń. Częste występowanie patologicznego gromadzenia żelaza w przewlekłym zapaleniu wątroby typu C, niejednoznaczna opinia na temat związku tych zaburzeń z postępem choroby i efektami leczenia przeciwwirusowego wskazuje na potrzebę intensyfikacji badań, mających na celu pełne zrozumienie mechanizmów wspomnianej patologii i poprawę efektywności leczenia przewlekłej aktywnej choroby wątroby, także z uwzględnieniem dodatkowych terapii alternatywnych (ograniczenie postępu patologicznego spichrzania żelaza). Otwierają się tym samym perspektywy dla badań zaburzeń gospodarki żelazem w kontekście jego związków z mechanizmami odpornościowymi i biologią drobnoustrojów chorobotwórczych.

6. WNIOSKI

U wszystkich chorych obserwowanych z powodu przewlekłych chorób wątroby o różnej etiologii należy wykonywać badania biochemiczne oceniające stan gospodarki żelazowej (stężenie żelaza, ferrytyny i wysycenie transferyny w surowicy).

U chorych poddawanych biopsji wątroby badanie histopatologiczne powinno uwzględniać barwienie wycinka na obecność depozytów żelaza.

Konieczne jest zapewnienie dostępności do badania genetycznego w kierunku HFE-hemochromatozy, tak aby stało się elementem rutynowej diagnostyki w przewlekłych chorobach wątroby z towarzyszącymi objawami nadmiernego gromadzenia żelaza. Pozwoli to na wczesne rozpoznanie choroby i podjęcie skutecznego leczenia przed rozwinięciem się nieodwracalnego uszkodzenia narządów. Identyfikacja osób dotkniętych zaburzeniami metabolizmu żelaza uwarunkowanymi genetycznie umożliwi określenie rozmiaru potrzeb przeprowadzania badań przesiewowych wśród członków ich rodzin zgodnie z zaleceniami towarzystw naukowych, a w dalszej kolejności objęcie długofalową opieką medyczną wybranych osób z wykrytym defektem genetycznym, a nieprezentujących jeszcze, rozwijającego się w jego konsekwencji, pełnoobjawowego zespołu chorobowego.

Badania oceniające częstość występowania mutacji genu HFE w populacji chorych z chorobami wątroby – narządu pełniącego ważne funkcje w systemie immunologicznym, wytyczają nowe kierunki w pracy badawczej nad znaczeniem mutacji genu HFE i zaburzeń gospodarki żelazem w regulacji reakcji odpornościowych.

Potwierdzona przydatność obrazowania metodą rezonansu magnetycznego w ocenie patologicznego gromadzenia żelaza uzasadnia jego wykorzystanie jako badania nieinwazyjnego, szczególnie w przypadkach choroby wątroby z zaawansowanym włóknieniem i przy przeciwwskazaniach do biopsji wątroby.

Wyniki obserwacji pacjentów kwalifikowanych do leczenia z powodu przewlekłego zapalenia wątroby typu C, prezentujących objawy nadmiernego gromadzenia żelaza uzasadniają rekomendowanie badań molekularnych w kierunku mutacji genu HFE w tej grupie chorych, głównie w celu wykluczenia mutacji C282Y/C282Y.

Częstość występowania objawów nadmiernego gromadzenia żelaza u pacjentów z przewlekłymi chorobami wątroby skłania do uwzględnienia terapii zmniejszającej zasoby żelaza (upustów krwi) w standardzie postępowania terapeutycznego, a także do podjęcia prospektywnych badań obserwacyjnych tak leczonych pacjentów.

Ze względu na ograniczony dostęp do diagnostyki genetycznej hemochromatozy wskazane jest umieszczenie badania mutacji HFE w pakiecie badań kosztochłonnych możliwych do wykonania w ramach odrębnych funduszy kontraktowanych przez NFZ.

7. PIŚMIENICTWO

1. Adam R., McMaster P., O'Grady J. G., Castaing D., Klempnauer J. L., Jamieson N., Neuhaus P., Lerut J., Salizzoni M., Pollard S., Muhlbacher F., Rogiers X., Garcia Valdecasas J. C., Berenguer J., Jaeck D., Moreno Gonzalez E.: European Liver Transplant Association. Evolution of liver transplantation in Europe: report of the European Liver Transplant Registry. *Liver. Transpl.* 2003, 9, 1231-1243.
2. Adams P., Brissot P., Powell L. W.: EASL International Consensus Conference on Haemochromatosis. *J. Hepatol.* 2000, 33, 485-504.
3. Adams P. C.: Iron overload in viral and alcoholic liver disease. *J. Hepatol.* 1998, 28, 19-20.
4. Aguilar-Martinez P., Bismuth M., Picot M. C., Thelcide C., Pageaux G. P., Blanc F., Blanc P., Schved J. F., Larrey D.: Variable phenotypic presentation of iron overload in H63D homozygotes: are genetic modifiers the cause? *Gut* 2001, 48, 836-842.
5. Ahmad K. A., Ahmann J. R., Migas M. C., Waheed A., Britton R. S., Bacon B. R., Sly W. S., Fleming R. E.: Decreased liver hepcidin expression in the Hfe knockout mouse. *Blood Cells. Mol. Dis.* 2002, 29, 361-366.
6. Aigner E., Theurl I., Theurl M., Lederer D., Haufe H., Dietze O., Strasser M., Datz C., Weiss G.: Pathways underlying iron accumulation in human nonalcoholic fatty liver disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 2008, 87, 1374-1383.
7. Alexander J., Limaye A. P., Ko C. W., Bronner M. P., Kowdley K. V.: Association of hepatic iron overload with invasive fungal infection in liver transplant recipients. *Liver Transpl.* 2006, 12, 1799-1804.
8. Allen K. J., Gurrin L. C., Constantine C. C., Osborne N. J., Delatycki M. B., Nicoll A. J., McLaren C. E., Bahlo M., Nisselle A. E., Vulpe C. D., Anderson G. J., Southey M. C., Giles G. G., English D. R., Hopper J. L., Olynyk J. K., Powell L. W., Gertig D. M.: Iron-overload-related disease in HFE hereditary hemochromatosis. *N. Engl. J. Med.* 2008, 358, 221-230.
9. Andersen R. V., Tybjaerg-Hansen A., Appleyard M., Birgens H., Nordestgaard B. G.: Hemochromatosis mutations in the general population: iron overload progression rate. *Blood* 2004, 103, 2914-2919.
10. Andrews N. C.: Disorders of iron metabolism. *N. Engl. J. Med.*, 1999, 341, 1986-1995.
11. Arber K., Konikoff F. M., Moshkovitz M., Baratz M., Hallak A., Santo M., Halpern Z., Weiss H., Gilat T.: Increased serum iron and iron saturation without liver iron

- accumulation distinguish chronic hepatitis C from other chronic liver diseases. *Dig. Dis. Sci.* 1994, 39, 2656-2659.
12. Asberg A., Thorstensen K., Hveem K., Bjerve K. S.: Hereditary hemochromatosis: the clinical significance of the S65C mutation. *Genet. Test.* 2002, 6, 59-62.
 13. Azevedo-Martins A. K., Lortz S., Lenzen S, Curi R., Eizirik D. L., Tiedge M.: Improvement of the mitochondrial antioxidant defense status prevents cytokine-induced nuclear factor- $\kappa\beta$ activation in insulin-producing cells. *Diabetes* 2003, 52, 93-101.
 14. Bacon B., Adams P. C., Kowdley K. V., Powell L. W., Tavill A. S.: Diagnosis and management of hemochromatosis: 2011 Practise Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* 2011, 54, 328-343.
 15. Baldo V., Baldovin T., Trivello R., Floreani A.: Epidemiology of HCV infection. *Curr. Pharm. Des.* 2008, 14, 1646-1654.
 16. Bassett S. E., Di Bisceglie A. M., Bacon B. R., Sharp R. M., Govindarajan S., Hubbard G. B., Brasky K. M., Lanford R. E.: Effects of iron loading on pathogenicity in hepatitis C virus-infected chimpanzees. *Hepatology* 1999, 29, 1884-1892.
 17. Beinker N. K., Voigt M. D., Arendse M., Smit J., Stander I. A., Kirsch R. E.: Threshold effect of liver content on hepatic inflammation and fibrosis in hepatitis B and C. *J. Hepatol.* 1996, 25, 633-638.
 18. Beutler E., Felitti V. J., Koziol L. A., Ho N.J., Gelbart T.: Penetrance of the 845G6A (C282Y) *HFE* hereditary haemochromatosis mutation in the USA. *Lancet* 2002, 359, 211-218.
 19. Bielawski K., Własiuk M., Truskolawska M., Falkiewicz B.: HCV infection in Poland. *Arch. Med. Arch. Med. Res.* 2000, 31, 532-535.
 20. Boige V., Castéra L., de Roux N., Ganne-Carrié N., Ducot B., Pelletier G., Beaugrand M., Buffet C.: Lack of association between HFE gene mutations and hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Gut* 2003, 52, 1178-1181.
 21. Boldt D. H.: New perspectives on iron: an introduction. *Am. J. Med. Sci.* 1999, 318, 207-212.
 22. Bomford A.: Genetics of haemochromatosis. *Lancet* 2002, 360, 1673-1681.
 23. Bonkovsky H. L., Banner B. F., Rothman A. L.: Iron and chronic viral hepatitis. *Hepatology* 1997, 25, 759-768.
 24. Bonkovsky H. L., Naishadham D., Lambrecht R. W., Chung R. T., Hoefs J. C., Nash S. R., Rogers T. E., Banner B. F., Sterling R. K., Donovan J. A., Fontana R. J.,

- DiBisceglie A. M., Ghany M. G., Morishima C., and the HALT-C Trial Group.: Roles of iron and HFE mutations on severity and response to therapy during retreatment of advanced chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2006, 131, 1440-1451.
25. Boucher E., Bourienne A., Adams P., Turlin B., Brissot P., Deugnier Y.: Liver iron concentration and distribution in chronic hepatitis C before and after interferon treatment. *Gut* 1997, 41, 115-120.
 26. Bozorgzadeh A., Orloff M., Abt P., Tsoulfas G., Younan D., Kashyap R., Jain A., Mantry P., Maliakkal B., Khorana A., Schwartz S.: Survival outcomes in liver transplantation for hepatocellular carcinoma, comparing impact of hepatitis C versus other etiology of cirrhosis. *Liver. Transpl.* 2007, 13, 807-813.
 27. Braczkowska B., Kowalska M.: Epidemiology of HCV infection in Poland and the world. *Wiad. Lek.* 2002, 55 Suppl 1, 61-68.
 28. Brandhagen D. J., Alvarez W., Therneau T. M., Kruckeberg K. E., Thibodeau S. N., Ludwig J., Porayko M. K.: Iron overload in cirrhosis- HFE genotypes and outcome after liver transplantation. *Hepatology* 2000, 31, 456-460.
 29. Bridle K. R., Crawford D. H. G. Fletcher L. M., Smith J. L., Powell L. W., Ramm G. A.: Evidence for a sub-morphological inflammatory process in the liver in haemochromatosis. *J. Hepatol.* 2003, 38, 426-433.
 30. Bridle K. R., Frazer D. M., Wilkins S. J., Dixon J. L., Purdie D. M., Crawford D. H., Subramanian V. N., Powell L. W., Anderson G.J ., Ramm G. A.: Disrupted hepcidin regulation in HFE-associated hemochromatosis and the liver as a regulator of body iron homeostasis. *Lancet* 2003, 361, 669-673.
 31. Brissot P., Moirand R., Guyader D., Loreal O., Turlin B., Deugnier Y.: Hemochromatosis after the gene discovery: revisiting the diagnostic strategy. *J. Hepatol.* 1998, 28, 14-18.
 32. Brissot P., Bourel M., Herry D., Verger J.P., Messner M., Beaumont C., Regnouard F., Ferrand B., Simon M.: Assessment of liver iron content in 271 patients: a reevaluation of direct and indirect methods. *Gastroenterology* 1981, 80, 557-565.
 33. Brissot P., Loréal O.: Role of non-transferrin-bound iron in the pathogenesis of iron overload and toxicity. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2002, 509, 45-53.
 34. Bulaj Z. J., Philips J. D., Ajioka R. S., Franklin M. F., Griffen L. M., Guinee D. J., Edwards C. Q., Kushner J. P.: Hemochromatosis genes and other factors contributing to the pathogenesis of porphyria cutanea tarda. *Blood* 2000, 95, 1565-1571.
 35. Calzolari A., Raggi C., Deaglio S., Sposi N. M., Stafnes M., Fecchi K., Parolini I., Malavasi F., Peschle C., Sargiacomo M., Testa U.: TfR2 localizes in lipid raft

- domains and is released in exosomes to activate signal transduction along the MAPK pathway. *J. Cell. Sci.* 2006, 119, 4486-4498.
36. Cazzola M., Barosi G., Gobi P. G., Invernizzi R., Riccardi A., Ascari E.: Natural history of idiopathic refractory sideroblastic anemia. *Blood* 1988, 71, 305-312.
 37. Courselaud B., Pigeon C., Inoue Y., Inoue J., Gonzalez F. J., Leroyer P., Gilot D., Boudjema K., Guguen-Guillouzo C., Brissot P., Loréal O., Ilyin G.: C/EBPalpha regulates hepatic transcription of hepcidin, an antimicrobial peptide and regulator of iron metabolism. Cross-talk between C/EBP pathway and iron metabolism. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 41163-41170.
 38. Crichton R.: The importance of iron for biological systems. W: Iron metabolism – from molecular mechanisms to clinical consequences. Chichester: Wiley, 2009.17-59. ISBN 978-0-470-01028-0.
 39. Crichton R.: Intracellular iron metabolism and cellular iron homeostasis in: Iron metabolism – from molecular mechanisms to clinical consequences. Chichester: Wiley, 2009.223-271. ISBN 978-0-470-01028-0.
 40. Dar F. S., Faraj W., Zaman M. B., Bartlett A., Bomford A., O'Sullivan A., O'Grady J., Heneghan M., Rela M., Heaton N. D.: Outcome of liver transplantation in hereditary hemochromatosis. *Transpl. Int.* 2009, 22, 717-724.
 41. Deugnier Y. M., Loreal O., Turlin B., Guyader D., Jouanolle H., Mirand R., Jacquelinet C., Brissot P.: Liver pathology in genetic hemochromatosis: a review of 135 homozygous casus and their bioclinical correlations. *Gastroenterology* 1992, 102, 2050-2059.
 42. Di Bisceglie A. M., Axiotis C. A., Hoofnagle J. H., and Bacon B. R.: Measurements of iron status in patients with chronic hepatitis. *Gastroenterology* 1992, 102, 2108-2113.
 43. Diwakaran H. H., Befeler A. S., Britton R. S., Brunt E. M., Bacon B. R.: Accelerated hepatic fibrosis in patients with combined hereditary hemochromatosis and chronic hepatitis C infection. *J. Hepatol.* 2002. 36, 687-691.
 44. D'Souza R. F., Feakins R., Mears L., Sabin C. A., Foster G. R.: Relationship between serum ferritin, hepatic iron staining, diabetes mellitus and fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2005, 21, 519-524.
 45. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practical Guidelines for HFE Hemochromatosis. *J. Hepatol.* 2010, 53, 3-22.
 46. Ellervik C., Birgens H., Tybjaerg-Hansen A., Nordestgaard, B. G.: Hemochromatosis genotypes and risk of 31 disease endpoints: meta-analyses including 66,000 cases and 226,000 controls. *Hepatology* 2007, 46, 1071-1080.

47. Erhardt A., Maschner-Olberg A., Mellenthin C., Kappert G., Adams O., Donner A., Willers R., Niederau C., Häussinger D.: HFE mutations and chronic hepatitis C: H63D and C282Y heterozygosity are independent risk factors for liver fibrosis and cirrhosis. *J. Hepatol.* 2003, 38, 335-342.
48. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practical Guidelines for HFE Hemochromatosis. *J. Hepatol.* 2010, 53, 3-22.
49. Fargion S, Stazi MA, Fracanzani AL, Mattioli M, Sampietro M, Tavazzi D, Bertelli C, Patriarca V, Mariani C, Fiorelli G. Mutations in the HFE gene and their interaction with exogenous risk factors in hepatocellular carcinoma. *Blood Cells. Mol. Dis.* 2001, 27, 505-511.
50. Fairbanks V. F, Brandhagen D. J., Thibodeau S. N., Snow K., Wollan P. C.: H63D is an haemochromatosis associated allele. *Gut.* 1998, 43, 441-442.
51. Farrell F. J., Nguyen M., Woodley S., Imperial J. C., Garcia-Kennedy R., Man K., Esquivel C. O., Keeffe E. B.: Outcome of liver transplantation in patients with hemochromatosis. *Hepatology* 1994, 20, 404-410.
52. Feder J. N., Gnirke A., Thomas W., Tsuchihashi Z., Ruddy D. A., Basava A., Dormischian F., Domingo R. Jr, Ellis M. C., Fullan A., Hinton L. M., Jones N. L., Kimmel B. E., Kronmal G. S., Lauer P., Lee V. K., Loeb D. B., Mapa F. A., McClelland E., Meyer N. C., Mintier G. A., Moeller N., Moore T., Morikang E., Prass C. E., Quintana L., Starnes S. M., Schatzman R. C., Brunke K. J., Drayna D. T., Risch N. J., Bacon B. R., Wolff R. K.: A novel MHC class 1-like gene is mutated in patients with hereditary hemochromatosis. *Nat. Genet.* 1996, 13, 399-409.
53. Feder J. N., Penny D. M., Irrinki A., Lee V. K., Lebrón J. A., Watson N., Tsuchihashi Z., Sigal E., Bjorkman P. J., Schatzman R. C.: The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 1472-1477.
54. Fenton H., Torbenson M., Vivekanandan P., Yeh M. M., Hart J., Ferrell L.: Marked iron in liver explants in the absence of major hereditary hemochromatosis gene defects: a risk factor for cardiac failure. *Transplantation* 2009, 87, 1256-1260.
55. Fleming R. E., Migas M. C., Holden C. C., Waheed A., Britton R. S., Tomatsu S., Bacon B. R., Sly W. S.: Transferrin receptor 2: continued expression in mouse liver in the face of iron overload and in hereditary hemochromatosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, 97, 2214-2219.
56. Fletcher L. M., Dixon J. L., Purdie D. M., Powell L. W., Crawford D. H. G.: Excess alcohol greatly increases the prevalence of cirrhosis in hereditary hemochromatosis. *Gastroenterology* 2002, 122, 281-289.

57. Gandon Y., Guyader D., Heautot J. H., Reda M. I., Yaouanq J., Buhe T., Brissot P., Carsin M., Deugnier Y.: Hemochromatosis: diagnosis and quantification of liver iron with gradient-echo MR imaging. *Radiology* 1994, 193, 533-538.
58. Gao J., Chen J., Kramer M., Tsukamoto H., Zhang A. S., Enns C. A.: Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferrin receptor 2 is required for transferrin-induced hepcidin expression. *Cell Metab.* 2009, 9, 217-227.
59. Gehrke S. G., Stremmel W., Mathes I., Riedel H. D., Bents K., Kallinowski B.: Hemochromatosis and transferrin receptor gene polymorphisms in chronic hepatitis C: impact on iron status, liver injury and HCV genotype. *J. Mol. Med.* 2003, 81, 780-787.
60. Geier A., Reugels M., Weiskirchen R., Wasmuth H. E., Dietrich C. G., Siewert E., Gartung C., Lorenzen J., Bosserhoff A. K., Brugmann M., Gressner A. M., Matern S., Lambert F.: Common heterozygous hemochromatosis gene mutations are risk factors for inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. *Liver. Int.* 2004, 24, 285-294.
61. George D. K., Goldwurm S., MacDonald G. A., Cowley L. L., Walker N. I., Ward P. J., Jazwinska E. C., Powell L. W.: Increased hepatic iron concentration in nonalcoholic steatohepatitis is associated with increased fibrosis. *Gastroenterology* 1998, 114, 311-318.
62. Gochee P. A., Powell L. W., Cullen D. J., Du Sart D., Rossi E., Olynyk J. K.: A population-based study of the biochemical and clinical expression of the H63D hemochromatosis mutation. *Gastroenterology* 2002, 122, 646-651.
63. Guyader D., Thirouard A. S., Erdtmann L., Rakba N., Jacquelinet S., Danielou H., Perrin M., Jouanolle A. M., Brissot P.: Liver iron is a surrogate marker of severe fibrosis in chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* 2007, 46, 587-595.
64. Harrison S. A., Bacon B. R.: Hereditary hemochromatosis: update for 2003. *J. Hepatol.* 2003, 38, S14-S23.
65. Hemochromatosis. In: *Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM.* www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/
66. Hentze M. W., Muckenthaler M. U., Andrews N. C.: Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* 2004, 117, 285-297.
67. Holmström P., Marmur J., Eggertsen G., Gåfväls M., Stål P.: Mild iron overload in patients carrying the HFE S65C gene mutation: a retrospective study in patients with suspected iron overload and healthy controls. *Gut* 2002, 51, 723-730.

68. Houglum K., Ramm G. A., Crawford D. H., Witztum J. L., Powell L. W., Chojkier M. Excess iron induces oxidative stress and transforming growth factor beta 1 in genetic hemochromatosis. *Hepatology* 1997, 26, 605-610.
69. Informacje o zachorowaniach na choroby zakaźne i zatruciach w Polsce w 2011 roku. www.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/2011
70. Isom H. C., McDevitt E. I., and Moon M. S. Elevated hepatic iron: a confounding factor in chronic hepatitis C. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009, 1790, 650-662.
71. Juszczyk J. *Hepatitis C: patogeneza i terapia*, Termedia Wydawnictwa Medyczne, 2009, Poznań.
72. Kakhlon O., Cabantchik Z. I.: The labile iron pool: characterisation, measurement, and participation in cellular processes. *Free Radical Biol. Med.* 2002, 33, 1037-1046.
73. Kawabata H, Germain R. S, Vuong P. T, Nakamaki T, Said J. W, Koeffler H. P.: Transferrin receptor 2-alpha supports cell growth both in iron-chelated cultured cells and in vivo. *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 16618-16625.
74. Kilpe V. E., Krakauer H., Wren R. E.: An analysis of liver transplant experience from 37 transplant centers as reported to Medicare. *Transplantation* 1993, 56, 554-561.
75. Ko C., Siddaiah N., Berger J., Gish R., Brandhagen D., Sterling R. K., Cotler S. J., Fontana R. J., McCashland T. M., Han S. H. B., Gordon F. D., Schilsky M. L., Kowdley K. V.: Prevalence of hepatic iron overload and association with hepatocellular cancer in end-stage liver disease: results from the National Hemochromatosis Transplant Registry. *Liver. Int.* 2007, 27, 1394-1401.
76. Kowdley K. V.: Iron, hemochromatosis, and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004, 127, S79-S86.
77. Lavanchy D.: The global burden of hepatitis C. *Liver. Int.* 2007, 29 Suppl 1, 74-81.
78. Lebray P., Zylberberg H., Hue S., Poulet B., Carnot F., Martin S., Chretien Y., Pol S., Caillat-Zuckman S., Brechot C., Nalpas P.: Influence of HFE gen polymorphism on the progression and treatment of chronic hepatitis C. *J. Viral Hep.* 2004, 11, 175-182.
79. Lebrón J. A., Bennett M. J., Vaughn D. E., Chirino A. J., Snow P. M., Mintier G. A., Feder J. N., Bjorkman P. J.: Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor. *Cell* 1998, 93, 111-123
80. Lee RG. *Diagnostic Liver Pathology*, 1994, Mosby, St. Louis.

81. Levent G., Ali A., Ahmet A., Polat E. C., Aytaç C., Ayşe E., Ahmet S.: Oxidative stress and antioxidant defense in patients with chronic hepatitis C patients before and after pegylated interferon alfa-2b plus ribavirin therapy. *J. Transl. Med.* 2006, 4, 25.
82. Loréal O., Gosriwatana I., Guyader D., Porter J., Brissot P., Hider R. C.: Determination of non-transferrin-bound iron in genetic hemochromatosis using a new HPLC-based method. *J. Hepatol.* 2000, 32, 727-733.
83. Ludwig J., Hashimoto E., Porayko M. K, Moyer T. P., Baldus W. P. Hemosiderosis in cirrhosis: a study of 447 native livers. *Gastroenterology* 1997, 112, 882-888.
84. Machado MV, Ravasco P, Martins A, Almeida MR, Camilo ME, Cortez-Pinto H.: Iron homeostasis and H63D mutations in alcoholics with and without liver disease. *World. J. Gastroenterol.* 2009, 15,106-111.
85. Małkowski P., Marciniak A., Wasiak D., Czerwiński J., Pszenny A., Gutowska D., Łaba M., Paszkiewicz J., Misińska J., Uszyńska-Tuzinek M., Kosieradzki M.: Incidence of Hepatocellular Carcinoma (HCC) and Cholangiocellular Carcinoma (CCC) in the Mazovian Region. *Exp. Clin. Hep.* 2007, 3, AB14-14.
86. McCord J. M.: Iron, free radicals, and oxidative injury. *Semin. Hematol.* 1998, 35, 5-12.
87. Mendler M. H., Turlin B., Moirand R., Jouanolle A. M., Sapey T., Guyader D., Le Gall J. Y., Brissot P., David V., Deugnier Y.: Insulin resistance-associated hepatic iron overload. *Gastroenterology* 1999, 117, 1155-1163.
88. Metwally M. A., Zein C. O., Zein N. Z.: Clinical significance of hepatic iron deposition and serum iron values in patients with chronic hepatitis C infection. *Am. J. Gastroenterol.* 2004, 99, 286-291.
89. MMWR October 16, 1998, 47(RR19), 1-39.
90. Moczulski D. K., Grzeszczak W., Gawlik B.: Frequency of the hemochromatosis C282Y and H63D mutations in a Polish population of Slavic origin. *Med. Sci. Monit.* 2001, 7, 441-443.
91. Moirand R., Mortaji A. M., Loréal O., Paillard F., Brissot P., Deugnier Y.: A new syndrome of iron overload with normal transferrin saturation. *Lancet* 1997, 349, 95-97.
92. Mura C., Raguenes O., Férec C.: HFE mutations analysis in 711 hemochromatosis probands: evidence for S65C implication in mild form of hemochromatosis. *Blood* 1999, 93, 2502-2505.
93. Nahon P., Sutton A., Rufat P., Ziol M., Thabut G., Schischmanoff P. O., Vidaud D., Charnaux N., Couvert P., Ganne-Carrie N., Trinchet J. C., Gattegno L., Beaugrand

- M.: Liver iron, HFE gene mutations, and hepatocellular carcinoma occurrence in patients with cirrhosis. *Gastroenterology* 2008, 134, 102-110.
94. Niederau C., Fischer R., Purschel A., Stremmel W., Haussinger D., Strohmeyer G.: Long term survival in patients with hereditary hemochromatosis. *Gastroenterology* 1996, 110, 1107-1109.
 95. Niemela O., Parkkila S., Britton R. S., Brunt E., Janney C., Bacon B.: Hepatic lipid peroxidation in hereditary hemochromatosis and alcoholic liver injury. *J. Lab. Clin. Med.*, 1999, 133, 451-460.
 96. Nyckowski P., Dudek K., Skwarek A., Zieniewicz K., Pawlak J., Patkowski W., Michałowicz B., Alsharabi A., Wróblewski T., Leowska E., Paczkowska A., Ołdakowska-Jedynak U., Paczek L., Krawczyk M.: Results of liver transplantation according to indications for orthotopic liver transplantation. *Transplant. Proc.* 2003, 35, 2265-2267.
 97. Olynyk J. K., Reddy K. R., Di Bisceglie A. M., Jeffers L. J., Parker T. I., Schiff E. R., Bacon B. R.: Hepatic iron concentration as a predictor of response to interferon alfa therapy in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1995, 108, 1104-1109.
 98. Olynyk J. K., Hagan E. S., Cullen D. J., Beilby J., Whittall D. E.: Evolution of untreated hereditary hemochromatosis in the Busselton population: a 17-year study. *Mayo Clin. Proc.* 2004, 79, 309-313.
 99. Osterreicher C. H., Datz C., Stickel F., Hellerbrand C., Penz M., Hofer H., Wrba F., Penner E., Schuppan D., Ferenci P.: TGF-beta1 codon 25 gene polymorphism is associated with cirrhosis in patients with hereditary hemochromatosis. *Cytokine* 2005, 3, 142-148.
 100. Parkkila S., Waheed A., Britton R. S., Bacon B. R., Zhou X. Y., Tomatsu S., Fleming R. E., Sly W. S.: Association of the transferrin receptor in human placenta with HFE, the protein defective in hereditary hemochromatosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94, 13198-13202.
 101. Phatak P. D., Sham R. L., Raubertas R. F., Dunnigan K., O'Leary M. T., Braggins C., Cappuccio J. D.: Prevalence of hereditary hemochromatosis in 16031 primary care patients. *Ann. Intern. Med.* 1998, 129, 954-961
 102. Pietrangelo A., Gualdi R., Casalgrandi G., Montosi G., Ventura E.: Molecular and cellular aspects of iron-induced hepatic cirrhosis in rodents. *J. Clin. Invest.* 1995, 95, 1824-1831.
 103. Pietrangelo A.: Metals, oxidative stress and hepatic fibrogenesis. *Semin. Liv. Dis.* 1996, 16, 13-30.

104. Pietrangelo A.: Hereditary hemochromatosis – a new look at an old disease. *N. Engl. J. Med.* 2004, 350, 2383-2397.
105. Pietrangelo A.: Hereditary hemochromatosis: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Gastroenterology* 2010, 139, 393-408.
106. Piperno A., d'Alba R., Fargion S., Roffi L., Sampietro M., Parma S., Arosio V., Fare M., Fiorelli G.: Liver iron concentration in chronic viral hepatitis: a study of 98 patients. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 1995, 7, 1203-1208
107. Powell L. W., George K. G., McDonnell S. M., Kovdley K. V.: Diagnosis of hemochromatosis. *Ann. Intern. Med.*, 1998, 129, 925-931.
108. Ramm G. A., Crawford D. H., Powell L. W., Walker N. I., Fletcher L. M., Halliday J. W.: Hepatic stellate cell activation in genetic hemochromatosis. Lobular distribution, effect of increasing hepatic iron and response to phlebotomy. *J. Hepatol.* 1997, 26, 584-592.
109. Raszeja-Wyszomirska J., Kurzawski G., Suchy J., Zawada I., Lubiński J., Milkiewicz P.: Frequency of mutations related to hereditary haemochromatosis in northwestern Poland. *J. Appl. Genet.* 2008, 49, 105-107.
110. Risdon R. A., Barry M., Flynn D. M.: Transfusional iron overload: the relationship between tissue iron concentration and hepatic fibrosis in thalassaemia. *J. Pathol.* 1975, 116, 83-95.
111. Robert K., Nehme J., Bourdon E., Pivert G., Frignet B., Delcayre C., Delabar J. M., Jauel N.: Cystathionine beta synthase deficiency promotes oxidative stress, fibrosis and steatosis in mice liver. *Gastroenterology* 2005, 128, 1405-1415.
112. Rouault T. A.: The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat. Chem. Biol.* 2006, 2, 406-414.
113. Samarasena J., Winsor W., Lush R., Duggan P., Xie Y., Borgaonkar M.: Individuals homozygous for the H63D mutation have significantly elevated iron indexes. *Dig. Dis. Sci.* 2006, 51, 803-807.
114. Schmidt P. J., Toran P. T., Giannetti A. M., Bjorkman P. J., Andrews N. C.: The transferrin receptor modulates Hfe-dependent regulation of hepcidin expression. *Cell Metab.* 2008, 7, 205-214.
115. Sikorska K., Bielawski K.P., Stalke P., LAkomy E.A., Michalska Z., Witczak-Malinowska K., Romanowski T.: HFE gene mutations in Polish patients with disturbances of iron metabolism: an initial assessment. *Int. J Mol. Med.* 2005, 16, 1151-1156.

116. Singh N., Sun H. Y.: Iron overload and unique susceptibility of liver transplant recipients to disseminated disease due to opportunistic pathogens. *Liver. Transpl.* 2008, 14, 1249-1255.
117. Singh N., Wannstedt C., Keyes L., Mayher D., Tickerhoof L., Akoad M., Wagener M. M., Frye R., Cacciarelli T. V.: Hepatic iron content and the risk of *Staphylococcus aureus* bacteremia in liver transplant recipients. *Prog. Transplant.* 2007, 17, 332-336.
118. Smith B. C., Gorge J., Guzail M. A., Day C. P., Daly A. K., Burt A. D.: Heterozygosity for hereditary hemochromatosis is associated with more fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1998, 27, 1695-1699.
119. Stępień M., Rosińska M.: Wirusowe zapalenia wątroby typu C w Polsce w 2008 roku. *Przegl. Epidemiol.* 2010, 64, 245-250.
120. Thorburn D., Curry G., Spooner R., Spence E., Oien K., Halls D., Fox R., McCrudden E. A. B., MacSween R. N. M., Mills P. R.: The role of iron and haemochromatosis gene mutations in the progression of liver disease in chronic hepatitis C. *Gut* 2002, 50, 248-252.
121. Torti F. M., Torti S. V.: Regulation of ferritin genes and protein. *Blood* 2002, 99, 3505-3516.
122. Tung B. Y., Emond M. J., Bronner M. P., Raaka S. D., Cotler S. J., Kowdley K.V.: Hepatitis C, iron status and disease severity: relationship with HFE mutations. *Gastroenterology* 2003, 124, 318-326.
123. Turlin B., Deugnier Y.: Evaluation and interpretation of iron in the liver. *Semin. Diagn. Pathol.* 1998, 4, 237-245.
124. Videla L. A., Fernandez V., Tapia G., Varela P.: Oxidative stress-mediated hepatotoxicity of iron and copper: role of Kupffer cells. *Biometals* 2003, 16, 103-111.
125. Vujic Spasic M., Kiss J., Herrmann T., Galy B., Martinache S., Stolte J., Gröne H. J., Stremmel W., Hentze M. W., Muckenthaler M. U.: Hfe acts in hepatocytes to prevent hemochromatosis. *Cell Metab.* 2008, 7, 173-178.
126. Waheed A., Parkkila S., Zhou X. Y., Tomatsu S., Tsuchihashi Z., Feder J. N., Schatzman R. C., Britton R. S., Bacon B. R., Sly W. S.: Hereditary hemochromatosis: effects of C282Y and H63D mutations on association with beta2-microglobulin, intracellular processing, and cell surface expression of the HFE protein in COS-7 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94, 12384-12389.
127. *Weekly Epidemiological Record* 2000, 75, 18-19.

128. Weinberg E. D.: Iron withholding: a defense against infection and neoplasia. *Physiol. Revs.* 1984, 64, 65-102.
129. Weinberg E. D.: The hazards of iron loading. *Metallomics* 2010, 2, 732-740.
130. Weiss G.: Iron and immunity. *Eur. J. Clin. Invest.* 2002, 32, Suppl 1, 70-78.
131. Whitlock E. P., Garlitz B. A., Harris E. L., Beil T. L., Smith P. R.: Screening for hereditary hemochromatosis: a systematic review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann. Intern. Med.* 2006, 145, 209-23.
132. Willems M., Metselaar H. J., Tilanus H. W., Schalm S. W., de Man R. A.: Liver transplantation and hepatitis C. *Transpl. Int.* 2002, 15, 61-72.
133. Yang Q., Mc Donnell S., Khoury M., Cono J., Parrish R. G.: Haemochromatosis-associated mortality in the United States from 1979 to 1992: an analysis of multiple-cause mortality data. *Ann. Intern. Med.* 1998, 129, 946-953.
134. Ziarkiewicz-Wróblewska B., Wróblewski T., Wasiutyński A.: Morphological features and differential diagnosis of hepatitis C recurrence after liver transplantation – literature review and results of single transplantation center. *Ann. Transpl.* 2008, 13, 12-20.
135. Zieniewicz K., Patkowski W., Nyckowski P., Alsharabi A., Michałowicz B., Pawlak J., Paluszkiewicz R., Wróblewski T., Najnigier B., Smoter P., Hevelke P., Skwarek A., Remiszewski P., Kotulski M., Skalski M., Paczek L., Krawczyk M.: Results of liver transplantation for hepatocellular cancer. *Ann. Transpl.* 2007, 12, 11-14.
136. Zych W. S., Habor A., Rawa T., Butruk E., Ostrowski J.: Hemochromatoza wrodzona – pilotowe badanie oceny częstości występowania w wyselekcjonowanej populacji. *Materiały Zjazdowe XI Kongresu Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii* 2004: 72-73.