

**GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY**

**Katarzyna Rozwadowska**

**ECHOKARDIOGRAFICZNA OCENA MIĘŚNIA SERCOWEGO  
ZA POMOCĄ METODY  
ŚLEDZENIA MARKERÓW AKUSTYCZNYCH  
U CHORYCH Z DZIEDZICZNĄ HEMOCHROMATOZĄ**

**Praca doktorska**

Promotor: dr hab. n. med. Ludmiła Daniłowicz - Szymanowicz

Pracę wykonano w Klinice Kardiologii i Elektroterapii Serca  
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Grzegorz Raczak

**GDAŃSK 2019**

**Składam serdeczne podziękowania mojemu Promotorowi  
Pani dr hab. n. med. Ludmile Daniłowicz – Szymanowicz  
za inspirację, życzliwość, wsparcie i cierpliwość  
okazane mi przy przygotowaniu rozprawy doktorskiej**

**Serdecznie dziękuję mojej Teściowej  
za nieocenioną pomoc**

**Pracę dedykuję mojej Mamie**

## Spis treści

1. Wprowadzenie .....	4
1.1 Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską .....	4
1.2 Wykaz innych publikacji, które nie zostały włączone do rozprawy doktorskiej.....	5
1.3 Wykaz doniesień zjazdowych .....	6
2. Alfabetyczny wykaz używanych skrótów.....	7
3. Wstęp .....	9
4. Cele rozprawy doktorskiej .....	10
5. Materiał i metody .....	11
5.1 Populacja badana .....	11
5.2 Analiza laboratoryjna .....	11
5.3 Badanie echokardiograficzne .....	11
5.4 Analizy statystyczne .....	12
6. Wyniki .....	12
6.1 Mutacje genetyczne i wyniki laboratoryjne badanych chorych.....	12
6.2 Wyniki szczegółowe pracy oryginalnej nr 1 .....	12
6.3 Wyniki szczegółowe pracy oryginalnej nr 2 .....	13
6.4 Wyniki szczegółowe pracy oryginalnej nr 3 .....	14
7. Ograniczenia pracy.....	16
8. Wnioski .....	16
9. Streszczenie pracy w języku angielskim .....	18
9.1 Background .....	18
9.2 The aims of the study.....	19
9.3 Materials and methods .....	19
9.3.1 Study population .....	19
9.3.2 Laboratory analysis .....	20
9.3.3 Echocardiography .....	20
9.3.4 Statistical analysis .....	20
9.4 Results .....	20
9.4.1 Genetic testing and laboratory analysis results .....	20
9.4.2 Detailed results of original study no 1 .....	21
9.4.3 Detailed results of original study no 2 .....	21
9.4.4 Detailed results of original study no 3 .....	22
9.5 Limitations of the study.....	23
9.6 Conclusions .....	24

# 1. Wprowadzenie

Rozprawa doktorska pt: „Echokardiograficzna ocena mięśnia sercowego za pomocą metody śledzenia markerów akustycznych u chorych z dziedziczną hemochromatozą” powstała w oparciu o monotematyczny cykl czterech artykułów opublikowanych w polskich i międzynarodowych czasopismach naukowych indeksowanych w bazie PubMed.

## 1.1 Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską:

Tytuł publikacji, autorzy, tytuł czasopisma	Punkty MNiSW	Impact Factor
<p><b><u>Hemochromatoza dziedziczna oczami kardiologa</u></b></p> <p><b><u>Katarzyna Rozwadowska</u></b>, Ludmiła Daniłowicz – Szymanowicz, Katarzyna Sikorska, Grzegorz Raczak Annales Academiae Medicae Gedanensis 2017; 47: 104-112, Artykuł nie posiada nr DOI</p>	5	-
<p><b><u>Does the age of patients with hereditary hemochromatosis at the moment of their first diagnosis has an additional effect on the standard echocardiographic parameters?</u></b></p> <p><b><u>Katarzyna Rozwadowska</u></b>, Ludmiła Daniłowicz – Szymanowicz, Marcin Fijałkowski, Katarzyna Sikorska, Wiktor Szymanowicz, Dariusz Kozłowski, Ewa Lewicka, Grzegorz Raczak European Journal of Translational and Clinical Medicine 2018; 1: 18-23, DOI: 10.31373/ejtcem/95222</p>	5	-
<p><b><u>Influence of hereditary hemochromatosis on left ventricular wall thickness – does iron overload exacerbate cardiac hypertrophy?</u></b></p> <p><b><u>Katarzyna Rozwadowska</u></b>, Grzegorz Raczak Katarzyna Sikorska, Marcin Fijałkowski, Dariusz Kozłowski, Ludmiła Daniłowicz-Szymanowicz Folia Morphologica, DOI: 10.5603/FM.a2019.0025</p>	15	<b>0,582</b>
<p><b><u>Can two-dimensional speckle tracking echocardiography be useful for the left ventricular assessment in the early stages of hereditary hemochromatosis?</u></b></p> <p><b><u>Katarzyna Rozwadowska</u></b>, Ludmiła Daniłowicz-Szymanowicz, Marcin Fijałkowski, Katarzyna Sikorska, Rafał Gałąska, Dariusz Kozłowski, Marcin Gruchała, Grzegorz Raczak Echocardiography, DOI: 10.1111/echo.14141</p>	20	<b>1,197</b>
Podsumowanie punktów	45	<b>1,779</b>

## 1.2 Wykaz innych publikacji, które nie zostały włączone do rozprawy doktorskiej

1. Daniłowicz-Szymanowicz L, Lewicka E, Dabrowska-Kugacka A, Niemirycz-Makurat A, Kwiatkowska J, Lewicka-Potocka Z, **Rozwadowska K**, Stepnowska E, Raczak G. Microvolt T-wave alternans profiles in patients with pulmonary arterial hypertension compared to patients with left ventricular systolic dysfunction and a group of healthy volunteers. *Anatol J Cardiol.* 2016; 16: 825 - 830
2. Kaufmann D, Daniłowicz-Szymanowicz L, **Rozwadowska K**, Dobrowolska M, Niemirycz-Makurat A, Szwoch M, Raczak G. Charakterystyka parametrów klinicznych, elektrokardiograficznych, echokardiograficznych oraz autonomicznych u chorych z istotną dysfunkcją skurczową lewej komory serca w wieku 75 lat i starszych (ang. Characteristics of clinical, electrocardiographic, echocardiographic and autonomic parameters in patients with significant left ventricular systolic dysfunction aged 75 years and older). *Geriatrics* 2016; 10 (2), 69 - 77
3. Daniłowicz-Szymanowicz L, Suhecka J, Niemirycz-Makurat A, **Rozwadowska K**, Raczak G. Autonomic predictors of hospitalization due to heart failure decompensation in patients with left ventricular systolic dysfunction. *Plos One* 2016; vol. 11 (3), e0152372, 1 - 12

### 1.3 Wykaz doniesień zjazdowych

1. Daniłowicz-Szymanowicz L, Fijałkowski M, **Rozwadowska K**, Kaufmann D, Sikorska K, Gałąska R, Gruchała M, Raczak G. Can two-dimensional speckle tracking echocardiography be useful for the left ventricular assessment in the early stages of hereditary hemochromatosis? Eur. Heart J. Cardiovasc. Imag. 2016; vol 17, suppl. 2, ii145. Sesja plakatowa podczas konferencji Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego EuroEcho – Imaging w Lipsku (Niemcy, 2016).
2. Daniłowicz-Szymanowicz L, Fijałkowski M, **Rozwadowska K**, Kaufmann D, Sikorska K, Gałąska R, Gruchała M, Raczak G. Can two-dimensional speckle tracking echocardiography be useful for the left ventricular assessment in the early stages of hereditary hemochromatosis? Sesja plakatowa na XIX Konferencji Sekcji Echokardiografii PTK "PolEcho" w Lublinie (Polska, 2017).
3. Daniłowicz – Szymanowicz L, **Rozwadowska K**, Fijałkowski M, Sikorska K, Raczak G. Conventional and speckle-tracking echocardiographic assessment of patients with newly diagnosed hereditary haemochromatosis with consideration of age. Sesja plakatowa podczas konferencji Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego EuroEcho – Imaging w Milanie (Włochy, 2018).
4. Nowak R, Daniłowicz-Szymanowicz L, **Rozwadowska K**, Zienciuk-Krajka A, Wabich E, Raczak G. Speckle tracking echocardiography in patients with atrial fibrillation and hypertrophic cardiomyopathy. Sesja plakatowa podczas konferencji Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego EuroEcho – Imaging w Milanie (Włochy, 2018).

## 2. Alfabetyczny wykaz używanych skrótów

2D – echokardiograficzne obrazowanie dwuwymiarowe

3D – echokardiograficzne obrazowanie trójwymiarowe

A – *late (atrial) peak mitral velocity* / późna szczytowa prędkość przez zastawkę mitralną

A dur – *mitral A wave duration time* / czas trwania fali A napływu mitralnego

ALAT – *alanine transaminase* / transaminaza alaninowa

ASPAT – *aspartate transaminase* / transaminaza asparaginowa

BSA – *body surface area* / pole powierzchni ciała

DT – *deceleration time* / czas deceleracji przepływu przez zastawkę mitralną

E – *early peak mitral velocity* / wczesna szczytowa prędkość przez zastawkę mitralną

E/A – *early to late (atrial) peak velocities ratio* / stosunek szczytowych prędkości napływu mitralnego

Em – *early myocardial peak velocity* / wczesnorozkurczowa szczytowa prędkość ruchu miokardium

E/Em – *early peak mitral velocity to early myocardial peak velocity ratio* / stosunek wczesnej szczytowej prędkości przez zastawkę mitralną do wczesnorozkurczowej szczytowej prędkości ruchu miokardium

HH – *hereditary hemochromatosis* / hemochromatoza dziedziczna

HR – *heart rate* / częstość pracy serca

IVS – *intraventricular septum* / grubość przegrody międzykomorowej

LAAI – *left atrium area index (left atrium area / BSA)* / indeksowane pole powierzchni lewego przedsionka (pole powierzchni lewego przedsionka / BSA)

LADs – *left atrium diameter* / wymiar lewego przedsionka

LAVI – *left atrium volume index (left atrium volume / BSA)* / indeksowana objętość lewego przedsionka (objętość lewego przedsionka / BSA)

LV – *left ventricle* / lewa komora serca

LVEDD – *left ventricle end diastolic diameter* / wymiar późnorozkurczowy lewej komory

LVEDV – *left ventricle end diastolic volume* / objętość końcoworozkurczowa lewej komory

LVEF – *left ventricle ejection fraction* / frakcja wyrzutowa lewej komory

LVESD – *left ventricle end systolic diameter* / wymiar późnoskurczowy lewej komory

LVESV – *left ventricle end systolic volume* / objętość końcowoskurczowa lewej komory

LVMI – *left ventricle mass index (left ventricle mass/BSA)* / indeksowana masa lewej komory (masa lewej komory / BSA)

PV – *pulmonary veins* / żyły płucne

- S – *systolic flow* / napływ skurczowy z żył płucnych

- D – *diastolic flow* / napływ rozkurczowy z żył płucnych

- A dur – *pulmonary veins A-wave duration*/ czas trwania fali A napływu z żył płucnych

- Ar – *pulmonary veins A-wave velocity* / prędkość fali A napływu z żył płucnych

PW – *posterior wall* / grubość ściany tylnej

RWT – *relative wall thickness* / względna grubość lewej komory

STE – *speckle tracking echokardiography* / metoda śledzenia markerów akustycznych (plamki akustycznej)

TDI – *tissue Doppler imaging*/ obrazowanie za pomocą Dopplera tkankowego

TSAT - saturacja transferyny

yo – *years old* / rok życia



### 3. Wstęp

Hemochromatoza dziedziczna (HH – *hereditary hemochromatosis*) należy do najczęstszych chorób metabolicznych rasy kaukaskiej uwarunkowanych genetycznie, występuje z częstotliwością ok. 1-2 na 500 osób. W ponad 80% przypadków związana jest z homozygotyczną mutacją C282Y genu HFE, a sporadycznie z mutacjami innych genów, których produkty biorą udział w regulacji gospodarki żelazem w organizmie. Dysfunkcje cząsteczek kontrolujących homeostazę żelaza prowadzą do nadmiernego wchłaniania żelaza w dwunastnicy oraz w górnym odcinku jelita cienkiego oraz do zaburzeń wewnątrzustrojowej dystrybucji tego pierwiastka. W związku z tym, że w ludzkim organizmie nie ma mechanizmów regulujących wydalanie gromadzonego w nadmiarze żelaza, w przebiegu choroby dochodzi do jego odkładania się w wielu narządach, między innymi w wątrobie, trzustce, skórze, stawach, gonadach, jak również w sercu.

Aktywne biologicznie jony żelaza generują stres oksydacyjny wywołujący destrukcję tkanek, w których dochodzi do spichrzania tego pierwiastka. Kardiomiocyty, ze względu na intensywny wychwyty jonów żelaza, są bardzo podatne na tego typu uszkodzenie. Proces zajęcia serca przez chorobę jest powolny i przebiega latami. Objawia się początkowo jako zaburzenie funkcji rozkurczowej i przerost. Późnym objawem choroby, po wielu latach jej trwania, jest między innymi zastoinowa niewydolność serca, która odpowiada za około 1/3 zgonów w przebiegu naturalnym hemochromatozy. Znanym powikłaniem HH są również arytmie, zarówno nadkomorowe, jak i komorowe. Kolejnymi obciążeniami występującymi częściej wśród chorych z HH, niż w populacji ogólnej, są nadciśnienie tętnicze i cukrzyca.

Od czasu wprowadzenia do powszechnej praktyki klinicznej badań genetycznych możliwe jest wykrycie HH na wczesnym etapie, a w konsekwencji szybkie wdrożenie odpowiedniego leczenia, które powinno zatrzymać postępujące zmiany patologiczne w różnych narządach, w tym w sercu. Od wielu dziesiątek lat w leczeniu HH stosuje się z powodzeniem krwioupuasty. Jednak niektóre dodatkowe problemy kliniczne mogące mieć miejsce u pacjentów z HH, takie jak niedokrwistość, nowotwory złośliwe, czy niestabilność hemodynamiczna, są przeciwwskazaniem do tego typu terapii. Wówczas alternatywą są leki chelatujące, np: deferoksamina (stosowana parenteralnie), czy deferipron (lek doustny). Leczeniem ostatniego rzutu jest przeszczep serca.

Na podstawie przeglądu dotychczasowego piśmiennictwa, szczegółowo opisanego w pracy poglądowej niniejszej rozprawy, zostało dostrzeżone, że dotychczas niewiele badań

poświęconych było ocenie kardiologicznej chorych z HH, a zdecydowana większość publikacji w tej kwestii dotyczyła chorych z pełnoobjawową niewydolnością serca wikłającą HH w jej późnych okresach. Zajęcie procesem chorobowym serca w przebiegu HH jest bardzo poważnym czynnikiem rokowniczym, w związku z czym szczególny nacisk powinien być kładziony na szybkie i wczesne wykrycie zmian, zanim dojdzie do rozwoju pełnoobjawowej choroby serca. W tym zakresie najważniejszym narzędziem klinicystów jest powszechnie dostępna echokardiografia, a jej najnowsza technika polegająca na metodzie śledzenia markerów akustycznych (*2D speckle tracking echocardiography* – 2D STE) pozwala na bardzo wczesne wykrywanie nieprawidłowości w sercu, zanim dojdzie do zmian w parametrach standardowych echo oraz zanim dojdzie do rozwoju pełnoobjawowej choroby serca. Może to mieć istotne znaczenie praktyczne, zarówno w przewidywaniu wystąpienia uszkodzenia serca w przebiegu HH, jak i w monitorowaniu skuteczności jej leczenia.

#### **4. Cele rozprawy doktorskiej**

Niniejsza rozprawa doktorska miała na celu ocenę przydatności badania echokardiograficznego serca w wykrywaniu wczesnych zmian zachodzących w sercu u chorych z HH.

##### **Szczegółowe cele:**

1. Ocena wpływu wieku pacjenta w momencie rozpoznania HH na parametry echokardiograficzne lewej komory serca.
2. Ocena wpływu HH, zarówno świeżo rozpoznanej, jak i wieloletniej, na grubość mięśnia lewej komory serca, a także jego związek z współwystępującymi nadciśnieniem tętniczym i cukrzycą.
3. Ocena przydatności zarówno standardowych, jak i uzyskanych za pomocą metody 2D STE, parametrów echokardiograficznych (wskaźników mechaniki obrotowej oraz odkształcenia mięśnia lewej komory serca) w wykrywaniu wczesnych zmian w sercu u chorych ze świeżo rozpoznaną HH.
4. Ocena korelacji pomiędzy poszczególnymi parametrami echokardiograficznymi a biochemicznymi wskaźnikami gospodarki żelaza.

## **5. Materiał i metody**

### **5.1 Populacja badana**

Od listopada 2014 do listopada 2018 do badania włączano kolejnych pacjentów z HH. Rozpoznanie zostało postawione w specjalistycznej klinice w oparciu o charakterystykę kliniczną, nieprawidłowe parametry gospodarki żelazem oraz potwierdzoną genetycznie mutację genu HFE. Zdrowi ochotnicy, dobrani względem wieku i płci, utworzyli grupę kontrolną. Dokładny opis poszczególnych chorych, kryteria włączenia i wykluczenia podane są w odpowiednich artykułach. Pacjentów ze świeżo rozpoznaną HH charakteryzowano jako chorych do 3 miesięcy od postawienia rozpoznania, przed rozpoczęciem leczenia. Wszyscy uczestnicy podpisali świadomą zgodę na udział w badaniu. Protokół badania został zatwierdzony przez Niezależną Komisję Bioetyczną do Spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (NKBBN/541/2017).

### **5.2 Analiza laboratoryjna**

U wszystkich pacjentów w momencie włączenia brano pod uwagę wyniki badań laboratoryjnych takich jak: poziom żelaza, ferrytyny, saturacji transferyny, poziom hemoglobiny, glukozy i aminotransferaz w surowicy krwi. Notowano również rodzaj mutacji włączonych chorych (dane są zawarte w poszczególnych publikacjach rozprawy).

### **5.3 Badanie echokardiograficzne**

Ocena echokardiograficzna serca została wykonana u każdego uczestnika badania. Przeprowadzono ją przy użyciu aparatu GE VIVID E9 (*GE Ultrasound, Horten, Norway*) wyposażonego w głowicę kardiologiczną M5S, dodatkowo dane z akwizycji 3D pozyskiwane były przy pomocy głowicy trójwymiarowej 4V. Zapisy echokardiograficzne analizowano następnie *off-line* za pomocą stacji roboczej EchoPAC (*GE Healthcare, Horten, Norway, v201*,). Szczegółowy opis techniki wykonywania badania echokardiograficznego, jak również analizy poszczególnych parametrów, zawarty jest w artykułach wchodzących w skład niniejszej dysertacji.

## **5.4 Analizy statystyczne**

Analiza statystyczna została przeprowadzona z użyciem programów STATISTICA 9,0 (StatSoft, Tulsa OK, USA) oraz środowiska statystycznego R 2.25.2. Wyczerpujący opis stosowanych metod statystycznych zawarty jest w artykułach wchodzących w skład dysertacji.

## **6. Wyniki**

### **6.1 Mutacje genetyczne i wyniki laboratoryjne badanych chorych**

Wśród 58 włączonych do badania chorych z HH mutacje genetyczne w obrębie genu HFE były następujące: mutacja C282Y/C282Y – 41 osób, C282Y/H63D – 11 osób, H63D/H63D – 4 osoby oraz C282Y/wt – 2 osoby.

Charakterystyka parametrów laboratoryjnych badanych grup chorych (gospodarka żelazem, poziom transaminaz, hemoglobiny i glikemii) przedstawiona jest w tabeli pierwszej każdego z artykułów (Tabela 1- strona rozprawy 38; Tabela I - strona rozprawy 52; Tabela 1 - strona rozprawy 70).

### **6.2 Wyniki szczegółowe pracy oryginalnej nr 1**

Na podstawie danych z piśmiennictwa wiadomo, że wraz ze starzeniem się populacji wzrasta grubość ścian lewej komory serca oraz pojawiają się zmiany w zakresie funkcji rozkurczowej. Podobny wpływ na serce wywiera HH. W pierwszej pracy oryginalnej podjęto próbę odpowiedzi na pytanie, jak wiek pacjenta w momencie rozpoznania HH wpływa na parametry echokardiograficzne lewej komory serca. Grupa 20 chorych ze świeżo rozpoznaną HH składała się z 10 pacjentów w wieku  $\geq 50$  i 10 w wieku  $< 50$  lat. Wybór takiej granicy wieku podyktowany był faktem dość młodego średniego wieku chorych z wcześniej rozpoznaną HH, ale również faktem, że wiek 50 lat uznawany jest za graniczny dla istotnych zmian w funkcji rozkurczowej lewej komory serca. Dodatkowymi kryteriami włączenia w pracy 1 były: brak objawów ze strony układu sercowo-naczyniowego, brak wywiadu chorób kardiologicznych, a co bardzo ważne – brak nadciśnienia tętniczego oraz cukrzycy; nie

włączano też chorych < 18 rż. Dobrani względem wieku i płci zdrowi ochotnicy utworzyli grupę kontrolną. Na podstawie przeprowadzonych analiz zauważono, że w porównaniu do osób zdrowych, chorzy z HH w wieku  $\geq 50$  rż cechowali się gorszymi parametrami odzwierciedlającymi funkcję rozkurczową: IVS, LVMI, Em, E/Em, PV S/D, LAAI, LAVI (Tabela 2, strona rozprawy 38). Można to próbować tłumaczyć dodatkowym wpływem HH na szybsze uszkodzenie funkcji rozkurczowej oraz nasileniem zmian przerostowych, niż to wynika z wieku badanych chorych. Może to pośrednio wskazywać na szybsze „starzenie się serca” u chorych z HH. U pacjentów młodszych (< 50 roku życia) nie stwierdzono różnic w parametrach odpowiadających funkcji rozkurczowej, podczas gdy zauważono je w odniesieniu do funkcji skurczowej: LVEF była istotnie niższa u chorych z HH, niż u osób zdrowych (Tabela 3, strona rozprawy 39).

Podsumowując, wyniki przedstawionej publikacji mogą wskazywać na możliwy wpływ wieku w momencie rozpoznania HH, bowiem chorzy  $\geq 50$  rż. wykazują różnice w zakresie parametrów funkcji rozkurczowej, podczas gdy u młodszych (< 50 rż) różnice w porównaniu do grupy kontrolnej dotyczą parametrów funkcji skurczowej. Ze względu na niewielką liczbą badanych spostrzeżenia te wymagają weryfikacji na większej grupie osób.

### **6.3 Wyniki szczegółowe pracy oryginalnej nr 2**

W kolejnej pracy oryginalnej rozprawy oceniano wpływ HH, zarówno świeżo rozpoznanej, jak i leczonej, na grubość mięśnia lewej komory serca, z uwzględnieniem współwystępujących: nadciśnienia tętniczego i cukrzycy. Wiadomo, że HH sama w sobie może prowadzić do przerostu mięśnia serca, zwłaszcza w późniejszych okresach jej trwania. Często współwystępujące z hemochromatozą nadciśnienie tętnicze oraz cukrzyca mogłyby nasilać przerost jeszcze bardziej.

Badaniu poddano 39 pacjentów ze świeżo rozpoznaną oraz 19 pacjentów z leczoną HH. Poza rutynowym pomiarem echokardiograficznym przy użyciu techniki 2D, dodatkowym narzędziem w tej pracy było użycie obrazowania trójwymiarowego dla oceny masy lewej komory serca (*full-volume*, akwizycja 6 cykli w trybie *multi-beat*). Należy zaznaczyć, że metoda ta dokonuje pomiaru masy, a nie jej szacowania, jak to ma miejsce przy zastosowaniu techniki 2D.

Wyniki przedstawionej publikacji ujawniły większe wartości parametrów odnoszących się do grubości lewej komory serca zarówno w grupie świeżo rozpoznanej, jak i wieloletniej, leczonej HH, w porównaniu do osób zdrowych. Różnice w obu grupach HH dotyczyły parametrów IVS i PW, wskaźnika RWT, długości, masy i objętości lewej komory (Tabele II i III, strony rozprawy 52 – 53). Zmiany również stwierdzono w odniesieniu do wielkości lewego przedsionka (LADs i LAVI), a należy zauważyć, że powiększenie lewego przedsionka jest znanym wskaźnikiem ciężkości i czasu trwania dysfunkcji rozkurczowej. Warto dodatkowo zauważyć, że nadciśnienie tętnicze i cukrzyca u badanych chorych nie wywierały znaczącego dodatkowego wpływu na parametry przerostu lewej komory serca (Tabele IV i V, strony rozprawy 53 – 54). To wszystko może sugerować, iż w HH mamy do czynienia raczej z kardiomiopatią indukowaną hemochromatozą, niż z prostym przerostem serca. Na zwrócenie szczególnej uwagi zasługuje też fakt, że nie parametry gospodarki żelazem, lecz czas jaki upłynął od rozpoznania, był wskaźnikiem istotnie korelującym z parametrami przerostu lewej komory serca (Tabela VI, strona rozprawy 54).

Podsumowując, wyniki przedstawionej publikacji pokazują, że nie tylko u pacjentów z wieloletnią, ale również ze świeżo rozpoznaną HH parametry grubości lewej komory są większe, niż u osób zdrowych; efekt ten nie jest do końca związany z współwystępującymi nadciśnieniem tętniczym i cukrzycą, ale może zależeć od czasu jaki upłynął od rozpoznania choroby. Wymagana jest dalsza weryfikacja tych wniosków na większych grupach osób.

## **6.4 Wyniki szczegółowe pracy oryginalnej nr 3**

Trzecia praca oryginalna poświęcona była ocenie przydatności zarówno standardowych, jak i uzyskanych za pomocą metody 2D STE parametrów echokardiograficznych (wskaźników mechaniki obrotowej oraz odkształcenia mięśnia lewej komory serca) w wykrywaniu wczesnych zmian w sercu u chorych ze świeżo rozpoznaną HH.

Jak podkreślano we wstępie, echokardiografia jest dobrze znanym i powszechnie dostępnym narzędziem diagnostycznym, a nowoczesna technika, jaką jest dwuwymiarowa echokardiografia z zastosowaniem metody śledzenia markerów akustycznych (2D STE) wydaje się pozwalać na bardziej precyzyjną ocenę mechaniki pracy serca. Oceniane za pomocą metody 2D STE odkształcenie podłużne lewej komory serca (*global longitudinal*

*strain*) oraz tzw. *twist* (skręt), stanowiący pochodną rotacji koniuszkowej i podstawnej lewej komory serca, to wskaźniki funkcji skurczowej lewej komory serca. Parametry tzw. *untwisting* (odkształcenie przeciwskrętne) charakteryzują funkcję rozkurczową lewej komory. Wiele prac w dostępnym piśmiennictwie odnosi się do wyżej wspomnianych parametrów w kardiomiopatii przerostowej, amyloidozie, stenozie aortalnej, chorobie Fabry'ego, w opisie serca sportowca czy nadużywania sterydów anabolicznych. W zakresie zaburzeń gospodarki żelazem pojedyncze prace odnoszą się do chorych z beta-talasemią. Brak natomiast danych dotyczących zastosowania techniki 2D STE u pacjentów z HH. Stanowiło to przedmiot publikacji nr 3.

Badaniem objęto 24 pacjentów z HH, a kryteriami wykluczenia były nadciśnienie tętnicze i cukrzyca, wywiad i objawy ze strony układu sercowo-naczyniowego. W metodyce pracy nr 3 znajduje się dokładny opis pomiaru poszczególnych parametrów 2D STE (strony rozprawy 66 – 67, ryciny 1 – 6 na stronach 67 – 70). Wyniki standardowych parametrów echokardiograficznych u wszystkich chorych z HH mieściły się w granicach normy i nie różniły się od parametrów grupy kontrolnej (Tabela 2, strona rozprawy 71). Nie mniej jednak badanie ujawniło znamienne mniejsze wartości parametrów rotacji, skrętu i przeciwskrętu, jak również odkształcenia podłużnego lewej komory serca w grupie HH (Tabela 3, strona rozprawy 71). Pozwala to na wnioskowanie, iż metoda 2D STE jest czułym narzędziem mogącym się okazać przydatnym w przewidywaniu wystąpienia zmian w sercu u chorych z HH.

Drugą ważną obserwacją w przedstawionej pracy nr 3 jest brak korelacji pomiędzy parametrami echokardiograficznymi, a biochemicznymi wskaźnikami poziomu żelaza we krwi (Tabela 4, strona rozprawy 72). W innych chorobach związanych z przeładowaniem organizmu żelazem (np. w beta-talasemii), również opisywano brak takiej korelacji, co nasuwa podejrzenie, że przeładowanie żelazem samo w sobie nie jest jedynym mechanizmem odpowiedzialnym za rozwój kardiomiopatii.

Wyniki pracy oryginalnej nr 3 wydają się mieć duże znaczenie naukowe i praktyczne, aczkolwiek wymagają rozszerzenia na większe grupy chorych z uwzględnieniem okresu obserwacji i stosowanego u tych chorych leczenia. Praca została wyróżniona przez Redaktorów gazety *ECHOCARDIOGRAPHY* poprzez umieszczenie jej w dziale **BEST PAPER** numeru.

## 7. Ograniczenia pracy

Niniejsza rozprawa doktorska posiada szereg ograniczeń. Ocena chorych z HH oparta była tylko o badanie echokardiograficzne; nie wykorzystano w publikacjach wyników innych technik, na przykład rezonansu magnetycznego serca, co na pewno przyczyniłoby się do jeszcze lepszego zrozumienia zmian zachodzących w sercu u chorych z HH. Powinno to niewątpliwie stanowić przedmiot dalszych publikacji zespołu. Jednak należy zwrócić uwagę na fakt, że echokardiografia jest metodą zdecydowanie bardziej dostępną, niż rezonans, tańszą oraz nie obciążającą dla pacjenta (brak podawania kontrastu w rutynowych badaniach), dlatego stwierdzenie jej samodzielnej roli w wykrywaniu zmian w sercu może mieć duże znaczenie kliniczne, między innymi w doborze chorych, u których ostatecznie należy wykonać również rezonans serca. Ważnym ograniczeniem rozprawy jest również brak odległej obserwacji badanych chorych oraz nieliczne badane grupy (w szczególności w pracy oryginalnej nr 1), co na pewno powinno stanowić przedmiot dalszych badań.

## 8. Wnioski

Zajęcie procesem chorobowym serca w HH jest poważnym czynnikiem rokowniczym, dlatego możliwość wykrywania wczesnych zmian w sercu, zanim dojdzie do rozwoju pełnoobjawowej choroby serca, wydaje się mieć ogromne znaczenie kliniczne. W tym aspekcie ocena echokardiograficzna serca, z zastosowaniem nowoczesnej techniki śledzenia markerów akustycznych, u chorych z HH stanowi ważny krok diagnostyczny.

Na podstawie przeprowadzonych analiz wyciągnięto następujące szczegółowe wnioski:

1. Wiek chorych w momencie rozpoznania HH wydaje się mieć istotny wpływ na zmiany obserwowane w sercu. U chorych powyżej 50 rż. jest to szczególnie zauważalne w zakresie parametrów funkcji rozkurczowej, podczas gdy u młodszych wpływ choroby jest szczególnie istotny w zakresie funkcji skurczowej.
2. Nie tylko u pacjentów z wieloletnią, ale także ze świeżo rozpoznaną HH parametry grubości lewej komory serca są większe, niż u osób zdrowych; efekt ten nie jest do końca związany z współwystępującymi nadciśnieniem tętniczym i cukrzycą, lecz może wykazywać związek z czasem jaki upłynął od rozpoznania choroby.



3. Mimo braku zmian w zakresie standardowych parametrów echokardiograficznych, oceniane za pomocą metody śledzenia markerów akustycznych wskaźniki rotacji i odkształcenia lewej komory były istotnie gorsze u pacjentów ze świeżą HH, niż u osób zdrowych, co pozwala sugerować, iż technika 2D STE może się okazać przydatnym narzędziem diagnostycznym w przewidywaniu zmian w sercu u chorych z HH.
4. Brak korelacji pomiędzy poszczególnymi parametrami echokardiograficznymi, a biochemicznymi wskaźnikami gospodarki żelaza we krwi może nasuwać podejrzenie, że przeładowanie żelazem samo w sobie nie jest jedynym mechanizmem odpowiedzialnym za rozwój kardiomiopatii w HH.

## 9. Streszczenie pracy w języku angielskim

### 9.1 Background

Hereditary haemochromatosis (HH) is one of the most common inherited metabolic diseases among Caucasians; it occurs with a frequency of 1 – 2 for 500 people. In over 80% of cases, it is associated with homozygous mutations in the C282Y HFE gene and occasionally with mutations in other genes, which products are involved in the regulation of iron turnover in the human body. Dysfunction of molecules that control iron homeostasis leads to excessive iron absorption in the duodenum and upper section of the small intestine, as well as its maldistribution. As there is no regulatory mechanism for iron excretion from the human body, iron is deposited in many organs (liver, pancreas, skin, joints, gonads, heart) over the course of the disease.

Bioactive iron ions produce oxidative stress that destroys involved tissues. Cardiomyocytes, due to intense iron intake, are very susceptible to this type of damage. The process of cardiac involvement is slow and runs for years. It manifests as an impaired diastolic function and cardiac hypertrophy at first and, by the time passes, it leads to dilatative cardiomyopathy and heart failure, which is responsible for approximately 1/3 of deaths from the natural course of haemochromatosis. The well known HH complications are also arrhythmias, both ventricular and supraventricular. Another additional diseases that occur more frequent in HH than in general population are arterial hypertension and diabetes.

Genetic testing enables to detect the disease at an early stage and, consequently, to start treatment early enough to stop the alterations in different organs, including the heart. The basic therapy in HH patients are venesections. However, some clinical problems, such as anaemia, cancer or hemodynamic instability, are contraindications for that treatment. As an alternative therapy there are chelating drugs, for example deferoksamine (parenteral), or deferipron (oral drug). The ultimate treatment is the heart transplantation.

On the basis of an existing literature, described in details in the review article included in this dissertation, it was noticed, that quite little research has been dedicated to the cardiac evaluation of HH patients, and the vast majority of publications in this issue concerned patients in late stages of the disease, with full-blown heart failure. From the moment the heart failure appears the prognosis is poor, therefore, there should be strong emphasis on early detection of any cardiac lesions before heart failure occurs. In this regard

the most useful diagnostic tool for clinicians is the echocardiography, and particularly the novel technique - 2D speckle tracking echocardiography, which allows an early detection of abnormalities in the heart, before deterioration of standard echo parameters and before the development of full-blown heart failure occur. Echocardiography may have important practical significance, in both: predicting the occurrence of heart damage in the HH and to monitor the effectiveness of treatment.

## **9.2 The aims of the study**

This doctorate dissertation aims to evaluate the utility of echocardiography in detecting early changes of the heart in patients with HH.

### **Detailed aims:**

1. The assessment of the impact of an age at the moment of HH diagnosis on standard echocardiographic parameters of the LV.
2. The assessment of the impact of the HH, both: recently recognized, and long-lasting disease, on the LV wall thickness, as well as LV wall thickness's relationship with intercurrent arterial hypertension and diabetes.
3. The assessment of usefulness of both: standard and novel echocardiographic techniques in evaluation of the discrete LV dysfunction in patients with recently diagnosed HH.
4. The assessment of correlation between echocardiographic parameters and biochemical iron turnover parameters.

## **9.3 Materials and methods**

### **9.3.1 Study population**

From November 2014 to November 2018, consecutive patients with HH were enrolled. The diagnosis was made in specialist clinic and was based on clinical characteristics, abnormal iron turnover parameters and the presence of HFE gene mutations. Healthy age- and sex-matched volunteers constituted control group. The exact description of the individual patients, criteria for inclusion and exclusion are described in the relevant articles. Patients

with recently diagnosed HH characterized as diagnosed within 3 months prior to enrolment, before the start of the treatment. Written informed consent was obtained from all participants. The protocol of the study was approved by the Local Ethics Committee at the Medical University of Gdańsk (NKBBN/541/2017).

### **9.3.2 Laboratory analysis**

In all HH patients iron and serum ferritin level, transferrin saturation (TSAT) level, as well as haemoglobin and glucose level at time of the first contact were taken into consideration. Genetic testing results were also noted (the data are contained in respective articles included in this dissertation).

### **9.3.3 Echocardiography**

Echocardiographic assessment was performed in every person enrolled into the study. The GE VIVID E9 ultrasound system (*GE Ultrasound, Horten, Norway*) equipped with phased-array transducer (M5S) and 3D transducer 4V were used. All echocardiograms were stored digitally and further off-line analysis was performed using commercial workstation EchoPAC (*GE Healthcare, Horten, Norway, v201*). A detailed description of the echocardiography performing technique, as well as the analysis of the individual parameters are contained in the articles included in this dissertation.

### **9.3.4 Statistical analysis**

The statistical analysis was conducted with the STATISTICA 9.0 (StatSoft, Tulsa OK, USA) package and R 2.25.2 environment. A comprehensive description of the statistical methods that were used is contained in the articles included in the dissertation.

## **9.4 Results**

### **9.4.1 Genetic testing and laboratory analysis results**

Among 58 HH patients included in the study the genetic testing results were as follows: C282Y/C282Y mutation – 41 patients, C282Y/H63D mutations – 11 patients, H63D/H63D mutations – 4 patients, and C282Y/wt – 2 patients. Characteristics of laboratory

parameters (iron, transaminases, haemoglobin and serum glucose) is presented in the first table of each article (Table 1, page 38; Table I, page 52; Table 1, page 70).

#### **9.4.2 Detailed results of original study no 1**

According to the data from literature, it is known that the LV wall thickness and diastolic function changes occur with an increasing age. HH has similar effect on the heart. Therefore, the first article attempted to answer the question: how the age of patients at the moment of HH diagnosis influences the LV echocardiographic parameters. The group of 20 patients with newly diagnosed HH consisted of 10 patients  $\geq 50$  years old (yo) and 10 patients  $< 50$  yo. The choice of such age limit was dictated by the fact of quite a young average age of patients with early diagnosed HH, but also the fact that the age of 50 yo is considered the cut-off for significant changes in LV diastolic function of the heart. Additional inclusion criteria for original study nr 1 were: no symptoms from the cardio-vascular system, the lack of anamnesis of any heart diseases, and, what is very important – the lack of arterial hypertension and diabetes. Patients  $< 18$  yo were not enrolled. The age – and sex – matched healthy volunteers constituted the control group.

On the basis of the analyses, it was noted, that compared to healthy subjects, patients with HH  $\geq 50$  yo had worse parameters reflecting the diastolic function: IVS, LVMI, Em, E/Em, PV S/D, LAAI, LAVI. (Table 2, page 38). It might be explained by the additional influence of HH on worsening of the diastolic function and also on severity of hypertrophic changes of the LV than it is apparent according to the age. It might also indirectly indicate the faster process of “heart aging” in HH patients. In younger subgroup of HH patients ( $< 50$  yo) the diastolic parameters were not significantly different from the controls, whilst the systolic function was worse – the ejection fraction of the LV (LVEF) was significantly lower than in healthy group. (Table 3, page 39).

Summarizing, the results of this original study may indicate the possible influence of age at the moment of HH diagnosis, because patients  $\geq 50$  yo have worse diastolic function parameters, whilst younger patients ( $< 50$  yo) have worse systolic function parameters when compared to the controls. Due to small sample size these findings require verification on a larger group of patients.

#### **9.4.3 Detailed results of original study no 2**

In second original study the influence of HH (early diagnosed as well as long-lasting and treated) on the LV wall thickness was assessed with consideration of intercurrent arterial

hypertension and diabetes. It is known, that HH, especially at the late stages leads to cardiac hypertrophy. Arterial hypertension and diabetes, which are often concomitants of HH, could exaggerate the hypertrophy.

In this study there were 39 patients with recently diagnosed and 19 patients with treated HH enrolled. Besides the routinely used 2D echocardiography, the 3-dimensional acquisition was made to assess the left ventricle mass (LV mass). The 3D echocardiography is much more precise in assessment of LV mass in comparison to 2D echocardiography – 3D technique allows to quantify, whilst 2D only estimates the LV mass.

The results of the presented study revealed higher values of parameters relating to the LV wall thickness in both groups of HH patients (recently diagnosed and long-term treated disease) in comparison to healthy subjects. In both subgroups the differences affected parameters: IVS, PW, RWT, LV length and mass (Tables II and III – pages 52 – 53). The changes were also stated in relation to the size of the left atrium (parameters: LADs and LAVI), and it should be noted that enlargement of the left atrium is a well-known indicator of the severity and duration of diastolic dysfunction. It is also worth noted that neither arterial hypertension nor diabetes had significant additional impact on the LV hypertrophy (Tables IV and V, pages 53 – 54). All this may suggest that we deal with HH induced cardiomyopathy rather than with simple cardiac hypertrophy. The special attention should be paid on fact, that not the iron turnover parameters correlated with LV hypertrophy, but the time from HH diagnosis (Table VI, page 54).

To conclude, the results of the second original study show, that not only in long-lasting and treated HH, but also in recently diagnosed disease, the LV wall thickness parameters are increased when compared to healthy group; this effect is not really related to intercurrent arterial hypertension and diabetes, but to time from HH diagnosis. These findings require verification on a larger sample size.

#### **9.4.4 Detailed results of original study no 3**

The third original study was dedicated to assessment of usefulness of standard echocardiographic and 2D STE parameters (the indices of rotational mechanics and deformation of the LV) in revealing early cardiac lesions in recently diagnosed HH patients.

As it was highlighted in the introduction, echocardiography is a well known and widely accessible diagnostic tool, and novel technique, which is two-dimensional echocardiography using the method of speckle tracing (2D STE) seems to allow a more precise evaluation of the mechanics of the heart. Evaluated by the 2D STE method left

ventricular global longitudinal strain and twist (which is derived from the rotation of the apex and the basis of LV) are the indices of LV systolic function. The untwisting parameters refer to the LV diastolic function. Many studies refer to the above-mentioned parameters in: hypertrophic cardiomyopathy, amyloidosis, aortic stenosis, Fabry's disease, athletes' heart, or the anabolic steroids abuse. In terms of iron metabolism disorders, single studies refers to beta-thalassaemia. However, no data is available in accordance to 2d STE technique in HH patients. That was the purpose of the third original study.

In the study there were 24 patients with HH enrolled; the exclusion criteria were: arterial hypertension, diabetes, medical anamnesis of cardiac disease and any symptoms from the cardiovascular system. In methodology chapter of this study there is a comprehensive description of 2D STE parameters (pages 66 – 67, Figures 1 – 6 on pages 67 – 70). The standard echocardiographic parameters were in normal range in all HH patients and did not differ from the control group (Table 2, page 71). However, the study revealed significantly lower values of the rotational parameters, twist and untwisting, as well as the LV global longitudinal strain in HH patients (Table 3, page 71). This allows a deduction that 2D STE is a sensitive diagnostic tool, that may be useful in predicting cardiac involvement in patients with HH.

The second important observation in the third article is the lack of correlation between echocardiographic and iron turnover parameters. (Table 4, page 72). In other iron overload diseases (e.g. in beta-thalassaemia), no such correlation were also reported, which raises the suspicion that the iron overload itself is not the only mechanism for development of cardiomyopathy.

The results of the third study seem to have important scientific and practical relevance, but require larger sample size, taking into consideration also the follow up and the characteristics of the treatment. The study was distinguished by the ECHOCARDIOGRAPHY editors by placing it in the section BEST PAPER of the journal.

## **9.5 Limitations of the study**

This doctorate dissertation has a few limitations. The evaluation of patients with HH was based only on echocardiography; other diagnostic techniques, such as magnetic resonance, were not used, which would certainly contribute to better understanding the cardiac involvement in HH. It should definitely be the subject of further research. However,

attention should be paid to the fact, that echocardiography is far more available, cheaper and less aggravating for patients (the lack of administration of contrast in routine tests) than cardiac magnetic resonance, so ascertainment the independent role of echocardiography in detecting cardiac involvement may have big clinical importance, for example in the selection of patients who eventually follow the cardiac magnetic resonance. An important limitation of the study is also the lack of follow up and the small sample size (especially in the first study), which certainly should be the subject of further research.

## 9.6 Conclusions

The cardiac involvement in HH is a major risk factor for poor prognosis, so the ability to detect early cardiac lesions, before the development of full-blown heart failure, seems to be very important. In this respect, the echocardiographic evaluation with the use of modern echocardiographic techniques in patients with HH is an important diagnostic step.

On the basis of conducted in this dissertation analyses, the following conclusions were drawn:

1. Age of patients at the moment of HH diagnosis seems to have substantial effect on the cardiac lesions. In patients above 50 yo it is particularly noticeable in attribution to diastolic function parameters, whilst in younger patients (< 50 yo) the disease affects mainly systolic function.
2. Not only patients with long-lasting, but also with recently diagnosed HH, have greater values of LV wall thickness parameters than in controls; this effect is not entirely related to the intercurrent arterial hypertension and diabetes, but it may indicate a relationship with the time from HH diagnosis.
3. Despite the lack of abnormalities in the standard echocardiographic examination, the indices of LV rotation and LV strain, evaluated by the 2D STE technique, were significantly worse in recently diagnosed HH patients than in controls, which allows the suggestion that 2D STE technique may be a useful diagnostic tool in predicting cardiac lesions in HH patients.
4. The lack of correlation between echocardiographic and iron turnover parameters may suggest the suspicion, that the iron overload itself is not the only mechanism for development of cardiomyopathy.