

СЕРУМНИ ПОКАЗАТЕЛИ НА ОБМЯНА НА ЖЕЛЯЗО И ЧЕРНОДРОБНА КОНЦЕНТРАЦИЯ НА ЖЕЛЯЗО ПРИ ПАЦИЕНТИ С ХРОНИЧЕН ВИРУСЕН ХЕПАТИТ С

М. Пенкова¹, М. Гълъбова², Юл. Ананиев²

¹ Катедра по вътрешни болести, Медицински факултет, Тракийски университет - Стара Загора,

² Катедра по обща и клинична патология, УМБАЛ, Медицински факултет, Тракийски университет - Стара Загора

6000 „Армейска”11, e-mail - mpenkovadoc@abv.bg

SERUM IRON INDICES AND HEPATIC IRON IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C

M. Penkova¹, M. Gulubova², J. Ananiev²

¹ Department of internal diseases, Medical Faculty, Trakia University, Stara Zagora, Bulgaria

² Department of General and Clinical Pathology, Medical Faculty, Trakia University, Stara Zagora, Bulgaria

6000 „Armeiska Str.”11, e-mail - mpenkovadoc@abv.bg

ABSTRACT

Serum iron indices are believed to be elevated in patients with hepatitis C virus (HCV) infection in connection to the presence of hepatic inflammation, though this hypothesis has never been formally tested. **The aim** of this study was to investigate the existence and role of iron overload in liver activity and prognosis of liver damage. **Material and methods:** We studied 59 consecutive, unselected anti HCV antibody positive patients, aged 24 to 60 years. Iron, transferrin saturation and ferritin were measured in fasting serum samples. Histologically detectable iron (HDI) as well as histologic grading and staging were estimated semiquantitatively in liver biopsy samples. **Results:** The median values for serum iron, transferrin saturation and serum ferritin were 24 micromol/l (range, 8-41), 29 percent (range, 16-43) and 170 microg/l (range, 1-654), respectively. At univariate analysis, all three serum iron indices were positively correlated with grading and staging scores, as well as with HDI in the liver; only serum iron was positively correlated with transaminases. At multivariate analysis, independent associations were found between serum iron and the grading score; ferritin and sinusoidal and portal HDI; transferrin saturation and total hepatic HDI. **In conclusion**, in hepatitis C, serum iron reflects the degree of current hepatic inflammation and necrosis, whereas the extent of progressive deposition of iron in sites of fibrosis is best reflected by serum ferritin.

Key words: serum ferritin, serum iron, transferrin saturation, chronic hepatitis C, hepatic iron concentration, liver fibrosis.

Въведение

При пациентите с хронични чернодробни заболявания е установена тенденция за натрупване на прекомерно количество желязо в чернодробния паренхим. Най-често при случаи на алкохолна чернодробна болест, неалкохолен стеатохепатит или инфекция с вируса на хепатит С има описано умерено изразено „вторично претоварване с желязо” (1-5). The reason for the iron excess is not known, but postulated mechanisms include the release of iron from injured hepatocytes and their uptake by Kupffer cells, acute-phase reactions associated with chronic inflammatory states, increased uptake of iron through the gastrointestinal tract, and ineffective erythropoiesis with redistribution of iron from sites of utilization to sites of storage. Около 30 процента от пациентите с чернодробни заболявания имат високи серумни нива на желязото и около 10 процента са с повишено отлагане на желязо в чернодробната тъкан (6, 7).

Причината за излишък на желязо не е известна, но се предполагат механизми, включващи освобождаване на желязо от увредени хепатоцити, остро фазови реакции, свързани с хронични възпалителни процеси, увеличаване на поглъщането на желязо през стомашно-чревния тракт и неефективна еритропоеза с преразпределение на желязото от органи с използване към органи за съхранение. The most likely mechanisms of liver injury from excess iron are increased generation of free radicals and increased peroxidation of lipids, which, in turn, lead to mitochondrial dysfunction, lysosomal fragility and cell death. Най-вероятните механизми на увреждане на черния дроб от излишното желязо са увеличаване производството на свободни радикали и по-голяма пероксидация на липидите, които, на свой ред водят до митохондриална дисфункция, лизозомна нестабилност и клетъчна смърт (6, 7, 8). При хроничният хепатит С стеатозата е честа хистологична находка и се проявява при 30- 70 % от пациентите (9). Биологичните механизми за получаване на стеатоза при HCV инфекцията не са установени точно, но се смята, че са свързани с метаболитните механизми, включително инсулиновата резистентност (IR) и претоварването с желязо (9, 10). При неалкохолната стеатозна чернодробна болест, последните проучвания показват противоречиви данни за ролята на желязото за получаване на чернодробно увреждане (11, 12). Според Bonkovsky и сътр. (8), пациентите с неалкохолна стеатозна чернодробна болест и претоварване с желязо имат по – тежка чернодробна болест, докато други автори (13, 14) не наблюдават връзка между желязото и прогресирането на чернодробното увреждане.

Синдром на претоварване с желязо се докладва в около 30-40% от болните с хроничен хепатит С (2, 4, 11). Свързва се с директното въздействие на хепатит С вирусните белтъци върху секрецията на хепсидина. Както сидерозата, така и носителството на C282Y мутации корелират с по-висока възпалителна активност, напреднала фиброза и по-лош терапевтичен ефект на интерферон базираната терапия. В някои случаи терапевтичната флеботомия има благоприятен ефект, но други автори не потвърждават тези резултати. Според M. Bassett (6), сидерозата може да се разглежда като сурогатен маркер за тежестта на заболяването.

Ние анализирахме в нашето проучване зависимост между повишена концентрация на чернодробно желязо и степен на чернодробно увреждане при пациенти с хроничен вирусен хепатит С.

Целта на настоящото проучване е да се проучи наличието и ролята на натрупването на желязо в серума и черния дроб при пациенти с хроничен вирусен хепатит С и да се прогнозира неговата роля за увреждането на черния дроб.

Материал и методи:

Проучихме 59 пациенти с хроничен хепатит С - серологично и хистологично (n= 43) потвърдена диагноза - METAVIR – F1 (n= 15), F2 (n= 27) и F3 (n= 1); доказана вирусна репликация; на възраст от 24 до 60 години. Освен проведените стандартни лабораторни и инструментални изследвания (абдоминална ехография с доплер, фиброгастроскопия и др.), допълнително са определени следните параметри за оценка на синдрома на претоварване с желязо - серумно желязо (мъже: 12,5 – 26 mmol/L; жени: 10,5 - 23 mmol/L), общ желязо-свързващ капацитет (ЖСК, 44 - 66 mmol/L), и серумен феритин (мъже: 20 – 280 mg/L жени: 10 – 140 mg/L). Изчислено бе и насищането на трансферина ($Fe \div ЖСК \times 100\%$, с референтни граници 20-40%). Хистологичното изследване бе проведено на материал от перкутанна или хирургична чернодробна биопсия. Оценени са хистологичната активност и стадий на заболяването съответно по метода на Brunt (стеатоза и стеатозен хепатит), METAVIR (хронични вирусни хепатит) и други. За доказване на желязо в чернодробната тъкан бе използвано оцветяване по Ishak и Perl's Prussian-синьо. Оценени бяха типа и степента на отлагането му.

Статическият анализ на резултатите включва Mann-Whitney тест, ANOVA и колерационни параметрични и непараметрични анализи.

Резултати:

Всички пациенти са изследвани за честота и взаимовръзка между повишените чернодробни ензими, ехографски диагностицирана стеатоза, белези на метаболитен синдром и показатели на обмяна на желязо, чернодробно съдържание на желязо, наличие и тежест на стеатоза и фиброза.

Средните стойности за серумното желязо, сатурация на трансферин и серумен феритин са съответно 24 микромола / л (диапазон 8-41), 29% (диапазон, 16-43) и 170 микромола / л (диапазон 1-654) . При проследяване на показателите на обмяна на желязо при пациентите с хроничен хепатит С и стеатоза, със и без затлъстяване – по-високи стойности се установяват при лицата със затлъстяване.

Изследван е материал от сляпа чернодробна биопсия, при всички рискове от възможността промените да не са дифузни. Извършва се хистологичен преглед на препаратите и той се оценява по съвременните критерии, използвани от всички автори - модифицираната система за градиране и стадиране на Ishak – Knodel -1995г, Метапир-скалата, чрез които се определя индекса на хистологична активност/NAI/, т.е. каква е тежестта на болестта и има ли вече чернодробна цироза и колко напреднала е тя. Хистологична активност и степен на активност при пациентите с хроничен хепатит С е представена на фиг. 1

От гледна точка на хистологичните промени бе налице значима корелация между наличието на стеатоза и серумните показатели на желязната обмяна ($p=0,001$), както и връзка между серумното желязо ($p=0,0001$), феритина ($p=0,0001$), ЖСК ($p=0.001$) и насищането на трансферина ($p=0.001$) със стеатозния хепатит. Стойностите на показателите на обмяната на желязото, с изключение на ЖСК показаха също корелация с наличието и стадия на фиброза ($p=0,019$).

Позитивна реакция за желязо в чернодробната тъкан отчетохме при 21% отболните с хроничен хепатит С. Отлагането на желязото бе предимно в лека до умерена степен. При нашите пациенти депозити на желязо се откриват предимно в непаренхимни клетки на черния дроб (Купферови клетки), самостоятелно или по-често, в различни комбинации със синусоидалните клетки и порталните пътища(2) Iron deposits in hepatocytes showed a decreasing gradient from the periportal areas to the centrilobular veins in most patients.. Серумните маркери на желязната обмяна бяха в по-високи стойности при случаите с позитивна реакция за желязо в черния дроб.

Линеен регресионен анализ на трите серумни индекси на желязо показа, че те са в положителна корелация с концентрацията на желязо в черния дроб, само серумното желязо е в положителна корелация със серумните трансаминази. В мултивариантен анализ, се намери зависимост между серумното желязо и степента на чернодробно увреждане, феритин и синусоидална и портална концентрация на желязо в черен дроб, сатурация на трансферин и обща чернодробна концентрация на желязо.

Дискусия и изводи:

НТo our knowledge, the present study is the first one in which a qualitative evaluation and semiquantitative scoring of hepatic iron deposits were performed in a large group of patients with СН-С infection. астоящото проучване е опит за оценка на честотата на претоварване с желязо при пациенти с хроничен вирусен хепатити С. От различните методи за доказване на желязо в чернодробната тъкан, приехме качествената проба за оцветяване с Прусско синьо като най-информативна (15). Този метод е чувствителен особено при търсене на малки количества натрупано желязо, което е най- често при пациенти с „ вторично натрупване на желязо” при хронични чернодробни заболявания. Той дава възможност да се получи информация за

натрупано желязо дифузно (по цялата чернодробна тъкан), а не на парче (както се случва с количественото измерване), като намалява риска от недостатъчна оценка поради неравномерното разпределение на желязо в чернодробната проба. Освен това, качествената оценка на чернодробните депозити желязо, може да бъде много информативна, тъй като механизмите, водещи до натрупване на чернодробно желязо в хепатоцитите и ретикулоендотелните клетки са различни и желязото може да има различни патогенни роли в зависимост от чернодробните клетки, в които се натрупва. Други автори (11, 14) дават предимство на количествената биохимична оценка. It is sensitive (a critical point, especially when searching for low amounts of accumulated iron as expected in a large number of patients with CVH) and is measured on the whole hepatic specimen and not on a fragment (as occurs by quantitative measurement), reducing the risk of an inadequate evaluation owing to uneven distribution of iron in the hepatic sample. Въз основа на двата метода за оценка на чернодробното желязо, ние установихме: (1) При нашите пациенти с хронични чернодробни заболявания, депозити на желязо се откриват главно в хепатоцитите, самостоятелно или, често, в различни комбинации със синусоидалните клетки и порталните пътища. (2) Депозитите на желязо в хепатоцитите показват намаляване на градиента от перипорталните области към центрилобуларните области при повечето пациенти. Тези данни, които потвърждават и разширяват предишните открития в по-малки серии (11, 14 15), позволяват да бъдат направени следните заключения: На първо място, механизмът за натрупване на желязо в пациентите с хронични чернодробни заболявания е по-сложен, отколкото се приемаше до момента и не може да се обясни само или просто с отделянето на желязо от некротични хепатоцити или с възпалително-медиирани смущения. Всъщност, в тези случаи, желязото се натрупва предимно в непаренхимни клетки на черния дроб (Купферови клетки), констатирано при редица автори (10, 14), включително и нашето проучване. Тези изследвания, заедно с установеното от нас намаляване на желязото от перипорталните към центрилобуларни зони, показват, че част от съдържанието на желязо в черния дроб произтича от порталната кръв и е резултат на повишена резорбция на желязо от червата.

Second, the observed association between *HFE* genotypes and hepatocyte iron score, but not sinusoidal and portal iron scores (expected but never demonstrated before), indicates that in patients with CH-C infection, mutated *HFE* favors iron accumulation in the hepatocytes. Based on this finding and on recent experimental studies on *HFE* function, it also can be speculated that in CH-C infection, the presence of even 1 *HFE* mutation decreases the ability of macrophages to retain iron as normal macrophages do in response to the hepatitis-related inflammatory challenge. This might favor hepatocyte iron accumulation on the one hand and influence macrophage response to viral infection, favoring viral replication and disease progression, on the other hand. Third, because a number of patients with CH-C infection with iron accumulation had a wild-type *HFE* genotype, it could be hypothesized that other factors, genetic or acquired, influence iron absorption in patients with CH-C infection. There is evidence that the amount of iron overload in the liver is highly variable in different animal strains. Има доказателства, че натрупването на желязо в черния дроб е силно променливо в различни животински щамове (13) и чувствителността към чернодробното претоварване с желязо в миши модели има значителен генетичен компонент и се предава по наследство като комплексна черта. Промени в еритропоезата, интрахепатални шънтове и нарушен синтез на трансферин са установени в патогенезата на хепатоцелуларно натрупване на желязо при пациенти с напреднала цироза. Papanikolaou G. и съавт. (12) доказаха намаляване на хепцидиновите нива при пациенти с напреднало заболяване на черния дроб. Последните проучвания показват (3, 11, 15), че тежка фиброза и цироза са свързани със значително по-голямо чернодробно натрупване на желязо, включващо хепатоцити, синусоидални клетки, както и портални пътища. Чернодробното натрупване на желязо при пациенти с хроничен хепатити С е по-ниско отколкото при пациенти с хемохроматоза, което показва, че и по-малките количества желязо могат да

служат като съпътстващи фактори за увеличаване на тежестта и / или степента на активност на чернодробните увреждания. Нашите резултати до момента не позволяват категорично заключение за определянето на тази причинно-следствена връзка, която изисква дългосрочни проучвания с проследяване на множество биопсии в динамика.

В заключение, резултатите от нашето проучване показват, че честотата и степента на отклонение на серумните маркери на желязната обмяна и сидерозата са изразени при 30% от пациентите с хроничен хепатит С. Серумните маркери на желязното свръхнатоварване корелират с чернодробните ензими, някои от чернодробни функционални параметри и сидерозата, както и с наличието на стеатоза, стеатохепатит и фиброза. При хепатит С, серумното желязо отразява степента на чернодробно възпаление и некроза, докато степента на постепенното отлагане на желязо в черен дроб и развитие на фиброза е най-добре отразена от серумния феритин.

Литература

1. Аджаров, Д., Петкова Г., Косева О., Желязото като патогенетичен фактор при хроничната HCV-инфекция, Бълг. Хепатогастроентерология, 2005, 2, 33-37.
2. Антонов, К. Докторска дисертация, 2009.
3. Практически алгоритми (консенсуси) по гастроентерология. Хронични вирусни хепатити., Българска хепатогастроентерология, 8, 2009, 84-91.
4. Alexander J, Tung BY, Croghan A, Kowdley KV. Effect of iron depletion on serum markers of fibrogenesis, oxidative stress and serum liver enzymes in chronic hepatitis C: results of a pilot study. *Liver Int.*, 2007, 27, 268–73.
5. Alla V, Bonkovsky HL. Iron in nonhemochromatotic liver disorders. *Semin Liver Dis.*, 2005, 25, 461–472.
6. Bassett ML. Iron and hepatitis C: beginning to make sense. *J Gastroenterol Hepatol.*, 2007, 22, 1703–4.
7. Batts KP. Iron overload syndromes and the liver. *Mod Pathol.*, 2007, 20(Suppl. 1), S31–S39.
8. Bonkovsky HL, Lambrecht RW, Shan Y. Iron as a co-morbid factor in nonhemochromatotic liver disease. *Alcohol*, 2003, 30, 2, 137-44.
9. Fargion S, Valenti L, Fracanzani AL. Beyond hereditary hemochromatosis: new insights into the relationship between iron overload and chronic liver diseases. *Dig Liver Dis.*, 2011 43, 2, 89-95.
10. Guyader D, Thirouard AS, Erdtmann L, et al. Liver iron is a surrogate marker of severe fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol.*, 2007, 46:587–95.
11. Ludwig J, Hashimoto E, Porayko MK, Moyer TP, Baldus WP. Hemosiderosis in cirrhosis: a study of 447 native livers. *Gastroenterology*, 1997, 112: 882–8.
12. Papanikolaou G, Tzilianos M, Christakis JJ, Bogdanos D, Tsimirika K, MacFarlane J, et al. Hcpidin in iron overload disorders. *Blood*. 2005;105:4103–4105
13. Lou DQ, Lesbordes JC, Nicolas G, Viatte L, Bennoun M, Van Rooijen N, et al. Iron- and inflammation-induced hepcidin gene expression in mice is not mediated by Kupffer cells in vivo. *Hepatology*. 2005;41:1056–1064
14. Turlin B., Mendler M.H., Moirand R., Guyader D., Guillygomarc'h A., Deugnier Y. Histologic features of the liver in insulin resistance-associated iron overload. A study of 139 patients *Am J Clin Pathol* 2001 ; 116 : 263-270
15. Sebastiani G, Walker AP. HFE gene in primary and secondary hepatic iron overload. *World J Gastroenterol.*, 2007, 13, 4673–4689.

Correlations

		glucose	Uricacid1	Triglycerides1	BMI1	Waist1
Fe1	Pearson Correlation	,305(**)	,159(*)	,306(**)	,429(**)	,311(**)
	Sig. (2-tailed)	,000	,019	,000	,000	,000
	N	220	220	220	220	220
Feritin1	Pearson Correlation	,342(**)	,234(**)	,412(**)	,428(**)	,369(**)
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000	,000
	N	220	220	220	220	220
JSK1	Pearson Correlation	,144(*)	,025	,172(*)	,376(**)	,272(**)
	Sig. (2-tailed)	,033	,712	,011	,000	,000
	N	220	220	220	220	220
Scorect	Pearson Correlation	,318(**)	,193(**)	,298(**)	,372(**)	,281(**)
	Sig. (2-tailed)	,000	,004	,000	,000	,000
	N	220	220	220	220	220

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

- Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Correlations

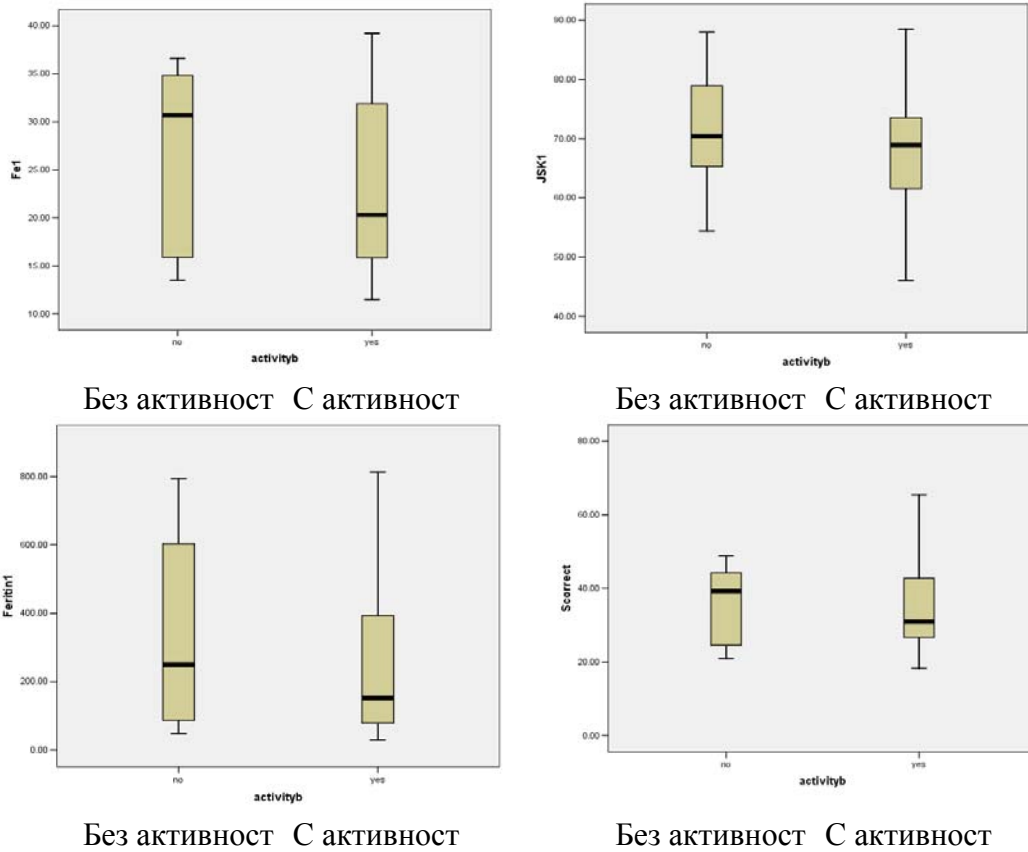
		AST1	ALT1	GGT1	AP1	totbil1	directbil1
Fe1	Pearson Correlation	,409(**)	,361(**)	,428(**)	,206(**)	,223(**)	,249(**)
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,002	,001	,000
	N	220	220	220	220	220	220
Feritin1	Pearson Correlation	,433(**)	,314(**)	,396(**)	,100	,201(**)	,251(**)
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,139	,003	,000
	N	220	220	220	220	220	220
JSK1	Pearson Correlation	,266(**)	,215(**)	,282(**)	,115	,091	,120
	Sig. (2-tailed)	,000	,001	,000	,088	,180	,076
	N	220	220	220	220	220	220
Scorect	Pearson Correlation	,398(**)	,365(**)	,397(**)	,222(**)	,249(**)	,263(**)
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,001	,000	,000
	N	220	220	220	220	220	220

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Табл.1

Корелационни зависимости между показатели на обмяна на желязо, индекси на чернодробна функция и метаболитни показатели



Фигура № 1

Стойности на показателите на обмяната на желязото при пациентите с хроничен хепатит С с или без хистологична активност – липсва пряка връзка с активността