

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

3. lékařská fakulta

DISERTAČNÍ PRÁCE

Praha 2010

MUDr. Karolína KRÁTKÁ

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

3. lékařská fakulta

**PORUCHY METABOLISMU ŽELEZA
U KOŽNÍCH A CHRONICKÝCH JATERNÍCH
ONEMOCNĚNÍ**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Praha 2010

Autor: MUDr. Karolína Krátká

Školitel: Prof. MUDr. Jiří Horák, CSc.

Pracoviště: I. interní klinika 3. LF UK a FNKV, Praha 10

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala všem, kteří se podíleli na realizaci mé disertační práce.

Tímto děkuji především:

Prof. MUDr. Jiřímu Horákovi, CSc. za pomoc a odborné vedení v průběhu celého mého doktorského studia a při vypracování mé disertační práce;

MUDr. Markétě Dostálíkové – Čimburové, PhD. za odbornou pomoc a konzultace při řešení tohoto projektu, spolupráci v oboru molekulární biologie;

Prof. RNDr. Janu Kovářovi, DrSc. a pracovníkům Oddělení buněčné a molekulární biologie 3.LF UK za všestrannou pomoc a podporu;

Doc. MUDr. Jaroslavu Stránskému, CSc. za odbornou pomoc a konzultace při řešení jednotlivých projektů;

MUDr. Heleně Michalíkové z dermatovenerologické kliniky FNKV a 3. LF UK za spolupráci na studii pozdní kožní porfyrie;

MUDr. Janu Hnaníčkoví z II. interní kliniky FNKV a 3. LF UK a MUDr. Svatopluku Svobodovi z kliniky plastické chirurgie FNKV a 3. LF UK za spolupráci na studii Dupuytrenovy nemoci;

MUDr. Bohuslavu Sosnovi z ústavu patologie 3. LF UK a FNKV za histologické vyšetření vzorků Dupuytrenovy kontraktury.

Tato disertační práce vznikla s podporou výzkumného záměru 3. LF UK č. MSM 0021620814 a grantu GAUK 88/2004/C.

OBSAH

1	Úvod	7
2	Současný stav problematiky	9
2.1	Regulace homeostázy železa v organismu	9
2.1.1	Absorpce železa ve střevě	9
2.1.2	Regulace množství železa na buněčné úrovni.....	10
2.1.3	Regulace množství železa na systémové úrovni	11
2.2	Stavy nadměrné akumulace železa v organismu.....	13
2.2.1	Geneticky podmíněné poruchy metabolismu železa.....	13
2.2.1.1	Klasická hemochromatóza	13
2.2.1.2	Non - HFE hemochromatóza	17
2.2.2	Sekundární akumulace železa	18
2.3	Orgánové důsledky akumulace železa	19
3	Úloha mutací v genu pro hemochromatózu u pozdní kožní porfyrie.....	21
3.1	Pozdní kožní porfyrie.....	21
3.1.1	Etiologie a klinický obraz	21
3.1.2	Léčba	23
3.2	Patogeneze akumulace železa u nemocných s PCT	24
3.3	Cíle studie	25
3.4	Soubor nemocných a metodika	26
3.4.1	Soubor nemocných.....	26
3.4.2	Metodika	27

3.4.2.1	Analýza mutací HFE genu pomocí PCR-RFLP	27
3.4.2.1.1	Izolace DNA.....	28
3.4.2.1.2	Polymerázová řetězová reakce	28
3.4.2.1.3	RFLP	30
3.4.2.2	Analýza mutace TfR2 genu pomocí PCR-RFLP	32
3.4.2.2.1	Izolace DNA.....	32
3.4.2.2.2	Polymerázová řetězová reakce	33
3.4.2.2.3	RFLP	34
3.4.2.3	Laboratorní diagnostika	34
3.4.2.4	Metody výpočtů a statistické vyhodnocení	35
3.5	Výsledky	37
3.5.1	Analýza mutací HFE genu a mutace TfR2 genu.....	37
3.5.2	Parametry metabolismu železa u nemocných s PCT	39
3.5.3	Výskyt infekce virem hepatitidy C u PCT	40
3.6	Diskuse.....	41
4	Úloha železa v patogenezi Dupuytrenovy nemoci	44
4.1	Dupuytrenova nemoc	44
4.1.1	Definice, epidemiologie a genetika.....	44
4.1.2	Etiologie a patogeneze.	45
4.1.3	Diagnóza a klinický obraz.....	46
4.1.4	Léčba.....	47
4.2.	Cíl studie	48
4.3	Soubor nemocných a metodika	48
4.4	Výsledky	50

4.4.1	Mutace HFE genu a parametry metabolismu železa.....	50
4.4.2	Rizikové faktory rozvoje Dupuytrenovy nemoci.....	52
4.5	Diskuse	53
5	Mutace pro genetickou hemochromatózu a metabolismus železa u nemocných s chronickým jaterním onemocněním	55
5.1	Alkoholové jaterní poškození.....	55
5.2	Chronická hepatitida C.....	57
5.3	Cíle studie	59
5.4	Soubor nemocných a metodika	60
5.4.1	Soubor nemocných.....	60
5.4.2	Metodika	61
5.4.2.1	Laboratorní diagnostika.....	61
5.4.2.2	Analýza mutací HFE genu a mutace TfR2 genu.....	62
5.4.2.3	Statistické metody	62
5.5	Výsledky	63
5.5.1	Analýza mutací HFE genu a mutace TfR2 genu.....	63
5.5.2	Parametry metabolismu železa u CLD.....	66
5.5.3	Vliv jednotlivých genotypů na laboratorní markery metabolismu železa u CLD.....	68
5.5.4	Prevalence mutací HFE genu u CLD v závislosti na hladinách markerů metabolismu železa.....	70
5.6	Diskuse.....	73
6	Závěr	77
7	Literatura	79
8	Seznam použitých zkratk.....	95

9	Přílohy	97
9.1	Příloha č.1	97
9.2	Příloha č.2	100
9.2.1	Osobní přínos disertanta	100
9.2.2	Publikace	101

1 ÚVOD

Železo se řadí mezi důležité biogenní stopové prvky a jeho úloha v savčím organismu je nezastupitelná. V přírodě neexistuje další prvek s analogickými vlastnostmi. Železo je součástí celé řady sloučenin, které zajišťují klíčové fyziologické funkce, jako je buněčné dýchání a přenos kyslíku k tkáním. Má rovněž význam pro buněčnou proliferaci a diferenciaci, pro regulaci genové exprese a uplatňuje se také ve funkcích imunitního systému.

Fyziologické funkce železa v organismu vyplývají ze schopnosti železa účastnit se oxidoredukčních reakcí, přičemž tato vlastnost je odvozena z chemických vlastností železa. Železo se vyskytuje ve dvou stabilních oxidačních stavech, a to jak v redukované, dvojmocné formě Fe^{2+} , tak v oxidované, trojmocné formě Fe^{3+} . Atom železa se tak může účastnit oxidoredukčních (redoxních) reakcí, spojených s přenosem elektronu. Tato vlastnost je na jedné straně pro organismus velmi výhodná, ale na druhé straně také potenciálně velmi nebezpečná. Dvojmocné železo v tkáních katalyzuje vznik vysoce reaktivních hydroxylových radikálů (OH^\cdot) z peroxidu vodíku H_2O_2 (Fentonova reakce). Volné hydroxylové radikály a další reaktivní kyslíkaté sloučeniny (ROS - reactive oxygen species), vzniklé touto cestou dále katalyzují peroxidaci lipidů a poškozují tak buněčné membrány, proteiny i DNA. Nadbytečné železo je tak pro buňku toxické a může vést k jejímu závažnému poškození. Proto udržování rovnováhy iontů železa je důležité pro správné fungování organismu.

Vzhledem k tomu, že následky akumulace železa při genetické hemochromatóze byly již detailně prozkoumány, narůstá v posledních letech pozornost a zájem o důsledky akumulace železa také u jiných onemocnění. Protože výsledky dosavadních studií jsou nejednoznačné a často vzájemně se odporující, bylo cílem této práce analyzovat a objasnit

vztah mutací HFE genu a metabolismu železa k patogenezi a progresi některých kožních a chronických jaterních onemocnění mimo genetickou hemochromatózu.

2 SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

2.1 REGULACE HOMEOSTÁZY ŽELEZA

V ORGANISMU

2.1.1 Absorpce železa ve střevě

Protože tělo nemá k dispozici žádný účinný mechanismus, jak se zbavit nadbytečného železa, je základním homeostatickým mechanismem v metabolismu železa regulace jeho vstřebávání. Absorpce železa probíhá v kartáčovém lemu enterocytů v duodenální sliznici po předchozí redukci trojmocné formy na formu dvojmocnou. Redukce železa je zprostředkována duodenální cytochrom-b reduktázou (Dcytb). V dalším kroku může být železo přeneseno do nitra enterocytu transportérem divalentních kovů (DMT1). Exprese obou těchto proteinů je závislá na koncentraci železa v enterocytech. Zatím neobjasněným mechanismem je železo transportováno k bazolaterální membráně enterocytu. V exportu železa přes bazolaterální membránu enterocytu se uplatňuje transmembránový protein feroportin, který se nachází také v tkáňových makrofázích, zejména pak v Kupfferových buňkách v játrech, v makrofázích kostní dřeně a ve slezině. A právě koordinovaná exprese feroportinu v enterocytech a makrofázích má základní význam pro homeostázu železa. V dalším kroku je železo intracelulárně lokalizovaným hefestinem s feroxidázovou aktivitou oxidováno zpět do trojmocné formy. Jen za těchto podmínek může být železo navázáno na transferin a posléze distribuováno k jednotlivým orgánům a tkáním. Přesný mechanismus, kterým železo přechází na transferin nebyl dosud objasněn.

Kromě výše popsaného vstřebávání nehemového železa dochází v duodenu také k absorpci železa hemového. Transport hemového železa přes apikální membránu enterocyту je zprostředkován enterocytárním hemovým importérem HCP1 (heme carrier protein 1). Hem navázaný na HCP1 se prostřednictvím receptorem zprostředkované endocytózy dostává do enterocyту, kde je ve formě endosomálních váčků transportováno k membráně hladkého endoplazmatického retikula. Zde je železo působením hemové oxygenázy 1 (HO1) uvolněno z protoporfyrinu a hem je následně degradován na CO, Fe²⁺ a biliverdin. Osud takto uvolněného železa je již shodný s železem původu nehemového.

Množství železa v organismu je regulováno v rámci každé jednotlivé buňky organismu a dále na úrovni celého organismu. V komunikaci mezi mechanismy regulace hladiny železa v buňce a mechanismy regulace v cirkulaci pravděpodobně hraje úlohu transferinový receptor 1 (TfR1).

2.1.2 Regulace množství železa na buněčné úrovni

Na buněčné úrovni je v regulaci metabolismu železa posttranskripčně zapojen systém tzv. iron responsive proteins (IRPs) – iron responsive elements (IREs). IREs jsou vlásenkovité struktury na obou koncích nepřeložených úseků (UTR – untranslated region) mRNA, které kódují vlastní, železem regulovaný protein. Za předpokladu, že je v organismu železa nedostatek, váží se IRPs na IREs. Jejich vazba pak ovlivňuje aktivitu vlastního kódujícího úseku mRNA, čímž se ovlivní tvorba proteinů uplatňujících se v metabolismu železa, a to hlavně na úrovni translace – zvýšením stability mRNA (vazba na 3' konec) nebo změnou transkripce (vazbou na 5' konec) [Cairo 2007]. Při nedostatku železa v buňce dojde ke zvýšení exprese proteinů zajišťujících transport železa do buňky a naopak ke snížení exprese

proteinů, které se účastní utilizace, ukládání a exportu železa z buňky. Naopak při nadbytku železa k vazbě IRPs na IREs nedochází a konečný efekt je zcela opačný.

2.1.3 Regulace množství železa na systémové úrovni

V systémové regulaci homeostázy železa patří klíčová úloha peptidu hepcidinu. Hepcidin byl původně izolován z moči a plazmy jako látka s antimikrobiálními vlastnostmi [Park 2001]. Je syntetizován především v játrech, ale v menší míře také v tukové tkáni. Cílovou strukturou hepcidinu je transportér feroportin, který je po navázání internalizován a degradován v buňce, čímž se snižuje export železa z buňky. Tímto způsobem hepcidin reguluje vstřebávání železa enterocyty a uvolňování železa z hepatocytů a makrofágů. Regulace syntézy hepcidinu probíhá na úrovni transkripce tím, že je ovlivněn promotor genu a tím i tvorba vlastní mRNA [Sedláčková 2009].

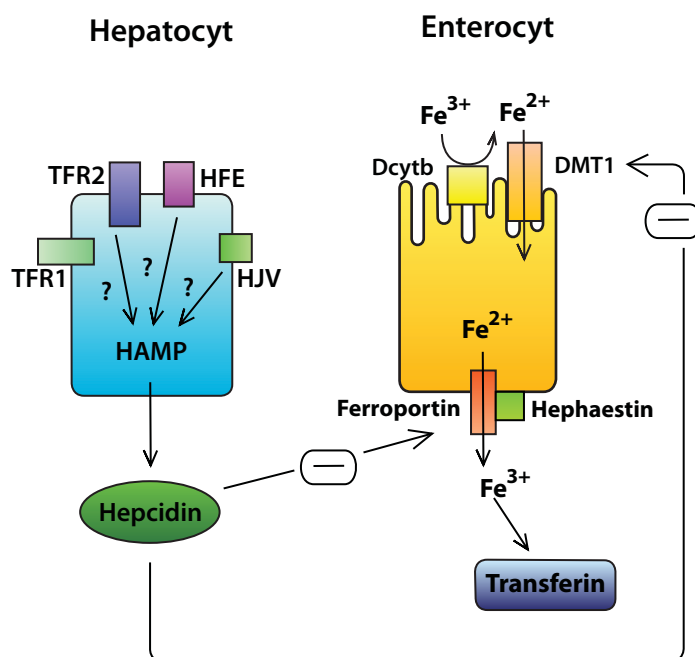
Sekreci hepcidinu indukují zvýšená zásoba železa a především zánětlivý stav [Nicolas 2002, Nemeth 2003]. Infekce a některé patogenní molekuly, např. lipopolysacharid, zřejmě působí na makrofágy i na jaterní Kupfferovy buňky, které pak produkují IL-6. Tento cytokin v hepatocytech indukuje produkci mRNA pro hepcidin [Nicolas 2002] a tak způsobuje sideropenii v důsledku zánětu [Nemeth 2004]. Zánětlivý stav je tedy charakteristický porušenou mobilizací železa při normálních zásobách železa v organismu. Snížení dostupnosti železa pro invadující mikroorganismy lze považovat za jistou ochranu proti bakteriálním infekcím [Ganz 2006].

Syntéza hepcidinu je naopak potlačena při anémii a hypoxémii, tedy stavech, kdy stoupá potřeba železa v tkáních [Nicolas 2002, Nemeth 2003]. Snížení hladin hepcidinu vede k vyššímu vstřebávání železa z potravy a také více železa se uvolňuje z makrofágů

s následným využitím pro krvetvorbu. Paradoxně snížená jaterní exprese i sérová koncentrace hepcidinu byla nalezena u nemocných s homozygotní formou HFE vyvolané hemochromatózy. Je tedy pravděpodobné, že HFE protein reguluje expresi hepcidinu. Kromě HFE proteinu je však syntéza hepcidinu v játrech ovlivněna i transferinovým receptorem 2 (TfR2) a hemojuvelinem. Mutace genu pro tyto proteiny mají za následek akumulaci železa s fenotypem hemochromatózy [Sebastiani 2007, Vokurka 2003].

Mechanismus působení HFE proteinu a zapojení do dráhy hepcidinu je znázorněn na obrázku 1.

Obr. 1: Mechanismus působení HFE proteinu a zapojení do dráhy hepcidinu



2.2 STAVY NADMĚRNÉ AKUMULACE ŽELEZA V ORGANISMU

Stavy s nadměrnou akumulací železa v organismu lze rozdělit na primární a sekundární. Primární akumulací železa v organismu jsou míněny geneticky podmíněné stavy, reprezentované zejména genetickou (hereditární) hemochromatózou (GH). Se sekundární akumulací se setkáváme při současně přítomném jiném, definovaném onemocnění.

2.2.1 Geneticky podmíněné poruchy metabolismu železa

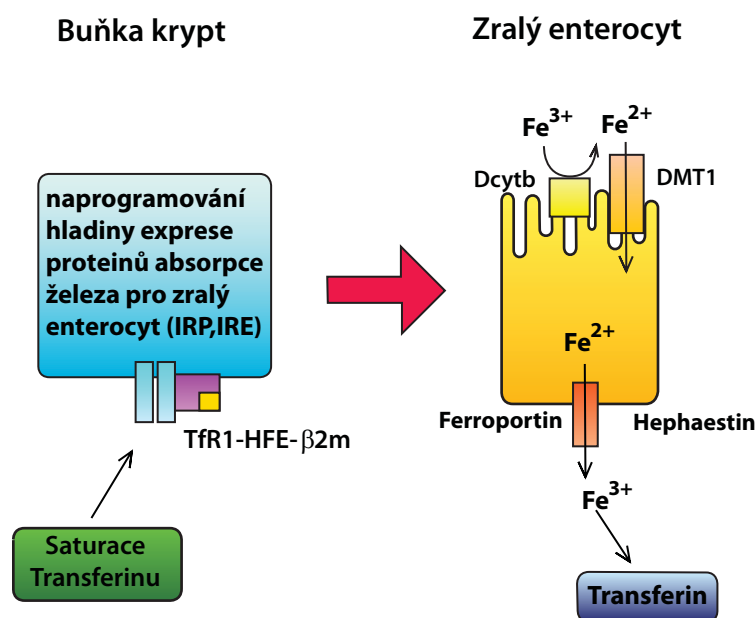
Mezi dědičné poruchy metabolismu železa patří kromě klasické hemochromatózy také tři typy tzv. non-HFE hemochromatózy. Společným znakem všech typů je nadměrné vstřebávání železa s jeho hromaděním a následným poškozením parenchymatózních orgánů. Ostatní genetické poruchy metabolismu železa, jako např. kongenitální atransferinémie a hereditární aceruloplazminémie jsou vzácné.

2.2.1.1 Klasická hemochromatóza

Klasická hemochromatóza neboli hemochromatóza typu 1 je autosomálně recesivní onemocnění, podmíněné mutací v HFE genu. Jde o nejčastější příčinu genetické hemochromatózy. HFE gen je lokalizován na krátkém raménku 6. chromozómu a jeho produktem je HFE protein [Feder 1996]. HFE protein není transportní molekula ani transkripční faktor, nýbrž produkt HLA genu I. třídy, tedy genu z rodiny hlavního histokompatibilního komplexu. Zdá se, že HFE protein v komplexu s β_2 -mikroglobulinem

a transferinovým receptorem (TfR1) informuje dosud neobjasněným mechanismem buňky o množství cirkulujícího železa vázaného na transferin. Pravděpodobně pak ovlivňuje aktivitu IRPs a tím expresi proteinů uplatňujících se při absorpci železa. V případě mutace HFE genu a tedy absence funkčního HFE proteinu je porušena signalizace o hladině cirkulujícího železa vázaného na transferin [Waheed 1997]. Buňka vnímá, že je železa nedostatek a dochází ke zvýšené expresi proteinů podporujících vstřebávání železa [Byrnes 2002, Philpott 2002, Rolfs 2002]. Mechanismus lokálního působení HFE proteinu na úrovni duodena a přehled jednotlivých transportérů železa v duodenální sliznici je znázorněn na obrázku 2.

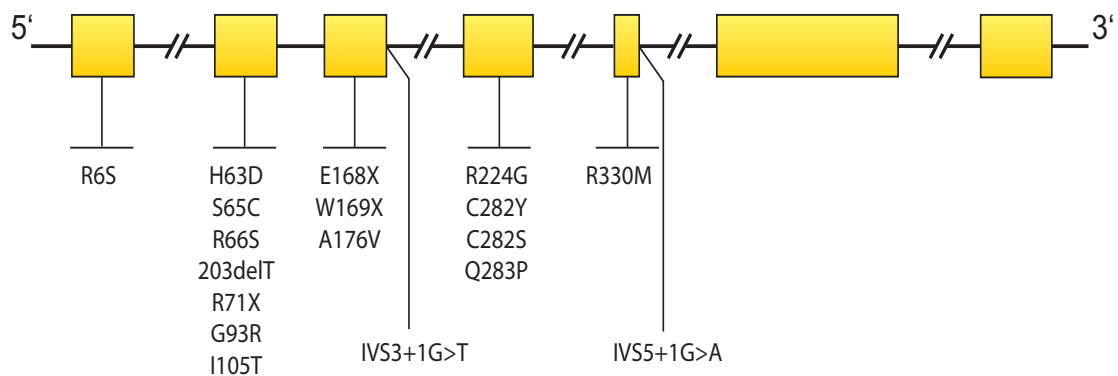
Obr.2: Mechanismus lokálního působení HFE proteinu na úrovni duodena (vlevo), transportéry pro železo v duodenální sliznici (vpravo)



V patogenezi HFE vázané hemochromatózy se významně uplatňuje klíčový regulátor metabolismu železa, hepcidin. Výsledkem nefunkčního HFE proteinu je právě snížená exprese hepcidinu s následným zvýšeným vstřebáváním železa a akumulací železa [Vokurka 2003]. Kromě HFE proteinu snižují expresi hepcidinu i ostatní proteiny, např. transferinový receptor 2 (TfR2) nebo hemojuvelin, které zodpovídají za fenotyp ostatních typů hemochromatózy.

U pacientů s hereditární hemochromatózou byly dosud identifikovány tři nejdůležitější mutace HFE genu – majoritní mutace C282Y, minoritní mutace H63D a mutace S65C. Další mutace (např. I105T, G93R, Q283P) jsou velmi vzácné [Barton 1999, Le Gac 2003]. Přehled identifikovaných mutací HFE genu je znázorněn na obrázku 3.

Obr.3: Přehled identifikovaných mutací HFE genu



Mutace C282Y a H63D lze nalézt u kavkazské populace Evropy, ale distribuce obou mutací se liší. Majoritní mutace C282Y je nejčastější u obyvatel Severní Evropy a vykazuje prevalenci klesající od severu k jihu a od západu k východu. Průměrná hodnota frekvence alely C282Y pro Evropu se pohybuje mezi 5,1 - 6,6% [Lucotte 2001, Merryweather-Clarke 2000]. V české populaci se pohybuje kolem 3,43% [Cimburova 2005], což odpovídá rozložení této alely ve středoevropských zemích. Mutace C282Y vzniká důsledkem záměny nukleotidu, vedoucí k substituci cysteinu (C) tyrosinem v poloze 282 proteinu.

Minoritní mutace H63D se liší od majoritní mutace C282Y širší distribucí a je přítomna i v populacích, kde hemochromatóza nebyla dokumentována [Merryweather-Clarke 1997, Merryweather-Clarke 2000]. Ve většině evropských populacích se frekvence alely H63D pohybuje v rozmezí mezi 10 až 20%, s průměrnou hodnotou 14,9% [Merryweather-Clarke 2000]. V České republice se frekvence alely pohybuje kolem 15%. Tato mutace je podmíněna záměnou histidinu (H) za kyselinu asparagovou (D) v pozici 65 HFE proteinu. Je zodpovědná za mírnější formu onemocnění ve srovnání s mutací C282Y.

Poslední objevenou mutací je mutace S65C, jejíž frekvence je velmi nízká. V kavkazské populaci jsou frekvence mutace mezi 0,5 až 3%, v české populaci je frekvence 1,25%. Mutace je způsobena náhradou serinu (S) cysteinem (C) v pozici 65 HFE proteinu. Přispívá ke vzniku spíše mírné formy hemochromatózy, zejména v kombinaci s mutací C282Y [Mura 1999].

Někteří pacienti mohou být nositeli více než jednoho typu mutace. Pak se jedná o složené heterozygoty. Příkladem je genotyp C282Y/H63D nebo C282Y/S65C.

Klasická GH se častěji vyskytuje u mužů (poměr žen k mužům 1:3) a manifestuje se nejčastěji kolem 40.-50. roku věku. U žen se většinou projeví později, neboť jsou před zvýšenými zásobami železa chráněny ztrátami krve při menstruacích, případně při porodu [Powell 2000].

2.2.1.2 Non-HFE hemochromatózy

Do identifikace dalších genů, zodpovědných za onemocnění, bylo používáno označení non-HFE hemochromatóza. Po identifikaci příslušných genů byla hemochromatóza dále klasifikována. S objevením klíčového regulátoru metabolismu železa hepcidinu se však od striktních dělení jednotlivých forem hemochromatózy ustupuje, neboť společným jmenovatelem všech typů je abnormální hladina hepcidinu.

Hemochromatózu typ 2 (juvenilní) tvoří dvě formy onemocnění. Obě formy jsou autosomálně recesivně dědičné a vyznačují se klinickou manifestací před třicátým rokem věku. Postihuje rovnoměrně obě pohlaví, nejčastějšími příznaky jsou však hypogonadotropní hypogonadismus a postižení myokardu ve formě kardiomyopatie. Forma 2A je podmíněna mutací v genu pro hemojuvelin, lokalizovaném na chromozomu 1q21. Druhá, klinicky těžší forma, označovaná 2B, je způsobena mutací v genu pro hepcidin, který je lokalizován na lokusu 19q13 [De Gobbi 2002, Roetto 1999].

Hemochromatóza 3. typu je způsobena mutací v genu kódujícím transferinový receptor 2 (TfR2), který je lokalizován na chromozomu 7q22. Je rovněž autosomálně recesivně dědičná. Klinický obraz je těžší než u klasické HFE hemochromatózy, ale mírnější než u juvenilní formy. V porovnání s HFE hemochromatózou však dochází k časnějšímu nástupu klinických příznaků [Camaschella 2000, Roetto 2002].

Hemochromatóza 4. typu, neboli feroportinová choroba, patří mezi nejčastější formy non-HFE hemochromatózy. Na rozdíl od předchozích forem je autosomálně dominantně dědičná. Je způsobena mutací genu pro hlavní exportér železa z buňky, feroportin. Gen pro feroportin je lokalizován na chromozomu 2q32. Dochází k přednostní akumulaci železa v retikuloendotelových buňkách, ve srovnání s buňkami jaterního parenchymu u HFE hemochromatózy. Z těchto důvodů prokazujeme nejdříve zvýšenou hladinu feritinu, saturace

transferinu je zvýšená později. Nemocní hůře tolerují terapii venepunkcemi, neboť reagují anémií i přesto, že přetrvávají zvýšené hladiny feritinu [Pietrangelo 2004].

2.2.2 Sekundární akumulace železa

Se sekundární akumulací železa v organismu se setkáváme u celé řady jiných, zejména jaterních onemocnění. Železo se z různých příčin podílí na poškození jater, a to i při normální koncentraci železa v jaterní tkáni. Problémem však je skutečnost, že velmi často nelze spolehlivě určit, zda přetížení železem je příčinou či důsledkem jaterní léze, nebo zda se jedná o prostou koincidenci. Významným aspektem akumulace železa je jeho potenciální kancerogenní účinek. Kromě podpory vzniku nádorů se uplatňuje také jako podpůrný faktor a nutrient nádorového bujení.

Z chronických jaterních onemocnění nutné zmínit častou akumulaci železa u alkoholového jaterního poškození, chronických virových hepatitid, nealkoholové steatohepatitidy a pozdní kožní porfyrie.

Z dalších příčin akumulace železa nelze opomenout skupinu hemolytických a dyserytropoetických anémií. Tito nemocní trpí přetížením železem z důvodu opakovaného parenterálního podávání železa a opakovaných transfúzí. Hemolýza a neefektivní erythropoéza je také důvodem poruchy metabolismu železa u pravidelně hemodialyzovaných nemocných.

Mezi vzácné příčiny sekundární akumulace železa v organismu patří některá vrozená metabolická onemocnění, např. kongenitální atransferinémie či deficit pyruvátkinázy.

2.3 ORGÁNOVÉ DŮSLEDKY AKUMULACE ŽELEZA

Jednotlivé orgány a tkáně nejsou nahromaděným železem poškozeny rovnoměrně. Klinické projevy orgánového postižení z přetížení železem se objevují při dosažení množství cca 20 gramů. Mezi nejvíce postižené orgány patří játra, srdce, pankreas, endokrinní orgány a klouby.

Nejčastěji a nejvíce postiženým orgánem jsou játra. Zatímco u primární akumulace železa na podkladě GH je železo přednostně akumulováno v hepatocytech, u sekundární akumulace se železo typicky nachází v Kupfferových buňkách. Železo se v hepatocytech ukládá buď jako feritin, a to v cytoplasmě a v lyzosomech, nebo jako hemosiderin v lyzosomech. Vlivem hepatotoxického účinku železa progreduje postupně jaterní poškození, přes jaterní fibrózu k obrazu jaterní cirhózy. Nejzávažnějším postižením je rozvoj primárního hepatocelulárního karcinomu (HCC) v terénu jaterní cirhózy. U nemocných s GH a vysokým obsahem železa se však HCC může vyvíjet i bez přítomnosti cirhózy [Horák, 2010].

Mezi časté příčiny úmrtí u nemocných s přetížením železem patří městnavé srdeční selhání na podkladě restriktivní či dilatační kardiomyopatie, komplikované arytmiemi.

Ukládání železa v buňkách Langerhansových ostrůvků pankreatu a jejich následné poškození vede k potlačení sekrece inzulínu a rozvoji inzulín - dependentního diabetu. Kromě snížení vlastní produkce inzulínu se v patogenezi diabetu uplatňuje jaterní a později také periferní inzulínová rezistence. Inzulínové rezistenci se přisuzuje větší úloha v rozvoji diabetu než samotnému poškození pankreatu. Terapie flebotomiemi má u nemocných s i bez HFE mutací velký vliv na potlačení inzulínové rezistence a na zlepšení kompenzace diabetu [Equitani 2008, Fernández-Real 2002].

Kromě pankreatu mohou být ukládáním železa postiženy i další endokrinní orgány. Velmi často se setkáváme s postižením adenohipofýzy ve formě hypogonadotropního hypogonadismu [Hempenius 1999]. Popsána jsou i postižení štítné žlázy v podobě sekundární hypothyreózy [Hudec 2008].

Izolovanou klinickou manifestací přetížení železem mohou být artropatie, které se klinicky projevují nejčastěji jako artróza. V chrupavce můžeme prokázat depozita pyrofosfátu vápenatého, v synovii hemosiderózu. Predilekčně postiženými klouby jsou metakarpofalangeální klouby, zejména II. a III. prstu, dalšími postiženými klouby mohou být klouby kyčelní, kolenní a zápěstní. Provádění terapeutických venepunkcí kloubní postižení neovlivňuje ani nezabraňuje další progresi onemocnění [Axford 1991].

Typickým kožním projevem jsou hyperpigmentace, způsobené zvýšenou koncentrací melaninu. Intenzita kožních změn koreluje s celotělovými zásobami železa v organismu a při léčbě venepunkcemi mohou zcela vymizet.

3 ÚLOHA MUTACÍ V GENU PRO GENETICKOU HEMOCHROMATÓZU U POZDNÍ KOŽNÍ PORFYRIE

3.1 POZDNÍ KOŽNÍ PORFYRIE

3.1.1 Etiologie a klinický obraz

Pozdní kožní porfyrie (porphyria cutanea tarda – PCT) patří mezi chronické jaterní porfyrie a je nejčastější porfyrií v České republice. Onemocnění je častější u mužů s prevalencí přibližně 1:1000 obyvatel. Klinicky se manifestuje charakteristickými kožními příznaky (kožní fotosenzitivita, která se projevuje snadnou zranitelností kůže s tvorbou puchýřů a erozí na slunci exponovaných oblastech těla, hojení probíhá za tvorby jizev s posuny pigmentace ve smyslu hypopigmentace či hyperpigmentace, dalšími kožními projevy jsou hypertrichóza, změny pigmentace nejčastěji ve smyslu hyperpigmentace připomínající melazma, může se vyskytnout jizvící alopecie), dále jaterním poškozením různého stupně (zpravidla různý stupeň jaterní hemosiderózy). Laboratorně se onemocnění manifestuje zejména zvýšeným vylučováním výšekarboxylových porfyrinů močí a exkrecí izokoproporfyrinů stolicí.

Tyto změny jsou podmíněny nadměrnou tvorbou a akumulací porfyrinů při parciálním defektu enzymu uroporfyrinogendekarboxylázy (URO-D). Onemocnění se vyskytuje jednak

v častější získané (sporadické) formě s poruchou URO-D jen v játrech (80% případů), jednak ve vzácnější, autozomálně dominantně přenášené, familiární (hereditární) formě s dysfunkcí URO-D ve všech buněčných systémech (20% případů). U nemocných se získanou formou onemocnění se kromě možné dědičné vlohy na manifestaci onemocnění významně podílí vliv dlouhodobé konzumace alkoholu, léčba estrogeny, infekce virem hepatitidy C, přítomnost mutací genů pro hereditární hemochromatózu nebo méně častá expozice různým druhům polyhalogenovaných uhlovodíků. Při vzniku získané formy PCT ionty železa přímo uroporfyrinogendekarboxylázu neinaktivují, ale jednak v součinnosti s cytochromy P450 stimulují oxidaci nadměrně vytvářených a akumulovaných fotobiologicky indiferentních porfyrinogenů na porfyriny, jednak pravděpodobně podněcují tvorbu neporfyrinového inhibitoru URO-D a konečně indukují enzym hemoxygenázu. Oxidace porfyrinogenů na porfyriny vede ke vzniku oxidačního buněčného stresu v játrech a kůži, a tím k patologickým změnám v nich. Neporfyrinový inhibitor tlumí aktivitu URO-D, čímž dochází ke zvýšení akumulace výšekarboxylových porfyrinů, a konečně indukce hemoxygenázy má za následek depleci poolu regulačního hemu s následující expresí enzymu δ -aminolevulátsyntázy (δ -ALA), jehož důsledkem je zvýšená novotvorba uroporfyrinogenu.

Stupeň jaterního poškození je negativním faktorem ovlivňujícím progresi onemocnění a prognózu nemocného. Kumulace porfyrinů v játrech není jediným etiologickým faktorem, ale je i výsledkem působení zevních faktorů, jako jsou alkohol, drogy, toxiny a infekce virem hepatitidy C, méně často hepatitidy B, které zároveň způsobují manifestaci onemocnění. Histologicky nacházíme nejčastěji mírnou periportální siderózu, mírnou fokální steatózu, ložiskovou nekrózu a periportální fibrózu s určitým stupněm zánětu. Ultrafialovým světlem lze dokázat červenou fluorescenci uroporfyrinu. Klinicky je jaterní poškození manifestní asi u 50% nemocných, v nemalé míře již při stanovení diagnózy ve fázi jaterní cirhózy

s komplikacemi (do 15% nemocných). V terénu jaterní cirhózy je u nemocných s PCT poměrně častý výskyt hepatocelulárního karcinomu.

3.1.2 Léčba

V terapii PCT se běžně uplatňují dva způsoby – opakované venepunkce a terapie malými dávkami antimalarik. Provádění opakovaných venepunkcí je závislé na klinickém stavu a na laboratorních nálezech parametrů metabolismu železa, zejména hladiny sérového železa a hladiny feritinu. Venepunkce se provádí zpravidla ve dvoutýdenních intervalech, jednorázově s odběrem až 500 ml krve, dokud hemoglobin nepoklesne na hladiny 100-110 g/l, nebo dokud nedojde k normalizaci hladin sérového železa či lépe feritinu. Trvání remise je velmi variabilní (11-72 měsíců), ale obvykle nejméně 3 roky. Remisi lze udržovat dalšími občasnými venepunkcemi.

Dlouhodobá terapie malými dávkami antimalarika chlorochinu nebo hydroxychlorochinu může příznivě ovlivnit metabolismus porfyrinů na několika úrovních. Tvoří s porfyriny komplex, zvyšuje propustnost membrány hepatocytů pro porfyriny, tím umožňuje jejich vyplavování do plazmy a následné vylučování močí. Antimalarika ovlivňují i vazbu uroporfyriu na jaterní intracelulární proteiny a jsou inhibitory syntézy porfyrinů. Doporučují se malé dávky – 2 krát 125-250 mg/týden. K remisi při léčbě těmito dávkami dochází průměrně za 8-15 měsíců.

3.2 PATOGENEZE AKUMULACE ŽELEZA U NEMOCNÝCH S PCT

Jedním z patogeneticky významných faktorů při vzniku a manifestaci PCT je nadměrná akumulace železa v játrech. V patogenezi akumulace železa v organismu u nemocných s PCT se uplatňuje několik faktorů. Z mnoha studií provedených u nás i ve světě jednoznačně vyplývá významná úloha mutací v genu pro hereditární hemochromatózu (tj. mutací HFE genu) a infekce virem hepatitidy C. Oba tyto faktory se uplatňují nezávisle na sobě a jejich prevalence se geograficky významně liší.

V prevalenci infekce virem hepatitidy C (HCV) byl pozorován vzestupný gradient od severní (8-10%) do jižní Evropy (71-91%) [Tannapfel 2001]. V celosvětovém měřítku byla v 50 provedených studií průměrná prevalence infekce virem hepatitidy C u nemocných s PCT 47% [Gisbert 2003]. Přetížení železem u nemocných infikovaných virem hepatitidy C je spojeno s těžším histologickým stupněm zánětu a zhoršenou odpovědí na antivirovou terapii. Zvýšený příjem železa HCV infikovanými hepatocyty vede k nadměrné intracelulární akumulaci železa, která následně zvyšuje oxidační stres a jaterní poškození. Současně dochází k poklesu koncentrace aktivity URO-D a zvýšené produkci inhibitoru URO-D hepatocyty.

Mutace genů pro hereditární hemochromatózu (HFE genu) představuje významný klíčový faktor v patogenezi zvýšené akumulace železa u nemocných s PCT. Vysoká prevalence majoritní mutace C282Y u nemocných s PCT byla prokázána v severní a střední Evropě [Tannapfel 2001] a také v severní Americe [Bonkovsky 1998]. Homozygoti C282Y vykazují, ve shodě s nemocnými s hereditární hemochromatózou, známky zvýšené akumulace železa v organismu a terapie venepunkcemi u nich představuje významný vliv v omezení

progrese jaterního a jiných orgánových poškození. Prevalence minoritní mutace H63D u nemocných s PCT je celosvětově velmi různá. Signifikantně zvýšená prevalence mutace H63D byla prokázána např. v Itálii [Sampietro 1998], v Německu [Tannapfel 2001] a ve Španělsku [de Salamanca 1999]. Přetížení železem u nemocných s mutací H63D není vyjádřeno v tak velké míře jako u nosičů mutace C282Y. Současná konzumace alkoholu však může přispívat ke zvýšené akumulaci železa v organismu a v konečné fázi k manifestaci onemocnění.

Význam dalších minoritních mutací, např. S65C a TfR2 u nemocných s PCT nebyl např. v Německu prokázán [Frank 2006], v české populaci nebyl dosud analyzován.

3.3 CÍL STUDIE

Cílem naší studie bylo zjistit prevalenci a frekvenci mutací HFE genu (C282Y, H63D a S65C), mutace TfR2 (Y250X) a prevalenci infekce virem hepatitidy C u nemocných s pozdní kožní porfýrií a porovnat výskyt těchto nezávislých faktorů s kontrolní skupinou. Vycházeli jsme z pilotní studie [Malina 2000], kde byla analyzována jen prevalence majoritní mutace C282Y. Dalším cílem naší studie bylo porovnat parametry metabolismu železa u jednotlivých genotypů a analyzovat vztah přítomnosti mutace HFE genu s laboratorními známkami zvýšených zásob železa v organismu.

Naše hypotéza byla, že výskyt daných mutací je v kontextu s geografickým výskytem těchto mutací v Evropě a zejména pak v souladu s výskytem v sousedních zemích, přičemž mutace C282Y by mohla odpovídat severo-j jižnímu a západo-východnímu gradientu, mutace H63D bude více rozšířena. O výskytu mutace S65C u nemocných s PCT není dosud

provedeno dostatečné množství studií, nepředpokládali jsme však významný rozdíl ve srovnání s výsledky studií provedených u běžné populace. Ohledně výskytu chronické hepatitidy C jsme předpokládali analogicky výskyt sledující opačný, tedy vzestupný severo-jihní gradient.

3.4 SOUBOR NEMOCNÝCH A METODIKA

3.4.1 Soubor nemocných

Do studie bylo zařazeno 63 nemocných s PCT (57 nemocných se sporadickou a 6 nemocných s familiární formou PCT, 48 mužů a 15 žen, ve věkovém rozmezí 30 až 86 let, průměrný věk 62 let), kteří byli diagnostikováni a jsou dosud dispenzarizováni na dermatovenerologické klinice 3. LF UK a FNKV. Diagnóza PCT byla stanovena na základě přítomnosti typických klinických příznaků a potvrzena přítomností zvýšených uroporfyrinů a heptakarboxylových porfyrinů v moči a dále izokoproporfyrinů ve stolici.

Všichni nemocní byli léčeni antimalariky (chlorochinem) a současně 5 nemocných bylo léčeno venepunkcemi. U všech nemocných byly vyšetřeny parametry metabolismu železa (sérové železo, sérový feritin, saturace transferinu) a serologie hepatitidy C (anti-HCV protilátky).

Prevalence mutací HFE genu byla porovnána s kontrolní skupinou, tj. běžnou českou populací, reprezentovanou náhodně vybranými a anonymně analyzovanými 481 Guthrie kartami z národního novorozeneckého screeningového programu.

3.4.2 Metodika

3.4.2.1 Analýza mutací HFE genu pomocí PCR-RFLP

Při analýze je prvním krokem izolace genomové DNA, nejčastěji z leukocytů periferní krve. Následuje pak analýza, nejvíce používanou metodou pro detekci mutací HFE genu (mutace C282Y, H63D, S65C), je PCR-RFLP. Tato metoda se skládá ze dvou hlavních kroků. Pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) je nejdříve úsek DNA obsahující příslušnou mutaci namnožen (amplifikován). Podle sekvence studované DNA jsou syntetizovány primery dlouhé obvykle 20-30 pb, které jsou komplementární k DNA sekvenci obsahující příslušný studovaný úsek, obsahující sledovanou mutaci. Po tepelné denaturaci analyzované DNA se tyto syntetické oligonukleotidy váží na komplementární sekvence v DNA a slouží jako primery pro syntézu nové DNA, kterou katalyzuje termostabilní DNA polymeráza. Během prvního cyklu je množství DNA vymezené primery zdvojnásobeno. V průběhu dalšího cyklu je všechna DNA opět denaturována a během ochlazení dochází k navázání dalších primerů a dosyntetizování nové DNA, množství amplifikovaného úseku se opět zdvojnásobuje. Celý proces se mnohokrát opakuje (většinou 30-40krát), čímž dochází k exponenciálnímu množování úseku DNA vymezeného párem použitých primerů. Vzhledem k iniciaci jednotlivých kroků změnami teploty a použitím termostabilní DNA polymerázy je proces snadno automatizovatelný a odehrává se v uzavřené zkumavce v termocykleru, tj. v přístroji s naprogramovatelnými cyklickými změnami teploty.

V dalším kroku se s využitím restričních endonukláz detekuje konkrétní mutace (RFLP – polymorfismus délky restričních fragmentů, restriction fragment length polymorfism). Restriční endonukleázy rozeznávají a štěpí pro ně specifické sekvence. Podle typu mutace dochází ke vzniku nového (mutace C282Y) či zániku (mutace H63D,

S65C) restričního místa a tak rozdílnému počtu různě dlouhých naštěpených fragmentů. Tento rozdíl je pak možno detekovat pomocí elektroforézy na agarózovém gelu.

V následujících řádcích je podrobněji popsána tato metoda, jak byla použita při naší analýze.

3.4.2.1.1 Izolace DNA

DNA byla izolována z plné krve, jež byla odebírána v množství cca 0,5 ml do sterilních zkumavek s EDTA. Rutinně byla používána izolační souprava Qiagen – mini kit (Qiagen, SRN), dle doporučení výrobce. Protokol je uveden v příloze č.1.

Vyizolovanou DNA jsme ověřovali pomocí elektroforézy (ELFO) na 1% agarózovém gelu.

3.4.2.1.2 Polymerázová řetězová reakce

Krátký úsek genomové DNA obsahující místo mutace byl následně amplifikován metodou PCR. V reakci byly použity námi navržené oligonukleotidové primery (HHC1, HHC2) pro detekci mutace C282Y, primery (HHC3, HHC4) navržené Federem [Feder 1996] byly použity pro detekci mutace H63D a S65C. Při detekci mutace H63D i S65C byl v obou případech amplifikován stejný úsek DNA – obě mutace jsou blízko sebe a pro další analýzu bylo tedy možno použít stejný PCR produkt. Sekvence jednotlivých primerů jsou uvedeny v tabulce 1.

Tab. 1: Sekvence primerů

HHC1	5' - AACCTTGGCTGTACCCCCTG - 3'
HHC2	5' - GCCCACCCCCTAACAAAGAG - 3'
HHC3	5' - ACATGGTTAAGGCCTGTTGC - 3'
HHC4	5' - GCCACATCTGGCTTGAAATT - 3'

Pro vlastní PCR reakci bylo použito následující složení reakční směsi: 10x PCR pufr (složení dle výrobce polymerázy včetně 1,5 mM MgCl₂), 2,5 mM DTP, dvojice primerů v koncentraci 0,6 μM a Taq polymeráza TaKaRa – 1 U/reakci, 1 μl DNA na celkový objem reakční směsi 25 μl.

Pro mutaci C282Y byly použit tento profil PCR reakce:

1. 94°C, 3 min.
2. 42 cyklů (93°C, 30 s; 60°C, 30 s; 72°C, 1 min.).
3. 72°C, 4 min.
4. 15°C, 5 min.

Pro mutaci H63D a S65C byl použit následující profil PCR reakce:

1. 94°C, 3 min.
2. 42 cyklů (93°C, 30 s; 58°C 30 s; 72°C, 45 s).
3. 72°C, 5 min.
4. 15°C, 5 min.

za použití PTC – 200 Peltier Thermal Cycler, gradientový cycler s vyhříváním víkem (MJ Research, USA).

Výsledné amplifikační produkty byly analyzovány elektroforeticky v 2% agarózovém gelu (1% LE + 1% NuSieve) za přítomnosti etidium bromidu. Velikost a kvantita produktů byly stanoveny podle markerů molekulových hmotností (pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker, 23). V případě analýzy mutace C282Y byl detekován 203 pb velký produkt, v případě analýzy mutace H63D a S65C 208 pb velký produkt.

3.4.2.1.3 RFLP

PCR produkt byl následně štěpen restriční endonuklázou. Pro detekci mutace C282Y byla použita restriční endonukleáza RsaI, pro detekci H63D jsme použili restriční endonukleázu BclI, pro mutaci S65C pak HinfI. Reakce probíhala v 10 μ l, což představuje 2 μ l odpovídajícího restričního pufru, za použití 5U restriční endonukleázy, do 10 μ l doplněno vodou; po dobu 2 hodin při 37°C (RsaI a HinfI) resp. 4 hodiny při 55°C (BclI).

Mutací C282Y vzniká nové restriční místo pro restriční endonukleázu RsaI (jež štěpí místo GT/AC).

V případě H63D mutace zaniká restriční místo pro endonukleázu BclI (štěpící místo T/GATCA) a amplifikát délky 208 bp tedy není štěpen. Jestliže mutace není přítomna, enzym štěpí pouze v místě standardním.

V případě mutace S65C zaniká restriční místo pro restriční endonukleázu HinfI (která štěpí místo G/ANTC) a situace je obdobná jako u mutace H63D.

Při analýze produktů štěpení byla restriční směs nanášena na 4% agarózový gel a dělena elektroforeticky (agaróza FMC LE a NuSieve v poměru 1:3). Přítomnost fragmentů příslušných velikostí (velikosti fragmentů vyjádřených v párech bází) byla tedy interpretována jak uvedeno v tabulkách 2, 3, 4.

Tab. 2: Analýza produktů štěpení u mutace C282Y

Mutace C282Y (v bp)					
Nenaštěpená DNA	203				
Zdravý jedinec		191			12
Homozygotní stav			162	29	12
Heterozygotní stav		191	162	29	12

Tab. 3: Analýza produktů štěpení u mutace H63D

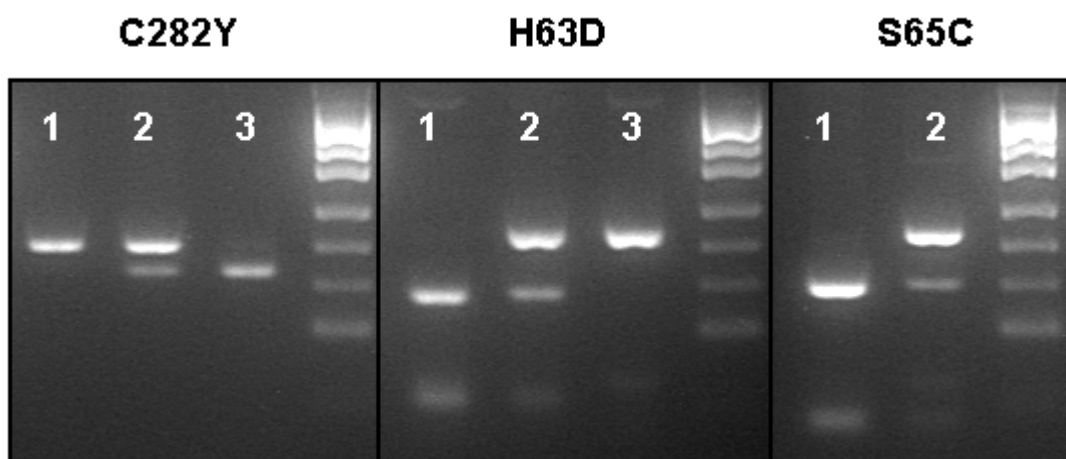
Mutace H63D (v bp)			
Nenaštěpená DNA	208		
Zdravý jedinec		138	70
Homozygotní stav	208		
Heterozygotní stav	208	138	70

Tab. 4: Analýza produktů štěpení u mutace S65C

Mutace S65C (v bp)			
Nenaštěpená DNA	208		
Zdravý jedinec		147	61
Homozygotní stav	208		
Heterozygotní stav	208	147	61

Fotografie gelu po elektroforéze s analýzou produktů štěpení jednotlivých mutací je znázorněna na obrázku 4.

Obr. 4: Analýza produktů štěpení mutací C282Y, H63D, S65C



Fotografie gelu po elektroforéze: U jednotlivých mutací je následující pořadí:
1 – jedinec bez mutace; 2 – heterozygot pro příslušnou mutaci;
3 – homozygot pro příslušnou mutaci; marker molekulových hmotností

3.4.2.2 Analýza mutace Tfr2 genu pomocí PCR-RFLP

3.4.2.2.1 Izolace DNA

DNA byla extrahována za pomoci izolační soupravy Qiagen – mini DNA kit, dle doporučení výrobce. Protokol je uveden v příloze č.1.

Vyizolovanou DNA jsme ověřovali pomocí elektroforézy (ELFO) na 1% agarózovém gelu.

3.4.2.2.2 Polymerázová řetězová reakce

Krátký úsek genomové DNA obsahující místo mutace byl následně amplifikován metodou PCR. V reakci byly použity oligonukleotidové primery TFR21 a TFR22 a Taq polymeráza (TaKaRa, Japonsko). Sekvence jednotlivých primerů jsou uvedeny v tabulce 5.

Tab. 5: Sekvence primerů

TFR21	5'- TGCACTGGGTCGATGAG - 3'
TFR22	5'- CTCAAGCCCTCCCTCT - 3'

Pro vlastní PCR reakci bylo použito následující složení reakční směsi: 10x PCR pufr (složení dle výrobce polymerázy), 2,5 mM dNTP TaKaRa, 1,5mM MgCl₂, dvojice primerů v koncentraci 0,5 μM ve výsledném reakčním objemu a Taq polymeráza Fermentas – 1 U/reakci, 1 μl DNA na celkový objem reakční směsi 25 μl.

Dále byl použit následující profil reakce:

1. 95°C, 3 min.
2. 45 cyklů (97°C, 30s; 56°C, 30s; 72°C, 30 s).
3. 72°C, 5 min.
4. 15°C, 5 min.

za použití PTC-200 Peltier Thermal Cyler, gradientový cyler s vyhříváním víkem (MJ Research, USA).

Výsledný amplifikační produkt byl analyzován elektroforeticky v 2% agarózovém gelu (1% LE + 1% NuSieve) za přítomnosti etidium bromidu. Velikost produktu byla stanovena podle markerů molekulových hmotností (pHC 642/HaeIII). V případě analýzy mutace Y250X byl detekován 355 bp velký produkt.

3.4.2.2.3 RFLP

PCR produkt byl následně štěpen restriční endonuklázou. Pro detekci mutace Y250X byla použita restriční endonukleáza MaeI. Reakce probíhala v 10 μ l, což představuje 2 μ l odpovídající restričního pufru, za použití 5U restriční endonuklázy, do 10 μ l doplněno vodou; po dobu 2 hodin při 37°C.

Při analýze produktů štěpení byla restriční směs nanášena na 4% agarózový gel a dělena elektroforeticky (agaróza FMC LE a NuSieve v poměru 1:3). Přítomnost fragmentů příslušných velikostí (velikosti fragmentů vyjádřeny v párech bází) byla interpretována následovně, jak uvedeno v tabulce 6.

Tab. 6: Analýza produktů štěpení u mutace Y250X

Mutace Y250X (v bp)					
Nenaštěpená DNA	355				
Zdravý jedinec		238		117	
Homozygotní stav			134	117	104
Heterozygotní stav		238	134	117	104

3.4.2.3 Laboratorní diagnostika

Hladiny sérového železa a vazebné kapacity pro železo byly stanoveny použitím metody VITROS (Analyzátor Vitros Fusion 5,1). Ke stanovení hladiny feritinu byla použita chemiluminiscenční imunoanalýza (Analyzátor Immulite 2000, DPC). Saturace transferinu byla vypočítána podílem sérové hladiny železa k vazebné kapacitě pro železo, tento podíl vynásoben 100, a tak vyjádřena v procentech.

Serologie hepatitidy C (anti-HCV protilátky) byla analyzována pomocí metody ELISA, s použitím imunoanalyzátoru (VITROS ECI, ORTHO Clinical Diagnostics).

U nemocných s pozitivitou anti-HCV protilátek bylo doplněno stanovení virémie (RNA-HCV) kvantitativně, metodou real-time PCR (přístroj COBAS® TaqMan® 48, Roche Diagnostics). Pro kvalitativní průkaz HCV-RNA byla využita end-point metoda Cobas® Amplicor HCV test v2.0 (přístroj Cobas® Amplicor, Roche Diagnostics).

3.4.2.4 Metody výpočtů a statistické vyhodnocení

Pro výpočet frekvence alely byla použita frekvence homozygotů a heterozygotů s následným použitím vzorce:

$$f_{(a)} = (Hh + 2HH)/2N$$

$f_{(a)}$ frekvence alely

Hh.....počet heterozygotů

HH.....počet homozygotů

N.....počet vzorků (2N....počet alel)

V případě, že jsme v našem souboru žádného homozygota nedetkovali byla frekvence dopočítána podle vzorce:

$$f_{(HH)} = f_{(a)}^2$$

$f_{(a)}$ frekvence alely

$f_{(HH)}$ frekvence homozygotů

K porovnání frekvence jednotlivých genotypů mezi nemocnými s PCT a kontrolní skupinou byl použit χ^2 – test (chí kvadrát test) a Fisherův exaktní test. Parametry metabolismu železa jsou vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná chyba průměru (SEM). Parametry metabolismu železa byly porovnány mezi jednotlivými genotypy, statistická významnost byla testována pomocí nepárového Studentova t-testu. Hladina významnosti α byla nastavena na hodnotu 0,05 (5%). K statistickým výpočtům byl použit program Statistica verze 9 firmy StatSoft Inc.

3.5 VÝSLEDKY

3.5.1 Analýza mutací HFE genu a mutace TfR2 genu

Frekvence jednotlivých mutací HFE genu jsou přehledně uvedeny v tabulce 7, frekvence jednotlivých genotypů pak v tabulce 8.

Tab. 7: Frekvence mutací HFE genu

	PCT (n=63)	kontroly (n=481)	p. hodnoty
C282Y	18,25%	3,43%	***0,00001
H63D	26,98%	14,97%	***0,0008
S65C	0,79%	1,24%	0,6594

Statistické hladiny významnosti: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Tab. 8: Kompletní přehled jednotlivých detekovaných genotypů

	PCT (n=63)	Kontroly (n=481)	p hodnoty
Heterozygot C282Y	15 (23,8%)	33 (6,9%)	*** 0,00001
Homozygot C282Y	4 (6,3%)	0 (0%)	*** 0,0001
Heterozygot H63D	26 (41,3%)	128 (26,6%)	** 0,00151
Homozygot H63D	4 (6,3%)	8 (1,7%)	* 0,0396
Heterozygot S65C	1 (1,6%)	12 (2,5%)	0,5439 (NS)
Složení heterozygoti C282Y/H63D	5 (7,9%)	9 (1,9%)	* 0,0158
Složení heterozygoti C282Y/S65C	1 (1,6%)	0 (0%)	0,1158 (NS)
Složení heterozygoti H63D/S65C	0 (0%)	2 (0,4%)	0,7816 (NS)

NS – nesignifikantní statistický rozdíl

Statistické hladiny významnosti: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Frekvence alely C282Y ve sledovaném souboru nemocných s PCT byla 18,25%, tedy signifikantně vyšší ve srovnání s kontrolní skupinou (3,43%, $p < 0,001$). U 4 (6,3%) pacientů jsme našli mutaci C282Y v homozygotním stavu, zatímco v kontrolní skupině žádný homozygot C282Y nebyl přítomen. 15 (23,8%) nemocných jsme identifikovali jako heterozygoty pro mutaci C282Y, což je rovněž signifikantně vyšší v porovnání s kontrolní skupinou (6,9%, $p < 0,001$).

Frekvence alely H63D ve sledovaném souboru nemocných s PCT byla 26,98%, tedy statisticky významně rozdílná v porovnání s kontrolní skupinou (14,97%, $p < 0,001$). Zastoupení nosičů mutace H63D (v homozygotní i heterozygotní formě) bylo také signifikantně vyšší u nemocných s PCT (47,6%) v porovnání se skupinou kontrol (28,3%,

$p = 0,0017$). Heterozygoti H63D byli překvapivě zastoupeni u 41,3 % pacientů s PCT, v kontrolní skupině ve 26,6% případů ($p = 0,0151$). Homozygoti H63D tvořili 6,3% nemocných s PCT, v kontrolní skupině 1,7% pacientů ($p = 0,0396$).

Složení heterozygoti C282Y/H63D byli identifikováni u 5 (7,9%) pacientů s PCT, v kontrolní skupině v 9 (1,87%) případech ($p = 0,0158$). Pouze u jednoho nemocného s PCT jsme zjistili složeného heterozygota C282Y/S65C.

Ve frekvenci mutace S65C u nemocných s PCT (0,79%) nebyly prokázány statisticky významné rozdíly v porovnání s kontrolní skupinou (1,24%, $p = 0,6594$).

Mutace HFE genu byla prokázána celkem u 69,8% nemocných s PCT v porovnání se skupinou kontrol (35,3%), což je statisticky velmi významné ($p < 0,001$).

Mutaci Y250X v TfR2 genu jsme neprokázali u žádného nemocného s PCT.

3.5.2 Parametry metabolismu železa u nemocných s PCT

U 17 (27%) nemocných s PCT byla zjištěna hladina sérového železa nad 26 $\mu\text{mol/l}$ (referenční rozmezí 11-26 $\mu\text{mol/l}$), u 9 (14%) nemocných byla saturace transferinu nad 50% (referenční rozmezí 20-45%) a u 30 (47,6%) nemocných byla hladina feritinu nad 300 $\mu\text{g/l}$ (referenční rozmezí: muži 7-300 $\mu\text{g/l}$, ženy 9-120 $\mu\text{g/l}$).

Hladiny sérového železa byly signifikantně vyšší u homozygotů C282Y (průměr 31,6 $\mu\text{mol/l}$) v porovnání s heterozygoty C282Y (průměr 23,4 $\mu\text{mol/l}$, $p = 0,0303$), s heterozygoty H63D (průměr 21,9 $\mu\text{mol/l}$, $p = 0,028$) a nemocných bez přítomné mutace HFE genu (průměr 20,4 $\mu\text{mol/l}$, $p = 0,0164$). Statisticky významný rozdíl v hladině sérového feritinu byl zaznamenán mezi homozygoty C282Y (580,3 $\mu\text{g/l}$) a heterozygoty H63D (323,4 $\mu\text{g/l}$,

p = 0,0187). Saturace transferinu byla nejvyšší u homozygotů C282Y a byla signifikantně zvýšena v porovnání se všemi ostatními genotypy.

Přehled parametrů železa u jednotlivých genotypů a u kontrolní skupiny je znázorněn v tabulce 9.

Tab. 9: Parametry metabolismu železa u jednotlivých genotypů a kontrolní skupiny

	Fe ($\mu\text{mol/l}$)	Feritin ($\mu\text{g/l}$)	Saturace transferinu (%)
Homozygoti C282Y	31,58* \pm 6,59	580,25* \pm 275,65	63,75** \pm 12,56
Heterozygoti C282Y	23,44* \pm 5,23	367,90 \pm 248,61	39,5** \pm 10,30
Homozygoti H63D	21,10 \pm 8,91	392,25 \pm 188,11	34,95* \pm 13,87
Heterozygoti H63D	21,89* \pm 7,74	323,43* \pm 168,64	34,66** \pm 11,60
Složení heterozygoti C282Y/H63D	25,22 \pm 6,85	428,40 \pm 276,69	42,75* \pm 11,15
Kontroly	20,14* \pm 8,18	319,57 \pm 267,84	32,47** \pm 13,16

Referenční rozmezí: S- Fe (11-26 $\mu\text{mol/l}$), S-feritin (muži 7-300 $\mu\text{g/l}$, ženy 9-120 $\mu\text{g/l}$), saturace transferinu 20-45%,

Statistické hladiny významnosti: * p < 0,05, ** p < 0,01

3.5.3 Výskyt infekce virem hepatitidy C u PCT

Pozitivitu anti-HCV protilátek jsme prokázali pouze u 5 (7,9 %) nemocných s PCT.

Po jednom případě se jednalo o homozygota C282Y a heterozygota C282Y, u zbylých 5 nemocných nebyla mutace HFE genu prokázána.

3.6 DISKUSE

Mutace HFE genu a infekce virem hepatitidy C představují dva hlavní, nezávislé rizikové faktory v patogenezi sporadické formy PCT a v manifestaci familiární formy PCT. Prevalence obou faktorů se významně liší v různých částech světa. Výskyt HFE mutací u nemocných s PCT byl intenzivně studován zejména v evropských zemích, Austrálii a ve Spojených státech [Ivanova 1999, Stuart 1998, Tannapfel 2001, Toll 2006, Bonkovsky 1998, Bulaj 2000, de Salamanca 1999, Dereure 2001, Frank 2006, Gonzalez-Hevilla 2005, Harper 2004, Nagy 2004, Roberts 1997, Sampietro 1998, Skowron 2001].

V našem souboru pacientů s PCT jsme mutaci HFE genu prokázali u 69,8 % nemocných ve srovnání s 35,3 % v kontrolní skupině ($p < 0,001$). Mutace C282Y byla přítomna u 30,2% pacientů v homozygotní nebo heterozygotní formě. Mutaci H63D jsme prokázali u 47,6 % nemocných, a to buď v homozygotní nebo heterozygotní formě. Pouze 1 nemocný byl nosičem mutace S65C, konkrétně se jednalo o složeného heterozygota C282Y/S65C. U 5 (7,9 %) nemocných byla prokázána mutace C282Y i H63D v heterozygotní formě, byli složenými heterozygoty C282Y/H63D.

Prevalence mutace C282Y u nemocných s PCT byla signifikantně vyšší v porovnání s kontrolní skupinou. Tyto výsledky jsou srovnatelné s výsledky předchozích studií, provedených u nemocných s PCT v naší populaci [Malina 2000, Malina 2002]. Vztah výskytu majoritní mutace C282Y a PCT byl také předmětem zájmu mnoha zahraničních studií. Vliv přítomnosti mutace C282Y je zřejmý ze skutečnosti, že zásoby železa u homozygotů C282Y byly signifikantně vyšší v porovnání s ostatními genotypy.

Frekvence mutace H63D je v české populaci také značně zvýšena. Podobné výsledky k naší studii byly zjištěny v severní Itálii [Sampietro 1998]. Italská studie však neukázala

žádný rozdíl v prevalenci mutace C282Y mezi PCT a kontrolní skupinou. Zvýšené prevalence obou mutací (C282Y a H63D) byly zjištěny v Německu [Tannapfel 2001] a ve Španělsku [de Salamanca 1999]. Zvýšená frekvence mutace H63D však později nebyla potvrzena ve studiích provedených v těchto populacích [Toll 2006, Frank 2006, Gonzalez-Hevilla 2005]. Ačkoliv prevalence H63D byla vyšší u nemocných s PCT, nedetekovali jsme zvýšené parametry železa u každého nemocného. 16 (53%) nemocných s mutací H63D nemělo zvýšené hladiny feritinu, 28 (93%) nemělo saturaci transferinu nad 50%.

Význam mutace S65C u hemochromatózy a ostatních onemocnění s akumulací železa je sporný. Mutace S65C byla objevena u 8% chromozómů nemocných s hemochromatózou, kteří byli negativní pro mutace C282Y a H63D. V kombinaci s C282Y mutací je asociována s mírnou formou hemochromatózy [Asberg 2002, Mura 1999], ale jiní autoři tuto spojitost nepotvrdili. Prevalence mutace S65C se v našem souboru nelišila od skupiny kontrol. Podobné výsledky byly získány ve studiích u nemocných s PCT v Německu, ve Švédsku a v Bulharsku [Frank 2006, Harper 2005, von Ahsen 2001]. Tyto výsledky nasvědčují tomu, že mutace S65C nehraje roli v patogenezi PCT.

Analyzovali jsme také mutace TfR2 genu, které kódují transferinový receptor 2. Mutace TfR2 jsou zodpovědné za hemochromatózu typu 3. Žádný nemocný v našem souboru nebyl nosičem mutace Y250X v TfR2 genu. Naše pozorování jsou shodná s výsledky německé studie [Frank 2006].

Přetížení železem bylo nejvíce vyjádřeno u homozygotů C282Y. Srovnání mezi PCT pacienty s mutací a bez mutace HFE genu ukázalo, že homozygoti C282Y byli postiženi přetížením železem, vyjádřeným zejména saturací transferinu a koncentrací sérového železa.

Pouze 5 (7,9%) nemocných s PCT bylo anti-HCV pozitivní. Tento výsledek nepotvrdil nálezy z předchozí studie, ve které byla popsána vysoká prevalence HCV infekce (21,7%)

u české populace s PCT [Malina 1994]. Naše sledování nedokládá roli HCV infekce jako důležitého rizikového faktoru u PCT pacientů v České republice. Naše nálezy jsou v rozporu s výsledky studií ve střední Evropě. Ve studii v Německu mělo HCV infekci 15% nemocných s PCT [Tannapfel 2001]. V celkovém přehledu zahrnujícím 50 studií byla průměrná prevalence HCV infekce 47% [Gisbert 2003].

Výsledky uvedené studie jsme uveřejnili v British Journal of Dermatology (viz příloha č. 2).

4 ÚLOHA ŽELEZA V PATOGENEZI

DUPUYTRENOVY NEMOCI

4.1 DUPUYTRENOVA NEMOC

4.1.1 Definice, epidemiologie a genetika

Dupuytrenova nemoc (Dupuytren's disease, DD) je jedním z nejčastějších chronických onemocnění ruky. V důsledku poruchy vazivové tkáně dochází ke zkracování a zesilování palmární aponeurózy (povázky dlaně a prstů), které ve svém důsledku vede k omezení funkce ruky. Z pohledu pracovních a zájmových aktivit ovlivňuje kvalitu života pacienta a stává se někdy sociálním problémem [Krejča 2007].

Vůbec první zmínka o kontraktuře prstů pochází ze Skotska ve 12. století, první záznam o této deformitě v lékařské literatuře je datován rokem 1614. Průlom v diagnostice a léčbě Dupuytrenovy nemoci učinil v roce 1832 francouzský chirurg a baron Guillaume Dupuytren. V českém písemnictví se první zmínky o tomto onemocnění datují do roku 1949 (Václav Karfík).

V bělošské populaci je prevalence Dupuytrenovy kontraktury průměrně 3-6%. Tradičně nejvyšší prevalence v Evropě byla zaznamenána ve skandinávských zemích, v zemích Severní Evropy a v Austrálii [Hart 2005]. Tento fakt je podkladem mnoha teorií o severském původu této nemoci, rozšířené po světě během četných invazí Vikingů.

U afrických černochů je onemocnění obrovskou raritou. U žluté rasy je onemocnění extrémně vzácné, výjimku tvoří Japonci s prevalencí vzniku Dupuytrenovy nemoci vyšší než v Evropě.

Dupuytrenova nemoc je autosomálně dominantně dědičné onemocnění s variabilní penetrancí genů [Hu 2005]. Žádný jednotlivý gen nebyl dosud identifikován, předpokládá se, že na vzniku onemocnění se interaktivně podílí soubor různých genů [Bayat 2003]. Příčina inkompletní penetrance genů není známa, k manifestaci onemocnění přispívají nepochybně další faktory.

4.1.2 Etiologie a patogeneze

Na základě mnoha klinických studií se rizikové faktory Dupuytrenovy nemoci dělí do dvou skupin, a to na faktory neovlivnitelné a ovlivnitelné [James 2000, Brock 1994]. Mezi neovlivnitelné faktory se řadí genetické faktory, věk a pohlaví. Z anamnézy se může vystopovat rodinný výskyt choroby, přičemž daleko častěji jsou postiženi muži (poměr mužů a žen 4:1) ve čtvrté a vyšší dekádě života. Z ostatních rizikových faktorů rozvoje onemocnění nutné zmínit kouření, diabetes mellitus, hypercholesterolémii, opakovaná mikrotraumata ruky následkem pracovního procesu (těžká manuální práce), nadměrnou konzumaci alkoholu, přítomnost chronického jaterního onemocnění či epilepsii.

Současné poznatky o patogenezi Dupuytrenovy nemoci svědčí o analogických procesech jako při jaterní fibrogenezi. Hlavním histologickým nálezem je vazivová tkáň, která obsahuje kolagen III, proteoglykany a fibronektin. Tyto látky jsou produkovány myofibroblasty, které tvoří fibrily kolagenu III namísto kolagenu I. Myofibroblasty vznikají transformací z fibroblastů (v játrech z hvězdicovitých buněk) působením cytokinů, z nichž nejvýznamnější podíl má TGF- β (transformující růstový faktor β).

4.1.3 Diagnóza a klinický obraz

Diagnóza Dupuytrenovy nemoci závisí výhradně na klinických kritériích. Neexistuje žádné biochemické, rentgenové ani jiné vyšetření, které by bylo pro tuto diagnózu specifické. Klinická diagnóza je přesto ve většině případů snadná. Všeobecně nalézáme ztluštění palmární aponeurózy nebo aponeurózy prstů, prezentované jako uzel nebo pruh. Onemocnění postupuje většinou pomalu a v závislosti na rychlosti bujení vaziva může nakonec postihnout převážnou část vazivového aparátu ruky až nakonec dojde ke vzniku kontinuálních vazivových pruhů v dlani, které přecházejí na jednotlivé prsty. Dochází tak k jejich přitažení až ohnutí směrem do dlaně a nemožnosti zpětného natažení, tedy ke vzniku kontraktury. Tato kontraktura je v souvislosti s Dupuytrenovou nemocí známa jako Dupuytrenova kontraktura. Vzhledem k intimnímu spojení s nervově-cévními svazky, s flexorovými šlachami a klouby může docházet také k postižení šlachově-kloubního aparátu ruky.

V časnějších fázích se častěji vyskytují palmární léze ve formě uzlů a pruhů. Digitální postižení zahrnují kromě uzlů a pruhů také kloubní kontraktury. Prsty při Dupuytrenově nemoci nejsou postiženy rovnoměrně. Palec a ukazovák je postižen vzácně, zatímco prsteník a malík jsou onemocněním zasaženy velmi často. Vůbec nejčastěji je to právě prsteník, dále následuje malík a prostředník, palec a nejméně často se jedná o ukazovák. Ačkoliv je onemocnění zpočátku omezeno na jeden prst, většinou progreduje na ostatní prsty, přičemž se nemusí jednat o sousední prst. Nejběžnější kombinací je však postižení prsteníku a malíku. U těžkých forem mohou být masivně postiženy všechny prsty jak v úrovni dlaně, tak i prstů.

Dupuytrenova nemoc postihuje obě ruce, rozvoj kontraktury je bez vztahu k dominanci pravé nebo levé ruky. Vzhledem k tomu, že většina pacientů jsou praváci, je pravá ruka operována nepatrně častěji než ruka levá.

Jen v nízkém procentu provází rozvoj Dupuytrenovy nemoci další symptomy. Může se objevit bolest, mravenčení, pocení, otok, pocit chladu, otok, změna barvy či teplotní rozdíl. Tyto symptomy však častěji provázejí jiná souběžně probíhající onemocnění, jako jsou syndrom karpálního tunelu či Raynaudův fenomén.

Již od dob barona Dupuytrena je známo, že Dupuytrenovu nemoc mohou provázet také fibrotické léze v jiných, tedy ektopických lokalizacích. Kromě palmární aponeurózy mohou fibrózní změny postihnout aponeurózu plantární, v literatuře označované jako morbus Ledderhose. Další vzácnější ektopickou lokalizací je tunica albuginea kavernózních těles penisu, označované jako induratio penis plastica nebo Peyroneova nemoc [Krejča 2007].

4.1.4 Léčba

V léčbě Dupuytrenovy nemoci se v dnešní době upřednostňuje chirurgické řešení. Indikací k chirurgické léčbě je pozitivní table top test a dlaňová forma, která většinou bolestivě utiskuje nervově-cévní svazek při úchopu. Při pozitivním table top testu není položená ruka úplně v kontaktu s podložkou. Podle typu a rozsahu postižení se volí některá z chirurgických technik. Nejjednodušší výkon spočívá v protěti fasciálních pruhů při fasciotomii. Mezi nejčastěji používanou metodou při řešení Dupuytrenovy kontraktury dlaně a prstů patří regionální fasciektomie. Tímto zákrokem se odstraňují kontrakční pruhy a postižená fascie. Při dermofasciektomii se provádí excize té části kožního krytu, která přímo souvisí s kontrakčními pruhy, uzly a dalšími částmi postižené fascie. Po excizi kůže a provedení fasciektomie se vzniklý defekt řeší kožním autotransplantátem [Krejča 2007].

Od konzervativní léčby se v poslední době spíše ustupuje, neboť většinou přinášela malý nebo žádný terapeutický efekt. Používala se léčba ultrazvukem, dlahování, radioterapie

a podávání vitamínu E. Lepší výsledky má jediné aplikace enzymatických injekcí do kontraktury (enzymatická fasciotomie kolagenázou).

4.2 CÍL STUDIE

Cílem studie bylo zjistit, zda zvýšená akumulace železa přispívá k rozvoji Dupuytrenovy nemoci. Úloha železa v patogenezi Dupuytrenovy nemoci nebyla dosud analyzována.

Naše hypotéza vycházela z úlohy železa při rozvoji jaterní fibrogenese. Železo indukci oxidačního stresu vyvolává tvorbu volných kyslíkových radikálů a prozánětlivých cytokinů (zejména TGF- β), které aktivují jaterní hvězdčité buňky. Aktivované hvězdčité buňky (myofibroblasty) produkují odlišný typ kolagenu, charakteristický pro patologickou fibrogenezi. Při rozvoji Dupuytrenovy kontraktury jsme předpokládali analogický proces v palmární aponeuróze.

4.3 SOUBOR NEMOCNÝCH A METODIKA

Soubor nemocných byl tvořen 90 nemocnými (82 mužů a 8 žen, ve věkovém rozmezí 29 až 81 let, průměrný věk 61 let., průměrný BMI (body mass index) 26,7 kg/m²), kteří podstoupili operační řešení pokročilé formy Dupuytrenovy kontraktury na klinice plastické chirurgie FNKV. Kontrolní skupina byla tvořena 33 dobrovolníky (30 mužů a 3 ženy,

ve věkovém rozmezí 26 až 89 let, průměrný věk 56 let, průměrný BMI 25,9 kg/m²) z Prahy a střeďočekského kraje. Mezi skupinou nemocných s Dupuytrenovou nemocí a souborem kontrol nebyly signifikantní rozdíly ve věku ani BMI.

V obou vyšetřovaných skupinách byly stanoveny laboratorní parametry metabolismu železa (koncentrace sérového železa, sérového feritinu, saturace transferinu), aktivita sérových transamináz (AST, ALT), serologie hepatitid (HBsAg, anti-HCV protilátky) a koncentrace celkového cholesterolu. V anamnéze jsme se zajímali o přítomnost diabetu, chronického jaterního onemocnění, konzumaci alkoholu a dále o dlouhotrvající (více než 5 let) anamnézu manuální práce. Za významný abusus alkoholu jsme považovali příjem alkoholu vyšší než 60 gramů denně u mužů a více než 20 gramů denně u žen. U nemocných s Dupuytrenovou kontrakturou, kteří se podrobili operačnímu výkonu, byly vzorky palmární aponeurózy odeslány k histologickému vyšetření do ústavu patologie 3. LF UK a FNKV, kde byly obarveny hematoxylinem a eozinem a Perlsovou metodou a stanovena případná depozita železa. V této skupině byly dále stanoveny dvě nejfrekventovanější mutace HFE genu (C282Y a H63D) metodou PCR-RFLP, která je podrobně popsána v kap. 3.4.2.1. Prevalenci mutací HFE genu u nemocných s DD jsme porovnávali s odlišnou kontrolní skupinou, v našem případě představovanou běžnou populací. Pro porovnání jsme tedy použili data z analýzy Guthrie karet [Cimburova 2002, Cimburova 2005].

Hladiny sérového železa, vazebné kapacity pro železo a transamináz (ALT, AST) byly stanoveny použitím metody VITROS (Analyzátor Vitros Fusion 5,1). Ke stanovení hladiny feritinu byla použita chemiluminiscenční imunoanalýza (Analyzátor Immulite 2000, DPC). Saturace transferinu byla vypočítána podílem sérové hladiny železa k vazebné kapacitě pro železo, tento podíl vynásoben 100, a tak vyjádřena v procentech.

Ke stanovení koncentrace celkového cholesterolu byla použita enzymaticko-kolorimetrická metoda (Analyzátor Advia 1800).

Statistická analýza byla provedena použitím Studentova t-testu a Fisherova exaktního testu s použitím softwaru SigmaStat.

4.4 VÝSLEDKY

4.4.1 Mutace HFE genu a parametry metabolismu železa

Prevalence mutací HFE genu (C282Y a H63D) ve skupině nemocných s DD a v kontrolní skupině (běžné české populaci) je uvedena v tabulce 10.

Přehled parametrů metabolismu železa (sérového železa, saturace transferinu a sérového feritinu) a hladin celkového cholesterolu u nemocných s DD a v kontrolní skupině je uveden v tabulce 11.

Tab. 10: Prevalence mutací HFE genu u nemocných s DD a v kontrolní skupině

Mutace HFE genu	Dupuytrenova Nemoc		Kontrolní skupina		p
	n	%	n	%	
Heterozygot C282Y	5/80	6,2	33/481	6,9	0,84 (NS)
Homozygot C282Y	0/80	0	0/481	0	-
Heterozygot H63D	25/80	31,2	128/481	26,6	0,38 (NS)
Homozygot H63D	1/80	1,2	8/481	1,7	0,78 (NS)

NS – nesignifikantní statistický rozdíl

Tab. 11: Parametry metabolismu železa a hladiny celkového cholesterolu u nemocných s DD a v kontrolní skupině

parametr	Dupuytrenova nemoc		Kontrolní skupina		p
	průměr	95% CI	průměr	95% CI	
Sérové železo (μmol/l)	18,2	16,8 – 19,6	15,7	13,2 – 18,2	0,65 (NS)
Saturace transferinu (%)	29,4	26,7 – 32,0	25,7	21,2 – 30,1	0,18 (NS)
Sérový feritin (ng/ml)	223,4	179,4 – 267,4	217,1	136,1 – 298,1	0,89 (NS)
Sérový cholesterol (mmol/l)	5,7	5,4-5,9	5,4	4,9 – 5,8	0,25 (NS)

CI – interval spolehlivosti (confidence interval)

NS – nesignifikantní statistický rozdíl

V parametrech metabolismu železa, hladině celkového cholesterolu jsme nezaznamenali statisticky významné rozdíly mezi souborem nemocných s DD a souborem kontrol. Podobně jsme u jedinců s DD neidentifikovali signifikantně vyšší zastoupení mutací HFE genu v porovnání s běžnou českou populací. Nejzajímavějším nálezem je relativně vyšší zastoupení heterozygotů H63D, mutaci H63D v heterozygotní formě jsme prokázali u 25 (31,2%) nemocných s DD.

Všechny operační vzorky palmární aponeurózy byly podrobeny histologickému vyšetření s potvrzením diagnózy DD, přičemž jsme nerozlišovali mezi uzly a pruhy. Pouze u 2 (2,2%) vzorků jsme v Perlsově metodě identifikovali ojedinělá depozita železa v makrofázích.

4.4.2 Rizikové faktory rozvoje Dupuytrenovy nemoci

Z rizikových faktorů rozvoje Dupuytrenovy nemoci jsme přítomnost chronické jaterní léze prokázali u 24 (27%) nemocných, v porovnání s 2 (6,1%) nemocnými v kontrolní skupině, což je statisticky velmi významné ($p < 0,013$). Z chronických jaterních onemocnění bylo nejvíce zastoupeno alkoholové jaterní poškození, které bylo přítomno u 75 % nemocných s DD. Ostatní jaterní léze byly zastoupeny v malém procentu případů. Jednalo se vždy po 1 (4,2%) případě o chronickou hepatitidu C, nealkoholovou steatohepatitidu a primární biliární cirhózu. U 3 (12,5%) nemocných s DD se nám etiologii chronické jaterní léze nepodařilo objasnit.

Statisticky významné rozdíly jsme dále zjistili v anamnéze výskytu opakovaných mikrotraumat ruky ($p < 0,048$) a chronické konzumaci alkoholu ($p < 0,029$) u pacientů s DD v porovnání s kontrolní skupinou. Naopak v prevalenci výskytu diabetu jsme statisticky významné rozdíly neprokázali.

Přehled zastoupení jednotlivých rizikových faktorů u nemocných s DD a v kontrolní skupině je uveden v tabulce 12.

Tab. 12: Prevalence rizikových faktorů u nemocných s DD a v kontrolním souboru

Rizikový faktor	Dupuytrenova nemoc		Kontrolní skupina		p
	n	%	n	%	
Chron. jaterní léze	24/90	26,7	2/33	6,1	*0,013
Diabetes mellitus	24/90	26,7	6/33	18,2	0,336 (NS)
Mikrotrauma ruky	30/90	33,3	5/33	15,1	*0,048
Abusus alkoholu	32/90	35,5	5/33	15,1	*0,029

Statistické hladiny významnosti: * $p < 0,05$

NS – nesignifikantní statistický rozdíl

4.5 DISKUSE

Etiologie Dupuytrenovy nemoci není dosud známa. Předpokládá se autosomálně dominantní dědičnost, avšak žádný konkrétní gen nebyl dosud identifikován. Na manifestaci onemocnění se nepochybně podílí řada faktorů životního stylu, mezi které se řadí těžká manuální práce, konzumace alkoholu a kouření. Jejich efekt spočívá v mikrotraumatizaci tkáně, poruše mikrocirkulace a tkáňové hypoxii. Důsledkem těchto procesů je rozvoj zánětlivé odpovědi, doprovázenou produkcí cytokinů, zejména TGF- β .

Naše studie nepotvrdila předpokládaný efekt zvýšené akumulace železa na rozvoj DD. Nezaznamenali jsme zvýšenou prevalenci mutací HFE genu ani zvýšení parametrů metabolismu železa. V operačních vzorcích palmární aponeurózy jsme histologicky nedetekovali významná depozita železa.

Rozvoj DD byl v našem souboru nemocných významně vázán na věk, pohlaví, abuzus alkoholu a dlouhodobou těžkou manuální práci. Tyto rizikové faktory byly analyzovány v obdobných studiích v zahraničí [Gudmundsson 2000, Gudmundsson 2001, Godtfredsen 2004], v naší studii však nebylo zahrnuto kouření. Překvapivě jsme nezjistili vyšší prevalenci diabetu a hypercholesterolemie u nemocných s DD. Nemocní s diabetem byli více zastoupeni v kontrolní skupině, což dokládá poměrně vysokou prevalenci DM v české populaci nad 60 let věku [Anděl 2001].

Ve skandinávských studiích byl analyzován vztah DD k incidenci nádorů a mortalitě. Signifikantně vyšší mortalita byla zaznamenána u mužů se vznikem DD před 60. rokem věku [Mikkelsen 1999]. Velká švédská studie u 15 212 pacientů, sledovaných 29 let po operačním výkonu, prokázala relativní riziko vzniku nádorů u 24% nemocných. Není překvapivé, že převažovala nádorová onemocnění vázaná na konzumaci alkoholu a kouření [Wilbrand 2000]. Tyto výsledky odrážejí vliv nedobrého životního stylu nemocných s DD.

Naše nálezy jsme uveřejnili v časopise *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* (viz příloha č.2).

5 MUTACE PRO GENETICKOU HEMOCHROMATÓZU A METABOLISMUS ŽELEZA U CHRONICKÝCH JATERNÍCH ONEMOCNĚNÍ

S přetížením železem se kromě genetické hemochromatózy setkáváme u řady dalších jaterních onemocnění, mezi které patří nejčastěji alkoholové jaterní poškození, nealkoholová steatohepatitida, chronické virové hepatitidy, pozdní kožní porfyrie [Bonkovsky 2003]. O genetické hemochromatóze je pojednáno v kap. 2.2.1, o pozdní kožní porfyrii v kap. 3.

V této studii jsme se soustředili na problematiku akumulace železa u alkoholového jaterního poškození a chronických virových hepatitid. Vzhledem k tomu, že chronická hepatitida B není provázena výraznými změnami metabolismu železa a zvýšenou prevalencí mutací HFE genu, je pozornost soustředěna na chronickou hepatitidu C.

5.1 ALKOHOLOVÉ JATERNÍ POŠKOZENÍ

Patologické hromadění železa je u alkoholového jaterního poškození (ALD) velmi časté, ale přesný mechanismus není dosud znám [Whitfield 2001]. Většina alkoholiků má přitom normální, nebo jen mírně zvýšenou koncentraci železa v játrech.

Alkohol a železo se vyznačují synergickým účinkem na indukci oxidačního stresu a peroxidaci lipidů [Pietrangelo 1998]. Oxidační stres hraje klíčovou úlohu v patogenezi akumulace železa a v progresi alkoholové jaterní léze od jaterní steatózy, hepatitidy a fibrózy až k jaterní cirhóze. Železo se ukládá v hepatocytech a v Kupfferových buňkách, v nichž železo, na rozdíl od GH, v pokročilých stádiích převažuje [Kohgo 2005]. Zvýšený oxidační stres lze prokázat zvýšenými koncentracemi produktů lipidové peroxidace, mezi které patří např. malondialdehyd a 4-hydroxy-2-nonenal (HNE). Látky vzniklé peroxidací lipidů pak stimuluji produkci kolagenu aktivovanými hvězdicovitými buňkami. Reaktivní kyslíkové radikály (ROS) vznikají při metabolismu alkoholu jednak působením cytochromu P450 v jaterních mikrosomech a dále při klasické metabolické cestě přes acetaldehyd a acetát účinkem aldehydoxidázy a xantinoxidázy, kdy vzniká superoxidový anion (O_2^-). Nejvýznamnější účinek z ROS se připisuje hydroxylovému radikálu (OH^\cdot), jenž vzniká při Fentonově reakci. V důsledku oxidačního stresu produkují hepatocyty a makrofágy cytokiny, zejména TGF- β , který stimuluje jaterní fibrogenezi. Na zvířecích modelech s ALD a akumulací železa bylo prokázáno, že železo v Kupfferových buňkách aktivuje nukleární faktor – kappa B (NF- κ B) s následným zvýšením exprese prozánětlivých cytokinů, zejména IL-1 β a TNF- α [Xiong 2003]. Cytokiny IL-1 β a TNF- α stimuluji vychytávání transferinového železa, které se při chronické konzumaci alkoholu hromadí v játrech. Je pravděpodobné, že alkohol cestou oxidačního stresu zvyšuje expresi TfR1 [Suzuki 2002].

Z recentních studií je zřejmé, že významnou úlohu v přetížení železem u nemocných s ALD může sehrát snížená exprese hepcidinu [Harrison-Findik 2007]. Alkohol vyvolaným oxidačním stresem potlačuje sekreci hepcidinu v hepatocytech. Snížená exprese hepcidinu způsobuje zvýšenou expresi DMT1 a ferroportinu s následným zvýšeným vstřebáváním železa ve střevě. Vliv alkoholu na expresi hepcidinu a vstřebávání železa lze potlačit antioxidanty [Harrison-Findik 2006].

Mutace HFE genu pravděpodobně nehrají kauzální roli v patogenezi akumulace železa u ALD. Konzumace alkoholu však nepochybně přispívá k expresi fenotypu hemochromatózy u některých genotypů, zejména pak homozygotů C282Y [Fletcher 2002].

5.2 CHRONICKÁ HEPATITIDA C

V důsledku zánětu a nekrózy hepatocytů dochází u nemocných s chronickou hepatitidou C k narušení homeostázy železa, neboť uvolněné železo a feritin z poškozených hepatocytů zvyšuje koncentrace železa a feritinu v séru. Chronický zánět v játrech může navíc modifikovat expresi transferinových receptorů i feritinu, a tak narušit vychytávání a absorpci železa do hepatocytů [Tung 1999]. Zvýšení parametrů metabolismu železa obvykle také doprovází zvýšená aktivita aminotransferáz (ALT, AST) [Ioannou 2002]. Hladina železa v séru má těsný vztah k zánětlivé aktivitě (gradingu), zatímco hladina feritinu v séru je striktně vázána na stupeň jaterní fibrózy (staging) [Di Bisceglie 1999, Fabris 2001]. U anti-HCV pozitivních jedinců se zvýšenými sérovými parametry metabolismu železa nebyly zaznamenány zvýšené zásoby železa v játrech u všech nemocných [Riggio 1997, Silva 2005]. Žádný z parametrů metabolismu železa nedokáže spolehlivě odhadnout koncentraci železa v játrech, a tak předpovědět progresi onemocnění nebo odpověď na léčbu interferonem [Ioannou 2002, Sherrington 2002]. Je však pravděpodobné, že zvýšená koncentrace železa v játrech přispívá k progresi jaterního poškození a jaterní fibrózy [Sartori 1998].

Železo, podobně jako u alkoholového jaterní poškození, indukuje oxidační stres, který prostřednictvím produktů peroxidace lipidů a reaktivních kyslíkových radikálů aktivuje hvězdčicovité buňky a vede k jaterní fibrogenézi [Ramm 2005, Rigamonti 2002, Nieto 2002].

Depozita železa v hepatocytech dále usnadňují replikaci viru HCV [Kakizaki 2000]. Přetížení železem bývá považováno za negativní prognostický faktor progresu onemocnění a selhání léčby rekombinantním interferonem v monoterapii nebo v kombinaci s ribavirinem [Distant 2002, Fujita 2007]. Z těchto důvodů byla provedena řada studií, ve kterých se sledoval efekt provádění samotných venepunkcí, venepunkcí před či současně během protivirové léčby.

V mnoha studiích došlo po samotných venepunkcích k izolovanému poklesu ALT [Kawamura 2005, Hayashi 1995, Yano 2004], v některých případech také ke snížení gradingu a zpomalila se progresu jaterní fibrózy [Sartori 2001, Yano 2002]. Ačkoli neobjasněným mechanismem došlo také k poklesu ALT, nebylo v řadě studií po následné protivirové léčbě dosaženo setrvalé virologické odpovědi (SVR) [Piperno 1996]. Lepších výsledků z hlediska SVR bylo dosaženo při současném provádění venepunkcí a protivirové léčby [Van Thiel 1996, Fong 1998, Fontana 2000]. Kato a spol. prokázali efekt flebotomií na pokles rozvoje hepatocelulárního karcinomu [Kato 2007]. Odpůrci provádění venepunkcí poukazují na neovlivnění virémie [Sartori 2001, Herrera 1999] a nutnosti případného snížení dávek ribavirinu při anémii indukované venepunkcemi [Hofer 2004, Pianko 2002]. Výsledky se současnou standardní protivirovou léčbou, tj. kombinací pegylovaného interferonu s ribavirinem nejsou dosud přesvědčivé.

Další diskutovanou otázkou je vliv přítomnosti mutací HFE genu v akumulaci železa u anti-HCV pozitivních nemocných, neboť výsledky studií jsou značně kontroverzní. Někteří autoři zjistili u nosičů mutací HFE genu vyšší stupeň nekroticko-zánětlivé aktivity a fibrózy v játrech [Bonkovsky 2002, Smith 1998, Tung 2003, Erhardt 2003]. Mutace HFE genu mohou urychlovat jaterní fibrózu, ale nemusí být odpovědné za progresi do jaterní cirhózy, neboť prevalence mutací u nemocných s jaterní cirhózou není zvýšena [Tung 2003]. Jiné studie neprokázaly souvislost zvýšených zásob železa či progresu jaterní léze s přítomností

HFE mutací [Thorburn 2002, Negro 2000, Hézode 1999].

Zvýšená akumulace železa u anti-HCV pozitivních jedinců, podobně jako u GH, přispívá k rozvoji hepatocelulárního karcinomu (HCC) [Fracanzani 2001]. U nemocných s chronickou hepatitidou C není však koncentrace železa v játrech tak vysoká jako u GH, a tak se na vzniku HCC nepochybně podílí samotný účinek viru na genom hepatocytu. Akumulace železa je pak podružným, avšak nezávislým rizikovým faktorem.

V posledních letech byly zahájeny studie zkoumající vliv centrálního regulátoru homeostázy železa hepcidinu u chronické hepatitidy C, avšak prozatím v malém počtu a s nejednoznačnými závěry.

5.3 CÍLE STUDIE

Cílem studie bylo zjistit prevalenci mutací HFE genu a mutace TfR2 genu u nemocných s chronickým jaterním onemocněním (chronic liver disease, CLD), konkrétně u nemocných s genetickou hemochromatózou (GH), s chronickou hepatitidou B (HBV) a C (HCV) a s alkoholovým jaterním poškozením (ALD). U jedinců s mutací v HFE genu poté analyzovat vztah přítomnosti mutace k laboratorním parametrům metabolismu železa a k průběhu vlastního onemocnění.

O vztahu přítomnosti mutací HFE genu a známek přetížení železem jsme nepochybovali u skupiny nemocných s GH. Tato vazba však nebyla dosud objasněna u nemocných s chronickými virovými hepatitidami a u alkoholového jaterního poškození. Dosud provedené studie nepodalý jednoznačné výsledky a vztah mutací HFE genu k etiologii přetížení železem u HBV, HCV a ALD je často zpochybňován.

5.4 SOUBOR NEMOCNÝCH A METODIKA

5.4.1 Soubor nemocných

Do studie bylo zařazeno celkem 454 nemocných s chronickým jaterním onemocněním (275 mužů, 179 žen, ve věkovém rozmezí 24 až 89 let, věkový průměr 55,4 let), kteří byli vyšetřeni na I. interní klinice FNKV a 3. LF UK v letech 2000-2009. V souboru nemocných bylo zastoupeno 63 nemocných s hemochromatózou (GH), 51 nemocných s chronickou hepatitidou B (HBV), 122 nemocných s chronickou hepatitidou C (HCV) a 218 nemocných s alkoholovým jaterním poškozením (ALD).

Prevalence mutací HFE genu byla porovnána s běžnou českou populací, podobně jako v předchozích studiích jsme použili data z analýzy Guthrie karet. Pro porovnání parametrů metabolismu železa byla sestavena odlišná kontrolní skupina, složená ze 69 nemocných, kteří byli vyšetřeni na našem pracovišti z jiných důvodů než pro jaterní onemocnění.

Diagnóza chronické hepatitidy B a C byla stanovena na základě positivity příslušných antigenů a protilátek. Při průkazu positivity serologie byla posléze doplněna virémie – HBV-DNA a HCV-RNA metodou PCR. Před započítím protivirové léčby měli nemocní s chronickými virovými hepatitidami provedenu necílenou jaterní biopsii. Diagnóza alkoholového jaterního poškození se opírala o anamnézu abuzu alkoholu (více než 60 gramů denně u mužů, více než 20 gramů u žen), laboratorní nálezy a sonografické nálezy jaterní léze (nejčastěji jaterní steatózy), u nemocných s jaterní cirhózou pak o přestavbový proces jater a sonografické známky portální hypertenze.

5.4.2 Metodika

5.4.2.1 Laboratorní diagnostika

Výsledky parametrů metabolismu železa (sérového železa, vazebné kapacity pro železo, sérového feritinu) a jaterních testů (ALT a AST) byly dostupné u 50 nemocných s GH, 46 nemocných s HBV, 108 nemocných s HCV, 193 nemocných s ALD a 69 nemocných v kontrolní skupině. Kompletní laboratorní výsledky tedy nebyly dostupné u celého souboru nemocných, testovaných pro přítomnost mutace HFE genu.

Hladiny sérového železa, vazebné kapacity pro železo a transamináz (ALT, AST) byly stanoveny použitím metody VITROS (Analyzátor Vitros Fusion 5,1). Ke stanovení hladiny feritinu byla použita chemiluminiscenční imunoanalýza (Analyzátor Immulite 2000, DPC). Saturace transferinu byla vypočítána podílem sérové hladiny železa k vazebné kapacitě pro železo, tento podíl vynásoben 100, a tak vyjádřena v procentech.

Serologie hepatitidy B a C byla stanovena pomocí metody ELISA, s použitím imunoanalyzátoru (VITROS ECI, ORTHO Clinical Diagnostics). U nemocných s pozitivitou příslušných antigenů a protilátek bylo doplněno kvantitativní stanovení virémie HBV-DNA real-time PCR metodou (přístroj Rotor-Gene TM 3000, Corbett Life Science), ke kvantifikaci RNA-HCV real-time PCR metoda (přístroj COBAS® TaqMan® 48, Roche Diagnostics). Pro kvalitativní průkaz HCV-RNA byla využita end-point metoda Cobas® AmpliCor HCV test v2.0 (přístroj Cobas® AmpliCor, Roche Diagnostics).

5.4.2.2 Analýza mutací HFE genu a mutace TfR2 genu

Mutace HFE genu (C282Y, H63D, S65C) a mutace TfR2 genu (Y250X) byly analyzovány v celém souboru, tedy u 454 nemocných. DNA byla extrahována za pomoci izolační soupravy Qiagen – mini DNA kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany), dle doporučení výrobce (viz příloha č.1). Analýzy mutací HFE genu a TfR2 genu byly provedeny metodou RFLP-PCR, které jsou podrobně popsány v kap. 3.4.2.1 a kap. 3.4.2.2.

5.4.2.3 Statistické metody

Data byla vyjádřena jako průměr \pm směrodatná chyba průměru (SEM). K výpočtu frekvence alel byly použity vzorce uvedené v kap. 3.4.2.4. K porovnání frekvence genotypů byl použit χ^2 – test (chí kvadrát test) a Fisherův exaktní test. Protože proměnné nesplňovaly podmínky normálního rozložení, byla biochemická data mezi skupinami porovnána neparametrickými metodami, a to pomocí Mann – Whitney testu, Kruskal – Wallisova testu s vícenásobným porovnáním hodnot (Dunn's Multiple Comparison test). Statistická analýza byla provedena za pomoci programu GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., version 5.00). Hladina významnosti α byla nastavena na hodnotu 0,05 (5%).

5.5 VÝSLEDKY

5.5.1 Analýza mutací HFE genu a mutace TfR2 genu

Frekvence jednotlivých mutací HFE genu jsou přehledně uvedeny v tabulce 12, frekvence jednotlivých genotypů pak v tabulce 13.

Tab.12: Frekvence mutací HFE genu

	GH (n = 63)	HBV (n = 51)	HCV (n = 122)	ALD (n = 218)	Kontroly (n = 481)
C282Y	69,84%***	2,94%	2,46%	2,29%	3,43%
H63D	23,02%*	13,73%	10,66%	16,06%	14,97%
S65C	2,38%	3,92%	-	0,46%	1,24%

Statistické hladiny významnosti: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Tab. 13: Kompletní přehled jednotlivých detekovaných genotypů

	GH (n = 63)	HBV (n = 51)	HCV (n = 122)	ALD (n = 218)	Kontroly (n = 481)
Heterozygot C282Y	12 (19%)*	3 (5,9%)	6 (4,9%)	10 (4,6%)	33 (6,9%)
Homozygot C282Y	38 (60,3%)*	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Heterozygot H63D	13 (20,6%)	12 (23,5%)	22 (18%)	54 (24,8%)	128 (26,6%)
Homozygot H63D	8 (12,7%)*	1 (2,0%)	2 (1,6%)	8 (3,7%)	8 (1,7%)
Heterozygot S65C	3 (4,8%)	4 (7,8%)	0 (0%)	2 (0,9%)	12 (2,5%)
Složení heterozygoti C282Y/H63D	10 (15,9%)*	1 (2,0%)	1 (0,8%)	0 (0%)	9 (1,9%)
Složení heterozygoti C282Y/S65C	1 (1,6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Složení heterozygoti H63D/S65C	1 (1,6%)	1 (2,0%)	0 (0%)	2 (0,9%)	2 (0,4%)

Statistické hladiny významnosti: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Frekvence alel C282Y a H63D byly u nemocných s GH statisticky významně vyšší v porovnání s běžnou českou populací (69,84% oproti 3,43%, $p < 0,0001$; 23,02% oproti 14,97%, $p = 0,0201$). Homozygoti C282Y a homozygoti H63D byli signifikantně více zastoupeni u nemocných s GH v porovnání s kontrolní skupinou (60,3% oproti 0%, $p < 0,0001$; 12,7% oproti 1,7%, $p < 0,0001$). Také zastoupení složených heterozygotů C282Y/H63D bylo statisticky velmi významné (15,9% oproti 1,9%, $p < 0,0001$).

U HCV nemocných byla frekvence alely C282Y 2,46% a frekvence alely H63D 10,66%, tedy nesignifikantní v porovnání s kontrolní skupinou. Avšak celkově jedinců s mutací HFE genu (23,8%) bylo signifikantně více v porovnání s běžnou populací (35,3%, $p = 0,0151$).

V prevalenci mutací HFE genu u pacientů s HBV a ALD jsme neprokázali statisticky významné rozdíly v porovnání se souborem kontrol. Frekvence alely C282Y byla u HBV nemocných 2,94%, u nemocných s ALD 2,29%. Frekvence alely H63D byla u HBV nemocných 13,73%, u nemocných s ALD 16,06%. Zastoupení jednotlivých genotypů bylo u HBV, ALD a v kontrolní skupině rovnoměrné. Ačkoliv bylo u HBV nemocných vyšší zastoupení heterozygotů S65C (7,8%), tento rozdíl nebyl v porovnání s kontrolním souborem statisticky významný (2,5%, $p = 0,0573$).

Při zohlednění tíže jaterního poškození nebyly zjištěny rozdíly v prevalenci mutací HFE genu u nemocných s jaterní cirhózou v porovnání s nemocnými bez cirhózy, ani v porovnání s běžnou populací.

Mutace Y250X v TfR2 genu nebyla prokázána u žádného nemocného s chronickým jaterním onemocněním.

5.5.2 Parametry metabolismu železa u chronických jaterních chorob

Kompletní přehled laboratorních výsledků, včetně jaterních testů (ALT, AST) u jednotlivých onemocnění je uveden v tabulce 14.

Tab. 14: Parametry metabolismu železa a hladiny transamináz u chronických jaterních chorob

	Sérové železo (μmol/l)	Sérový feritin (μg/l)	Saturace transferinu (%)	ALT (μkat/l)	AST (μkat/l)
GH (n = 50)	35,18*** ± 1,378	792,0*** ± 140,4	70,13*** ± 4,080	0,9684 ± 0,1268	0,7707 ± 0,0866
HBV (n = 46)	21,23 ± 1,061	162,5 ± 31,43	35,75 ± 2,996	0,8763 ± 0,1161	0,8430 ± 0,1029
HCV (n = 108)	23,84** ± 0,9805	268,1 ± 37,69	38,47 ± 2,196	1,173*** ± 0,0791	1,049*** ± 0,0668
ALD (n = 193)	24,12** ± 0,8523	497,9*** ± 33,06	48,17*** ± 2,139	1,060** ± 0,0738	1,411*** ± 0,1241
Kontroly (n = 69)	18,63 ± 0,7594	163,0 ± 15,13	30,50 ± 1,503	0,8731 ± 0,1329	0,5936 ± 0,0518

ALT – alaninaminotransferáza, AST – aspartátaminotransferáza

Referenční rozmezí: S- Fe (11-26 μmol/l), S-feritin (muži 7-250 μg/l, ženy 9-200 μg/l), saturace transferinu 20-45%, ALT (0,1-0,75 μkat/l), AST (0,1-0,75 μkat/l)

Statistické hladiny významnosti: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001

V souborech nemocných s GH a ALD byly prokázány statisticky významné rozdíly ve všech sledovaných parametrech metabolismu železa v porovnání s kontrolní skupinou. Ve skupině HCV nemocných byl zjištěn statisticky významný rozdíl pouze v hladinách sérového železa, u HBV nemocných nebyly zjištěny signifikantní rozdíly v žádném laboratorním parametru v porovnání se souborem kontrol. Zvýšenou hladinu sérového železa nad 26 μmol/l mělo 22,7% HBV nemocných, 39,2% HCV nemocných a 37,2% nemocných s ALD. Saturaci

transferinu nad 45% mělo 28,1% HBV nemocných, 27,7% HCV nemocných a 45,9% nemocných s ALD. Zvýšenou hladinu sérového feritinu nad 250 µg/l u mužů a nad 200 µg/l u žen mělo 20% HBV nemocných, 35,7% HCV nemocných a 67,4% nemocných s ALD. Zvýšenou saturaci transferinu nebo hladinu feritinu mělo celkem 33,3% nemocných s chronickou hepatitidou B, 43% nemocných s chronickou hepatitidou C a 73,2% nemocných s alkoholovým jaterním poškozením.

V podskupinách nemocných s jaterní cirhózou na podkladě HBV a ALD nebyly zjištěny signifikantní rozdíly v laboratorních parametrech v porovnání s nemocnými bez cirhózy. Rozdíly byly zaznamenány pouze u HCV nemocných, kdy nemocní s cirhózou měli signifikantně zvýšeny všechny parametry metabolismu železa, tedy sérové železo ($p = 0,0150$), sérový feritin ($p = 0,0298$) a saturaci transferinu ($p = 0,0179$). HCV nemocní s cirhózou měli také statisticky významně zvýšeny hladiny transamináz, zejména pak AST ($p < 0,0001$).

Porovnání laboratorních nálezů u jednotlivých jaterních onemocnění ve stadiu cirhózy a bez cirhózy je uvedeno v tabulce 15.

Tab. 15: Porovnání laboratorních parametrů u nemocných s CLD ve stadiu cirhózy a bez cirhózy

	HBV (n = 32)	HBV cirhóza (n = 14)	HCV (n = 73)	HCV cirhóza (n = 35)	ALD (n = 38)	ALD cirhóza (n = 155)
Sérové železo (μmol/l)	20,68 ± 1,419	22,42 ± 1,387 ns	21,97 ± 1,056	27,07 ± 1,878 *	25,78 ± 1,930	23,72 ± 0,9508 ns
Sérový feritin (μg/l)	164,2 ± 43,07	159,2 ± 42,37 ns	232,8 ± 52,15	320,2 ± 52,46 *	618,2 ± 91,59	465,0 ± 34,26 ns
Saturace transferinu (%)	35,38 ± 3,495	36,45 ± 5,851 ns	33,89 ± 2,309	45,43 ± 4,025 *	42,29 ± 4,494	48,09 ± 2,389 ns
ALT (μkat/l)	0,8419 ± 0,1009	0,9614 ± 0,3107 ns	1,118 ± 0,1034	1,286 ± 0,1139 *	1,371 ± 0,2176	0,9836 ± 0,07399 ns
AST (μkat/l)	0,7553 ± 0,08329	1,044 ± 0,2794 ns	0,8899 ± 0,07946	1,381 ± 0,1035 ***	1,425 ± 0,2807	1,408 ± 0,1388 ns

ALT – alaninaminotransferáza, AST – aspartátaminotransferáza

Referenční rozmezí: S- Fe (11-26 μmol/l), S-feritin (muži 7-250 μg/l, ženy 9-200 μg/l), saturace transferinu 20-45%, ALT (0,1-0,75 μkat/l), AST (0,1-0,75 μkat/l)

Statistické hladiny významnosti: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, ns – nesignifikantní rozdíl

5.5.3 Vliv jednotlivých genotypů na laboratorní markery

metabolismu železa u chronických jaterních chorob

Vliv jednotlivých genotypů na laboratorní markery železa a jaterní testy u GH, HBV, HCV a ALD je znázorněn v tabulce 16.

U jedinců s mutací HFE genu byly zjištěny statisticky významné rozdíly v hladinách sérového železa (p < 0,0001) a saturaci transferinu (p < 0,0001) v porovnání s jedinci bez mutací HFE genu. Hladiny sérového železa byly signifikantně vyšší pouze u homozygotů

C282Y ($p < 0,0001$), u složených heterozygotů C282Y/H63D ($p = 0,0047$) a u homozygotů H63D ($p = 0,0011$). Hladiny sérového feritinu byly statisticky významně vyšší u homozygotů C282Y ($p < 0,0001$), u ostatních genotypů nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly v porovnání s jedinci bez mutací HFE genu. Podobně saturace transferinu byla signifikantně vyšší pouze u homozygotů C282Y ($p < 0,0001$) a u homozygotů H63D ($p = 0,0043$).

Tab. 16: Vliv jednotlivých genotypů na laboratorní markery metabolismu železa

	Sérové železo ($\mu\text{mol/l}$)	Sérový feritin ($\mu\text{g/l}$)	Saturace transferinu (%)	ALT ($\mu\text{kat/l}$)	AST ($\mu\text{kat/l}$)
Heterozygot C282Y	26,52 $\pm 2,573$	421,6 $\pm 130,8$	43,51 $\pm 4,871$	1,299 $\pm 0,2690$	1,498 $\pm 0,4388$
Homozygot C282Y	39,49*** $\pm 1,474$	1059*** $\pm 235,4$	83,34*** $\pm 4,201$	0,8963 $\pm 0,133$	0,6921*** $\pm 0,086$
Heterozygot H63D	24,39 $\pm 1,339$	385,3 $\pm 50,00$	45,08 $\pm 3,397$	1,033 $\pm 0,1365$	1,246 $\pm 0,2592$
Homozygot H63D	30,63** $\pm 2,043$	382,9 \pm 78,34	58,12** $\pm 5,479$	1,240 $\pm 0,3551$	0,9464 $\pm 0,1914$
Složený heterozygot C282Y/H63D	30,57** $\pm 2,414$	564,5 $\pm 179,4$	54,12 $\pm 7,356$	0,7164 $\pm 0,1509$	0,7100** $\pm 0,184$
Zdraví jedinci	22,60 $\pm 0,6634$	398,4 $\pm 29,24$	41,60 $\pm 1,720$	1,071 $\pm 0,05469$	1,212 \pm 0,06433
HFE mutace (celkově)	28,61*** $\pm 0,9693$	537,9 $\pm 60,97$	54,47*** $\pm 2,530$	1,034* $\pm 0,09050$	1,105** $\pm 0,1511$

ALT – alaninaminotransferáza, AST – aspartátaminotransferáza

Referenční rozmezí: S- Fe (11-26 $\mu\text{mol/l}$), S-feritin (muži 7-250 $\mu\text{g/l}$, ženy 9-200 $\mu\text{g/l}$), saturace transferinu 20-45%, ALT (0,1-0,75 $\mu\text{kat/l}$), AST (0,1-0,75 $\mu\text{kat/l}$)

Statistické hladiny významnosti: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

5.5.4 Prevalence mutací HFE genu u CLD v závislosti na hladinách markerů metabolismu železa

U HBV nemocných a u nemocných s ALD se zvýšenou saturací transferinu a zvýšenými hladinami feritinu nebylo prokázáno signifikantně vyšší zastoupení mutací HFE genu v porovnání s jedinci s normálními laboratorními markery metabolismu železa i v porovnání s kontrolní skupinou.

U HCV nemocných s normálními parametry metabolismu železa byla frekvence mutace H63D (7,14%) signifikantně nižší v porovnání s podskupinou HCV nemocných se zvýšenými markery metabolismu železa (16,21%, $p = 0,0436$) a kontrolní skupinou (14,97%, $p = 0,0347$). U stejné podskupiny nemocných bylo kromě snížení frekvence mutace H63D zjištěno také statisticky významné snížení prevalence heterozygotů H63D (10,2%), a to opět jak v porovnání s podskupinou HCV nemocných se zvýšenými ukazateli metabolismu železa (27%, $p = 0,0417$), tak oproti kontrolní skupině (26,6%, $p = 0,0116$). Prevalence mutací HFE genu byla u této podskupiny nemocných signifikantně nižší v porovnání se souborem kontrol (18,4% oproti 35,3%, $p = 0,0166$).

Frekvence jednotlivých mutací a zastoupení jednotlivých genotypů v závislosti na hladinách parametrů metabolismu železa jsou uvedeny v tabulkách 17 a 18.

Tab. 17: Frekvence mutací v závislosti na hladinách parametrů metabolismu železa

	HBV		HCV		ALD		Kontroly n = 481
	A n = 12	B n = 24	A n = 37	B n = 49	A n = 139	B n = 51	
C282Y (%)	8,33	2,10	2,70	3,06	1,44	4,90	4,90
H63D (%)	8,33	12,5	16,21 a*	7,14 b*	16,19	17,65	14,97

Vysvětlivky:

A – feritin > 200/250 µg/l, saturace transferinu > 45%

B – feritin < 200/250 µg/l, saturace transferinu < 45%

a – skupina A oproti skupině B

b – podskupina (A nebo B) oproti kontrolní skupině

Statistické hladiny významnosti: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001

Tab. 18: Zastoupení jednotlivých genotypů v závislosti na hladinách parametrů metabolismu železa

	HBV		HCV		ALD		Kontroly n = 481
	A n = 12	B n = 24	A n = 37	B n = 49	A n = 139	B n = 51	
Heterozygot C282Y (%)	16,7	4,2	5,4	6,1	2,9	9,8	6,9
Homozygot C282Y (%)	0	0	0	0	0	0	0
Heterozygot H63D (%)	16,7	16,7	27,0 a*	10,2 b*	23,7	31,4	26,6
Homozygot H63D (%)	0	4,2	2,7	2,0	4,3	2,0	1,7
Složený heterozygot C282Y/H63D (%)	8,3	0	2,7	0	0	0	1,9
Zdraví jedinci (%)	75,0	75,0	67,6	81,6 b*	69,1	56,9	64,7
HFE mutace (celkově) (%)	25,0	25,0	32,4	18,4 b*	30,9	43,1	35,3

Vysvětlivky:

A – feritin > 200/250 µg/l, saturace transferinu > 45%

B – feritin < 200/250 µg/l, saturace transferinu < 45%

a – skupina A oproti skupině B

b – podskupina (A nebo B) oproti kontrolní skupině

Statistické hladiny významnosti: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001

5.6 DISKUSE

Nejvyšší prevalence mutací HFE genu byla podle očekávání prokázána u nemocných s GH. Frekvence alely C282Y a mutace C282Y v heterozygotní i homozygotní formě byla u těchto nemocných signifikantně zvýšena. Přestože jsme v našem souboru s GH identifikovali 60% homozygotů, je tento počet menší než v sousedních středoevropských zemích, kde mutace C282Y v homozygotní formě byla zastoupena u více než 80% nemocných [Merryweather-Clarke 2000, Beutler 2001]. Větším překvapením je však vysoké zastoupení homozygotů H63D ve srovnání s jinými evropskými populacemi [Merryweather-Clarke 2000, Beutler 2001, Samarasena 2006, Remacha 2006], v našem souboru tvořili 12,7% nemocných s GH. Navíc při analýze vlivu přítomnosti HFE mutací na parametry metabolismu železa jsme zjistili, že homozygoti H63D se značně podíleli na zvýšení laboratorních markerů zásob železa a ve 42% případech měli fenotyp hemochromatózy.

Úloha mutací HFE genu v patogenezi akumulace železa u chronických jaterních onemocnění je široce diskutována. Řada studií se zabývala vlivem přítomnosti zejména mutace C282Y v heterozygotní formě na vstřebávání železa, na zvýšení jaterní koncentrace železa a v konečném důsledku na progresi jaterního poškození, a to zprostředkovaně zvýšenou absorpcí železa ve střevě a indukci oxidačního stresu [Bonkovsky 2003, Sebastiani 2007, Harrison-Findik 2007, Wallace 2009]. Tato souvislost byla jednoznačně potvrzena u nemocných s PCT [Bonkovsky 2003, Sebastiani 2007, Wallace 2009]. U nemocných s chronickými virovými hepatitidami a alkoholovým jaterním poškozením jsou výsledky studií velmi různorodé. V naší studii jsme neprokázali zvýšenou prevalenci mutací HFE genu u nemocných s HBV, HCV a ALD. Nezaznamenali jsme statisticky významné rozdíly v prevalenci mutací ani mezi jednotlivými skupinami, ani v porovnání v kontrolní skupinou.

Z našich výsledků dále vyplývá, že výskyt mutací HFE genu neměl vliv na parametry metabolismu železa u HBV nemocných. Přestože 33,3% HBV nemocných mělo zvýšenou saturaci transferinu nebo zvýšený sérový feritin, neměly tyto odchylky vztah k jednotlivým genotypům. Podobně Martinelli a spol. neprokázali rozdíly v prevalenci mutací C282Y a H63D mezi HBV nemocnými a běžnou populací, v případě výskytu některé mutace pak bez vlivu na přetížení železem u HBV nemocných [Martinelli 2004]. V některých pracích naopak pozorovali vztah přítomnosti mutace H63D k pokročilejšímu stupni jaterní fibrózy a k progresi do jaterní cirhózy u HBV nemocných [Mah 2005, Ghaziani 2007]. Piperno a spol. zjistili zvýšené zásoby železa v játrech pouze u heterozygotů C282Y mužského pohlaví a souvislost přetížení železem s přítomností mutace H63D [Piperno 1998].

Ve skupině HCV nemocných jsme u 43% nemocných zjistili zvýšenou saturaci transferinu nebo zvýšený sérový feritin. V podskupině nemocných s cirhózou jsme zaznamenali signifikantně vyšší hladiny všech parametrů metabolismu železa v porovnání s podskupinou bez cirhózy. Zvýšení markerů železa v séru však nekorelovalo se zvýšením výskytu mutací HFE genu, výskyt mutací byl srovnatelný s běžnou populací. Z další analýzy HCV nemocných vyplývají nižší frekvence mutace H63D a mutace H63D v heterozygotní formě v porovnání s kontrolní skupinou, tento rozdíl však nebyl statisticky významný. Signifikantní snížení jsme ale pozorovali u HCV nemocných s normálními laboratorními markery železa, a to ve srovnání s podskupinou HCV nemocných se známkami přetížení železem a oproti kontrolní skupině. V prevalenci homozygotů H63D a ostatních genotypů jsme nenalezli signifikantní rozdíly. Zdá se tedy pravděpodobné, že výskyt mutace H63D u HCV jedinců s přetížením železem není vyšší než v běžné populaci. Celkově byla prevalence mutací HFE genu u HCV nemocných signifikantně nižší v porovnání s kontrolní skupinou, s hlavním podílem podskupiny jedinců s normálními markery železa v séru.

V řadě zahraničních studií byl analyzován výskyt mutací HFE genu u chronické hepatitidy C a jejich vliv na parametry metabolismu železa, výsledky studií jsou však značně kontroverzní. V několika studiích byla prokázána zvýšená prevalence mutací HFE genu ve vztahu k běžné populaci [Bonkovsky 2002, Kazemi-Shirazi 1999, Smith 1998]. V jiných studiích nebyl prokázán zvýšený výskyt mutací, avšak u jedinců s mutací byly zjištěny zvýšené laboratorní markery železa v séru a přítomnost mutace C282Y v heterozygotní formě byla nezávislým rizikovým faktorem progresu jaterního poškození [Erhardt 2003, Gehrke 2003, Geier 2004, Pacal 2007]. Ve výsledcích dalších prací nebyl zaznamenán vyšší výskyt mutací HFE genu v porovnání s kontrolní skupinou, u jedinců s mutací C282Y a H63D nebyly zjištěny známky přetížení železem [Distante 2002, Hézode 1999, Negro 2000, Sikorska 2005, Thorburn 2002].

U alkoholového jaterního poškození se alkohol a železo vyznačují synergickým účinkem na indukci oxidačního stresu. Tato souvislost vedla řadu autorů k analýze úlohy mutací HFE genu, a to zvláště mutace C282Y v heterozygotní formě, na patogenezi zvýšené akumulace železa u ALD. Většina studií však neprokázala vztah mezi přítomností mutace HFE genu a alkoholovým jaterním poškozením, ani na progresi jaterního poškození u ALD [Gleeson 2006, Grove 1998, Lauret 2002, Robinson 2007]. V malém počtu studií byla u nemocných s ALD významně zvýšená frekvence mutace H63D [Machado 2009, Starcevic 2006]. Naše výsledky ukazují, že nemocní s ALD měli zvýšené laboratorní markery metabolismu železa, a to bez souvislosti s přítomností jaterní cirhózy. Zvýšenou saturaci transferinu nebo hladinu feritinu mělo 73,2% nemocných s ALD. V závislosti na hodnotách parametrů železa jsme nepozorovali zvýšený výskyt mutací HFE genu v žádné podskupině. Je tedy zřejmé, že mutace HFE genu nemají vztah k alkoholovému jaternímu poškození.

Součástí naší studie byla také analýza výskytu mutace Y250X v TfR2 genu, který kóduje transferinový receptor 2. V našem souboru nemocných s CLD jsme neprokázali žádného jedince s mutací Y250X. Tento výsledek nepodporuje představu o vztahu mutací v TfR2 genu ke studovaným chronickým jaterním onemocněním.

Z těchto výsledků je zřejmé, že v patogenezi akumulace železa u CLD se mohou podílet jiné molekuly či faktory. Na molekulární úrovni (na úrovni mRNA) byla analyzována exprese řady transportérů pro železo v játrech, např. feroportinu, transferinových receptorů TfR1 a TfR2 a centrálního regulátoru metabolismu železa – hepcidinu. U HCV nemocných byla prokázána signifikantně zvýšená exprese TfR2 a feroportinu v játrech v porovnání s HBV nemocnými [Takeo 2005] a korelace exprese TfR2 s koncentrací železa v játrech [Mifuji 2006]. Fujita a spol. zjistili u HCV nemocných signifikantně nižší expresi hepcidinu na úrovni mRNA [Fujita 2007]. Hepcidin by tak mohl hrát klíčovou roli v patogenezi akumulace železa u HCV nemocných. V jiné studii však byla regulace hepcidinu zásobami železa zachována [Aoki 2005].

Úloha hepcidinu je studována také u alkoholového jaterního poškození [Harrison-Findik 2009]. Na zvířecích modelech bylo zjištěno, že alkohol snižuje expresi hepcidinu. Snížená exprese hepcidinu pak způsobuje zvýšenou expresi DMT1 a feroportinu a následně zvýšené vstřebávání železa v duodenu. Bylo prokázáno, že alkohol ovlivňuje expresi hepcidinu snížením aktivity promotoru a snížením aktivity transkripčního faktoru C/EBP α [Bridle 2006, Harrison-Findik 2006].

6 ZÁVĚR

V našich studiích jsme zjistili jaká je prevalence jednotlivých mutací HFE genu (C282Y, H63D, S65C), mutace TfR2 genu a současně změny metabolismu železa u vybraných kožních a chronických jaterních onemocnění.

Ve studii zabývající se výskytem mutací HFE genu u nemocných s PCT jsme prokázali vysoké zastoupení jedinců s mutací HFE genu. Mutaci v HFE genu jsme prokázali u téměř 70% nemocných s PCT. Prevalence majoritní mutace C282Y a minoritní mutace H63D byly signifikantně zvýšeny v porovnání s kontrolní skupinou. Překvapivým nálezem je vysoké zastoupení heterozygotů H63D (41,3%), které dosud nebylo popsáno v jiných evropských zemích. Akumulace železa byla nejvíce vyjádřena u homozygotů C282Y, neboť zejména saturace transferinu byla signifikantně vyšší v porovnání se všemi ostatními genotypy. Dá se tedy doporučit, aby stanovení mutací HFE genu bylo standardním vyšetřením u nemocných s PCT v České republice, neboť včasnou identifikací rizikových jedinců lze jistě předejít nežádoucímu přetížení železem u těchto nemocných. U nemocných s PCT jsme analyzovali i přítomnost druhého nejvýznamnějšího rizikového faktoru v patogenezi akumulace železa, a to infekci virem hepatitidy C. Infekci virem hepatitidy C jsme prokázali pouze u 7,9% nemocných s PCT. Nízký výskyt chronické hepatitidy C ve vyšetřené skupině na rozdíl od jihoevropských zemí nnesvědčí pro významnější úlohu tohoto faktoru v etiopatogenezi PCT v české populaci.

Ve studii zabývající se Dupuytrenovou nemocí (DD) jsme analyzovali pouze mutace C282Y a H63D. U nemocných s DD jsme neprokázali zvýšený výskyt mutací HFE genu ani zvýšené parametry metabolismu železa. Tyto nálezy nepotvrdily naší hypotézu o úloze zvýšené akumulace železa v rozvoji Dupuytrenovy nemoci.

V naší populaci hrají v etiopatogenezi Dupuytrenovy nemoci roli faktory životního stylu s vysokým zastoupením nadměrné konzumace alkoholu a z toho rezultující chronické jaterní léze, a dále opakovaná mikrotraumata ruky.

U chronických virových hepatitid a alkoholového jaterního poškození jsme se pokusili objasnit vztah přítomnosti mutací HFE genu k přetížením železem. Přestože jsme u řady nemocných zjistili zvýšené markery železa v séru, neměly tyto odchylky souvislost s výskytem mutací HFE genu. U nemocných s jaterním onemocněním ve stadiu cirhózy nebyl výskyt mutací HFE genu odlišný v porovnání s jedinci bez cirhózy či s kontrolní skupinou.

Z důvodu nejednoznačných závěrů o vztahu mutací HFE genu k akumulaci železa u chronických jaterních onemocnění byl výzkum v posledních letech soustředěn na analýzu jiných faktorů a molekul, uplatňujících se v patogenezi přetížení železem. Pozornost je soustředěna zejména na klíčový regulátor homeostázy železa, kterým je peptid hepcidin. Snížená exprese hepcidinu s následným zvýšeným vstřebáváním železa transportéry DMT1 a feroportinem v duodenální sliznici by vysvětlovala nežádoucí přetížení železem u nemocných s chronickými jaterními onemocněními. Kromě hepcidinu si další pozornost zaslouží i jiné molekuly a transportéry, mezi něž patří např. TfR2 a feroportin. K objasnění přesných mechanismů vedoucích k přetížení železem je jistě zapotřebí dalších studií a budou předmětem dalšího výzkumu.

7 LITERATURA

ANDĚL, M., ANDĚL, K., ARENBERGER, P., et al. Diabetes mellitus. Galén, Praha, 2001, s. 55.

AOKI, CA., ROSSARO, L., RAMSAMOOJ, R., et al. Liver hepcidin mRNA correlates with iron stores, but not inflammation, in patients with chronic hepatitis C. *J. Clin. Gastroenterol.*, 2005, 39, p. 71-74.

ASBERG, A., THORSTENSEN, K., HVEEM, K., et al. Hereditary hemochromatosis: the clinical significance of the S65C mutation. *Genet. Test.*, 2002, 6, p. 59-62.

AXFORD, JS. Rheumatic manifestation of haemochromatosis. *Baillière`s Clin. Rheumatol.*, 1991, 5 (2), p. 351-365.

BARTON, JC., SAWADA-HIRAI, R., ROTHENBERG, BE., ACTON, RT. Two novel missense mutations of the HFE-gene (I105T and G93R) and identification of the S65C mutation in Alabama hemochromatosis probands. *Blood Cells Mol. Dis.*, 1999, 25 (3-4), p. 146-154.

BAYAT, A., STANLEY, JK., WATSON, JS. Genetic susceptibility to Dupuytren´s disease. Transforming growth factor beta receptor gene polymorphisms and Dupuytren´s disease. *Br. J. Plast. Surg.*, 2003, 56, p.328-333

BEUTLER, E., FELITTI, V., GELBART, T., et al. Genetics of iron storage and hemochromatosis. *Drug Metab. Dispos.*, 2001, 29, p. 495-499.

BONKOVSKY, HL., POH-FITZPATRICK, M., PIMSTONE, N., et al. Porphyrinuria cutanea tarda, hepatitis C, and HFE genes mutations in North America. *Hepatology*, 1998, 27, p. 1661-1669.

BONKOVSKY, HL., TROY, N., McNEAL, K., et al. Iron and HFE or Tfr1 mutations as comorbid factors for development and progression of chronic hepatitis C. *J. Hepatol.*, 2002, 37, p. 848-854.

BONKOVSKY, HL., LAMBRECHT, RW., SHAN, Y. Iron as co-morbid factor in nonhemochromatotic liver disease. *Alcohol*, 2003, 30, p. 137-144.

BRIDLE, K., CHEUNG, TK., MURPHY, T. et al. Hepcidin is down-regulated in alcoholic liver injury: implications for the pathogenesis of alcoholic liver disease. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 2006, 30, p. 106-112.

BROCK, JH., HALLIDAY, JW, PIPPARD, MJ, POWELL, LW. Iron Metabolism in Health and Disease. *Saunders, London*, 1994, p. 311-341.

BULAJ, ZJ., PHILLIPS, JD., AJIOKA, RS., et al. Hemochromatosis genes and other factors contributing to the pathogenesis of porphyria cutanea tarda. *Blood*, 2000, 95, p.1565-1571.

BYRNES, V., BARRETT, S., RYAN, E., et al. Increased duodenal DMT-1 expression and unchanged HFE mRNA levels in HFE- associated hereditary hemochromatosis and iron deficiency. *Blood Cells Mol. Dis.*, 2002, 29(3), p. 251-260.

CAIRO, G., RECALCATI, S. Iron-regulatory proteins: molecular biology and pathophysiological implications. *Expert Rev. Mol. Med.*, 2007, p.1-13.

CAMASCHELLA, C., ROETTO, A., CALI, A., et al. The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. *Nat. Genet.*, 2000, 25 (1), p. 14-15.

CIMBUROVA, M., PUTOVA, I., PROVAZNIKOVA, H., HORAK, J. Hereditary hemochromatosis – the detection of C282Y and H63D mutations in HFE genes by means of Guthrie cards in population of Czech Republic. *Genet. Epidemiol.*, 2002, 23, p.1-5.

CIMBUROVA, M., PUTOVA, I., PROVAZNIKOVA, H., PINTEROVA, D., HORAK, J. S65C and other mutations in the haemochromatosis gene in the Czech population. *Folia Biol.*, 2005, 51, p. 172-176.

DE GOBBI, M., ROETTO, A., PIPERNO, A. Natural history of juvenile haemochromatosis. *Brit. J. Haemat.*, 2002, 117, p. 973-979.

DEREURE, O., AGUILAR-MARTINEZ, P., BESSIS, D., et al. HFE mutations and transferrin receptor polymorphism analysis in porphyria cutanea tarda: a prospective study of 36 cases from southern France. *Br. J. Dermatol.*, 2001, 144, p. 533-539.

DE SALAMANCA, RE., MORALES, P., CASTRO, MJ., et al. The most frequent HFE allele linked to porphyria cutanea tarda in mediterraneans is His63Asp. *Hepatology*, 1999, 30, p.819-820.

DI BISCEGLIE, A., AXIOTIS, CA., HOOFNAGLE, JH., et al. Measurement of iron status in patients with chronic hepatitis. *Gastroenterology*, 1992, 102, p. 2108-2113.

DISTANTE, S., BJORO, K., HELLMUM, KB., et al. Raised serum ferritin predicts non-response to interferon and ribavirin treatment in patients with chronic hepatitis C infection. *Liver*, 2002, 22, p. 269-275.

EQUITANI, F., FERNÁNDEZ-REAL, JM., MENICHELLA, G., et al. Bloodletting ameliorates insulin sensitivity and secretion in parallel to reducing liver iron in carriers of HFE-gene mutations. *Diabetes Care*, 2008, 31 (1), p. 3-8.

ERHARDT, A., MASCHNER-OLBERG, A., MELLENTHIN, C., et al. HFE mutations and chronic hepatitis C: H63D and C282Y heterozygosity are independent risk factors for liver fibrosis and cirrhosis. *J. Hepatol.*, 2003, 38, p. 335-342.

FABRIS, C., TONIUTTO, P., SCOTT, CA., et al. Serum iron indices as a measure of iron deposits in chronic hepatitis C. *Clin. Chim. Acta*, 2001, 304, p. 49-55.

FEDER, JN., GNIRKE, A., THOMAS, W., et al. A novel MHC class I-like is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat. Genet.*, 1996, 13 (4), p. 399-408.

FERNÁNDEZ-REAL, JM., PEÑARROJA, G., CASTRO, A., et al. Blood letting in high-ferritin type 2 diabetes: effects on insulin sensitivity and beta-cell function. *Diabetes*, 2002, 51 (4), p. 1000-1004.

FLETCHER, LM., DIXON, JL., PURDIE, DM., et al. Excess alcohol greatly increases the prevalence of cirrhosis in hereditary hemochromatosis. *Gastroenterology*, 2002, 122, p. 281-289.

FONG, TL., HAN, SH., TSAI, NC., et al. A pilot randomized, controlled trial of the effect of iron depletion on long-term response to alpha-interferon in patients with chronic hepatitis C. *J. Hepatol.*, 1998, 28, p. 369-374.

FONTANA, RJ., ISRAEL, J., LE CLAIR, P., et al. Iron reduction before and during interferon therapy of chronic hepatitis C: results of a multicenter, randomized, controlled trial. *Hepatology*, 2000, 31, p. 730-736.

FRACANZANI, AL., CONTE, D., FRAQUELLI, E., et al. Increased cancer risk in a cohort of 230 patients with hereditary hemochromatosis in comparison to matched control patients with non-iron-related chronic liver disease. *Hepatology*, 33, 2001, p. 647-651.

FRANK, J., POBLETE-GUTIERREZ, P., WEISKIRCHEN, R., et al. Hemochromatosis gene sequence deviations in German patients with porphyria cutanea tarda. *Physiol.Res.*, 2006, 55, p.S75-S83.

FUJITA, N., SUGIMOTO, R., TAKEO, M., et al. Hcpidin expression in the liver: relatively low level in patients with chronic hepatitis C. *Mol. Med.*, 2007, 13, p. 97-104.

FUJITA, N., SUGIMOTO, R., URAWA, N., et al. Hepatic iron accumulation is associated with disease progression and resistance to interferon/ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2007, 22, p.1886-1893.

GANZ, T. Hepcidin and its role in regulating systemic iron metabolism. *Hematology*, 2006, p. 29-35.

GEHRKE, SG., STREMMEL, W., MATHES, I., et al. Hemochromatosis and transferrin receptor gene polymorphisms in chronic hepatitis C: impact on iron status, liver injury and HCV genotype. *J. Mol. Med.*, 2003, 81, p. 780-787.

GEIER, A., REUGELS, M., WEISKIRCHEN, R., et al. Common heterozygous hemochromatosis gene mutations are risk factors for inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. *Liver Int.*, 2004, 24, p. 285-294.

GHAZIANI, T., ALAVIAN, SM., ZALI, MR., et al. Serum measures of iron status and HFE gene mutations with hepatitis B virus infection. *Hepatol. Res.*, 2007, 37, p. 172-178.

GISBERT, JP., GARCIA-BUEY, L., PAJARES, JM., et al. Prevalence of hepatitis C virus infection in porphyria cutanea tarda: systematic review and meta-analysis. *J. Hepatol.*, 2003, 39, p. 620-627.

GLEESON, D., EVANS, S., BRADLEY, M., et al. HFE genotypes in decompensated alcoholic liver disease: phenotypic expression and comparison with heavy drinking and with normal controls. *Am. J. Gastroenterol.*, 2006, 101, p. 304-310.

GODTFREDSSEN, NS., LUCHT, H., PRESCOTT, E. A prospective study linked both alcohol and tobacco to Dupuytren's disease. *J. Clin. Epid.*, 2004, 57, p. 858-863.

GONZALEZ-HEVILLA, M., DE SALAMANCA, RE., MORALES, P., et al. Human leukocyte antigen haplotypes and HFE mutations in Spanish hereditary hemochromatosis and sporadic porphyria cutanea tarda. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2005, 20, p. 456-462.

GROVE, J., DALY, AK., BURT, AD., et al. Heterozygotes for HFE mutations have no increased risk of advanced alcoholic liver disease. *Gut*, 1998, 43, p. 262-266.

GUDMUNDSSON, KG., ARNGRIMSSON, R., SIGFUSSON, N. et al. Epidemiology of Dupuytren's disease: clinical, serological, and social assessment. The Reykjavik study. *J. Clin. Epidemiol.*, 2000, 53, p. 291-296.

GUDMUNDSSON, KG., ARNGRIMSSON, R., JONSSON, T. Dupuytren's disease, alcohol consumption and alcoholism. *Scand. J. Prim. Health Care*, 2001, 19, p. 186-190.

HARPER, P., FLODERUS, Y., HOLMSTROM, P., et al. Enrichment of HFE mutations in Swedish patients with familial and sporadic form of porphyria cutanea tarda. *J. Intern. Med.*, 2004, 255, p. 684-688.

HARRISON-FINDIK, DD., SCHAFER, D., KLEIN, E., et al. Alcohol metabolism-mediated oxidative stress down-regulates hepcidin transcription and leads to increased duodenal iron transporter expression. *J. Biol. Chem.*, 2006, 281, p. 22974-22982.

HARRISON-FINDIK, DD. Role of alcohol in the regulation of iron metabolism. *World J. Gastroenterol.*, 2007, 13(37), p. 4925-4930.

HARRISON-FINDIK, DD. Is the iron regulatory hormone hepcidin a risk factor for alcoholic liver disease? *World J. Gastroenterol.*, 2009, 15, p. 1186-1193.

HART, MG., HOOPER, G. Clinical associations of Dupuytren's disease. *Postgrad.Med.J.*, 2005, 81, p. 425-428.

HAYASHI, H., TAKIKAWA, T., NISHIMURA, N., et al. Serum aminotransferase levels as an indicator of the effectiveness of venesection for chronic hepatitis C. *J. Hepatol.*, 1995, 22, p. 268-271.

HEMPENIUS, LM., VAN DAM, PS., MARX, JJ., KOPPESCHAAR, HP. Mineralocorticoid status and endocrine dysfunction in severe hemochromatosis. *J. Endocrinol. Invest.*, 1999, 22 (5), p. 369-376.

HERRERA, JL. Iron depletion is not effective in inducing a virologic response in patients with chronic hepatitis C who failed to respond to Interferon therapy. *Am. J. Gastroenterol.*, 1999, 94, p. 3571-3575.

HÉZODE, C., CAZENEUVE, C., COUE, O., et al. Liver iron accumulation in patients with chronic active hepatitis C: prevalence and role of hemochromatosis gene mutations and relationship with hepatic histological lesions. *J. Hepatol.*, 1999, 31, p. 979-984.

HOFER, H., OSTERREICHER, C., JESSNER, W., et al. Hepatic iron concentration does not predict response to standard and pegylated-IFN/ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C. *J. Hepatol.*, 2004, 40, p. 1018-1022.

HORÁK, J. a kol. Hemochromatóza. Praha: Grada Publishing, 2010.

HU, FZ., NYSTROM, A., AHMED, A., PALMQUIST, M., et al. Mapping of an autosomal dominant gene for Dupuytren's contracture to chromosome 16q in a Swedish family. *Clin. Genet.*, 2005, 68, p. 424-429.

HUDEC, M., GRIGEROVA, M., WALSH, CH. Secondary hypothyroidism in hereditary hemochromatosis: recovery after iron depletion. *Thyroid*, 2008, 18 (2), p. 1-3.

IOANNOU, GN., TUNG, BY., KOWDLEY, KV. Iron in chronic hepatitis C: villain or innocent bystander? *Sem. Gastrointest. Dis.*, 2002, 13, p. 95-108.

IVANOVA, A., VON AHSEN, N., ADJAROV, D., et al. C282Y and H63D mutations in the HFE gene are not associated with porphyria cutanea tarda in Bulgaria. *Hepatology*, 1999, 30, p. 1531-1532.

JAMES, DS., GROTHAUS, PC. Dupuytren's disease: an overview. *Plast. Reconstruct. Surgery.*, 2000, p. 125-127.

KAKIZAKI, S., TAKAGI, H., HORIGUCHI, N., et al. Iron enhances hepatitis C virus replication in cultured human hepatocytes. *Liver*, 2000, 20, p. 125-128.

KATO, J., MIYANISHI, K., KOBUNE., M., et al. Long-term phlebotomy with low-iron diet therapy lowers risk of development of hepatocellular carcinoma from chronic hepatitis C. *J. Gastroenterol.*, 2007, 42, p. 830-836.

KAWAMURA, Y., AKUTA, N., SEZAKI, H., et al. Determinants of serum ALT normalization after phlebotomy in patients with chronic hepatitis C infection. *J. Gastroenterol.*, 2005, 40, p. 901- 906.

KAZEMI-SHIRAZI, L., DATZ, C., MAIER-DOBERSBERGER, T., et al. The relation of iron status and hemochromatosis gene mutations in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology*, 1999, 116, p. 127-134.

KOHGO, Y., OHTAKE, T., IKUTA, K., et al. Iron accumulation in alcoholic liver disease. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 2005, 29, p. 189S-193S.

KREJČA, M. Dupuytrenova nemoc. *Postgrad.Med.*, 2007, 9 (7), s.755-759.

LAURET, E., RODRIGUEZ, M., GONZALEZ, S., et al. HFE-gene mutations in alcoholic and virus-related cirrhotic patients with hepatocellular carcinoma. *Am. J. Gastroenterol.*, 2002, 97, p. 1016-1021.

LE GAC, G., DUPRADEAU, FY., MURA, C., et al. Phenotypic expression of the C282Y/Q283P compound heterozygosity in HFE and molecular modeling of the Q283P mutation effect. *Blood Cells Mol. Dis.*, 2003, 30 (3), p. 231-237.

LUCOTTE, G. Frequency analysis and allele map in favor of the Celtic origin of the C282Y mutation of hemochromatosis. *Blood Cells Mol. Dis.*, 2001, 27, p. 549-556.

MAH, YH., KAO, JH, LIU, CJ., et al. Prevalence and clinical implications of HFE gene mutations (C282Y and H63D) in patients with chronic hepatitis B and C in Taiwan. *Liver Int.*, 2005, 25, p. 214-219.

MACHADO, MV., RAVASCO, P., MARTINS, A., et al. Iron homeostasis and H63D mutations in alcoholics with and without liver disease. *World J. Gastroenterol.*, 2009, 15, p. 106-111.

MALINA, L., ARENBERGER, P., KRACIKOVA, J. [The frequency of viral hepatitis C in patients with porphyria cutanea tarda]. *Cas.Lek.Cesk.*, 1994, 133, p. 599-601.

MALINA, L., ZDARSKY, E., DANDOVA, S., et al. [Significance and prevalence of the C282Y gene mutation of primary hemochromatosis in the pathogenesis of porphyria cutanea tarda] *Cas. Lek. Ces.*, 2000, 139(23), p. 728-730.

MALINA, L., ZDARSKY, E., STRANSKY, J. et al. Are hepatitis C infection and C282Y mutation in hemochromatosis gene independent factors for Porphyria cutanea tarda? *Dermatology*, 2002, 205, p. 76-77.

MARTINELLI, AL., FILHO, AB., FRANCO, RF., et al. Liver iron deposits in hepatitis B patients: association with severity of liver disease but not with hemochromatosis gene mutations. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2004, 19, p. 1036-1041.

MERRYWEATHER-CLARKE, AT., POINTON, JJ., SHEARMAN, JD., ROBSON, KJH. Global prevalence of putative haemochromatosis mutations. *J. Med. Gen.*, 1997, 34, p. 275-278.

MERRYWEATHER-CLARKE, AT., POINTON, JJ., JOUANOLLE, AM., et al. Geography of HFE C282Y and H63D mutations. *Genet. Test.*, 2000, 4 (2), p. 183-198.

MIFUJI, R., KOBAYASHI, Y., MA, N., et al. Role of transferrin receptor 2 in hepatic accumulation of iron in patients with chronic hepatitis C. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2006, 21, p. 144-151.

MIKKELSEN, OA., HOYERAAL, HM., SANDVIK, L. Increased mortality in Dupuytren's disease. *J. Hand Surg.*, 1999, 24 (5), p. 515-518.

MURA, C., RAGUENES, O, FEREC, C. HFE mutations analysis in 711 hemochromatosis probands: evidence for S65C implication in mild form of hemochromatosis. *Blood*, 1999, 93 (8), p. 2502-2505.

NAGY, Z., KOSZO, F., PAR, A., et al. Hemochromatosis (HFE) gene mutations and hepatitis C virus infection as risk factor for porphyria cutanea tarda in Hungarian patients. *Liver Int.*, 2004, 24, p. 16-20.

NEGRO, F., SAMII, K., RUBBIA-BRANDT, L., et al. Hemochromatosis gene mutations in chronic hepatitis C patients with and without liver siderosis. *J. Med. Virol.*, 2000, 60, p. 21-27.

NEMETH, E., VALORE, EV., TERRITO, M., et al. Heparin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood*, 2003, 101 (7), p. 2461-2463.

NEMETH, E., RIVERA, S., GABAYAN, V., et al. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J. Clin. Invest.*, 2004, 113 (9), p. 1271-1276.

NICOLAS, G., BENNOUN, M., PORTEU, A. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99 (7), p. 4596-4601.

NICOLAS, G., CHAUVET, C., VIATTE, L., et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J. Clin. Invest.*, 2002, 110 (7), p. 1037-1044.

NIETO, N., FRIEDMAN, SL., CEDERBAUM, AI. Stimulation and proliferation of primary rat hepatic stellate cells by cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species. *Hepatology*, 2002, 35, p. 62-73.

PACAL, L., HUSA, P., ZNOJIL, V., et al. HFE C282Y gene variant is a risk factor for the progression to decompensated liver disease in chronic viral hepatitis C subjects in the Czech population. *Hepatol. Res.*, 2007, 37, p. 740-747.

PARK, CH., VALORE, EV., WARING, AJ., GANZ, T. Heparin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276 (11), p. 7806-7810.

PHILPOTT, CC. Molecular aspects of iron absorption: Insights into the role of HFE in hemochromatosis. *Hematology*, 2002, 35 (5), p. 993-1001.

PIANKO, S., McHUTCHISON, JG., GORDON, SC., et al. Hepatic iron concentration does not influence response to therapy with interferon plus ribavirin in chronic HCV infection. *J. Interf. Cytokine Res.*, 2002, 22, p. 483-489.

PIETRANGELO, A. Iron, oxidative stress and liver fibrogenesis. *J. Hepatol.*, 1998, 28, p. 8-13.

PIETRANGELO, A. The ferroportin disease. *Blood Cells Mol. Dis.*, 2004, 32 (1), p. 131-138.

PIPERNO, A., SAMPIETRO, M., D'ALBA, R., et al. Iron stores, response to alpha-interferon therapy, and effects of iron depletion in chronic hepatitis C. *Liver*, 1996, 16, p. 248-254.

PIPERNO, A., VERGANI, A., MALOSIO, I., et al. Hepatic iron overload in patients with chronic viral hepatitis: role of HFE-gene mutations. *Hepatology*, 1998, 28, p. 1105-1109.

POWELL, LW., SUBRAMANIAM, VN., YAPP, TR. Haemochromatosis in the new millennium. *J. Hepatol.*, 2000, 32 (S1), p. 48-62.

RAMM, GA., RUDELLE, RG. Hepatotoxicity of iron overload: mechanisms of iron induced hepatic fibrogenesis. *Semin. Liver Dis.*, 2005, 25, p. 433-449.

REMACHA, AF., SARDA, MP., BARCELO, MJ., et al. Genotype-phenotype correlation in a Spanish population homozygous for the H63D mutation of the HFE gene. *Ann. Hematol.*, 2006, 85, p. 340-342.

RIGAMONTI, C., ANDORNO, S., MADULI, E., et al. Iron, hepatic stellate cells and fibrosis in chronic hepatitis C. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2002, 32, p. 28-35.

RIGGIO, O., MONTAGNESE, F., FIORE, P., et al. Iron overload in patients with chronic viral hepatitis: how common is it? *Amer. J. Gastroenterol.*, 1997, 92, p. 1298-1301.

ROBERTS, AG., WHATLEY, SD., MORGAN, RR., et al. Increased frequency of the haemochromatosis Cys282Tyr mutation in sporadic porphyria cutanea tarda. *Lancet*, 1997, 349, p. 321-323.

ROBINSON, G., NARASIMHAN, S., WEATHERALL, M., et al. Hemochromatosis gene mutations, liver function test and iron status in alcohol-dependent patients admitted for detoxification. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2007, 22, p. 852-854.

ROETTO, A., TOTARO, A., CAZZOLA, M., et al. Juvenile hemochromatosis locus maps to chromosome 1q. *Am. J. Hum. Genetics*, 1999, 64 (5), p. 1388-1393.

ROETTO, A., DARAIO, F., ALBERTI, F., et al. Hemochromatosis due to mutations in transferrin receptor 2. *Blood Cells Mol. Dis.*, 2002, 29 (3), p. 465-470.

ROLFS, A., BONKOVSKY, HL., KOHLROSER, JG., et al. Intestinal expression of genes involved in iron absorption in humans. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2002, 282 (4), p. G598-607.

SAMARASENA, J., WINSOR, W., LUSH, R., et al. Individuals homozygous for the H63D mutation have significantly elevated iron indexes. *Dig. Dis. Sci.*, 2006, 51, p. 803-807.

SAMPIETRO, M., PIPERNO, A., LUPICA, L., et al. High prevalence of the His63Asp HFE mutation in Italian patients with porphyria cutanea tarda. *Hepatology*, 1998, 27, p. 181-184.

SARTORI, M., ANDORNO, S., LA TERRA, G., et al. Evaluation of iron status in patients with chronic hepatitis C. *Ital. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 1998, 30, p. 396-401.

SARTORI, M., ANDORNO, S., RIGAMONTI, C., BOLDORINI R. Chronic hepatitis C treated with phlebotomy alone: biochemical and histological outcome. *Dig. Liver Dis.*, 2001, 33, p. 157-162.

SEBASTIANI, G., WALKER, AP. HFE-gene in primary and secondary hepatic iron overload. *World J. Gastroenterol.*, 2007, 13 (35), p. 4673-4689.

SEDLÁČKOVÁ, T., RACEK, J. Metabolismus železa a jeho regulace. *Klin. Biochem. Metab.*, 2009, 17 (38), s. 17-23.

SHERRINGTON, J., OLYNYK, JK. Iron as a cofactor in chronic hepatitis C infection. *Liver*, 2002, 22, p. 187-189.

SIKORSKA, K., BIELAWSKI, KP., STALKE, P., et al. HFE gene mutations in Polish patients with disturbances of iron metabolism: an initial assessment. *Int. J. Mol. Med.*, 2005, 16, p. 1151-1156.

SILVA, ISS., PEREZ, RM., OLIVEIRA, PV., et al. Iron overload in patients with chronic hepatitis C virus infection: clinical and histological study. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2005, 20, p. 243-248.

SKOWRON, F., BERARD, F., GREZARD, P., et al. [Role of the hemochromatosis gene in porphyria cutanea tarda. Prospective study of 56 cases]. *Ann. Dermatol. Venereol.*, 2001, 128, p. 600-604.

SMITH, BC., GORVE, J., GUZAIL, MA., et al. Heterozygosity for hereditary hemochromatosis is associated with more fibrosis in chronic hepatitis C. *Hematology*, 1998, 27, p. 1695-1699.

STARCEVIC, CN, STEPEC, S., RISTIC, S., et al. Hemochromatosis gene mutations in patients with alcoholic cirrhosis. *Clin. Genet.*, 2006, 70, p. 257-259.

STUART, KA., BUSFIELD, F., JAZWINSKA, EC., et al. The C282Y mutation in the haemochromatosis gene (HFE) and hepatitis C virus infection are independent cofactors for porphyria cutanea tarda in Australian patients. *J. Hepatol.*, 1998, 28, p. 404-409.

SUZUKI, Y., SAITO, H., SUZUKI, M., et al. Up-regulation of transferrin receptor expression in hepatocytes by habitual alcohol drinking is implicated in hepatic iron overload in alcoholic liver disease. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 2002, 26, p. 26S-31S.

TAKEO, M., KOBAYASHI, Y., FUJITA, N., et al. Upregulation of transferrin receptor 2 and ferroportin 1 mRNA in the liver of patients with chronic hepatitis C. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2005, 20, p. 562-569.

TANNAPFEL, A., STOLZER, U., KOSTLER, E., et al. C282Y and H63D mutations of the hemochromatosis gene in German porphyria cutanea tarda patients. *Virchows Arch.*, 2001, 439, p. 1-5.

THORBURN, D., CURRY, G., SPOONER, R., et al. The role of iron and haemochromatosis gene mutations in the progression of liver disease in chronic hepatitis C. *Gut*, 2002, 50, p. 248-252.

TOLL, A., CELIS, R., OZALLA, MD., et al. The prevalence of HFE C282Y gene mutation is increased in Spanish patients with porphyria cutanea tarda without hepatitis C virus infection. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 2006, 20, p. 1201-1206.

TUNG, BY., KOWDLEY, KV. Iron and viral hepatitis. *Viral Hepat.*, 1999, 5, p. 63-76.

TUNG, BY., EMOND, MJ., BRONNER, MP., et al. Hepatitis C, iron status, and disease severity: relationship with HFE mutations. *Gastroenterology*, 2003, 124, p. 318-326.

VAN THIEL, DH., FRIEDLANDER, L., MOLLOY, PJ., et al. Retreatment of hepatitis C interferon non-responders with larger doses of interferon with and without phlebotomy. *Hepato-gastroenterology*, 1996, 43, p. 1557-1561.

VOKURKA, M. NEČAS, E. Hepcidin-peptid regulující množství a distribuci železa v organismu ve zdraví a nemoci. *Čas. Lék. Čes.*, 2003, 142 (8), s. 465-469.

VON AHSEN, N., WIELAND, E., ADJAROV, D., et al. The HFE gene S65C polymorphism is rare among Bulgarian porphyria cutanea tarda patients. *J. Hepatol.*, 2001, 34, p. 484-485.

WAHEED, A., PARKKILA, S., ZHOU, XY., et al. 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 (23), p. 12384 – 12389.

WALLACE, DF., SUBRAMANIAM, VN. Co-factors in liver disease: the role of HFE-related hereditary hemochromatosis and iron. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009, 1790, p. 663-670.

WHITFIELD, JB., ZHU, G., HEATH, AC., et al. Effects of alcohol consumption on indices of iron stores and of iron stores on alcohol intake markers. *Alcohol Clin. Exp.Res.*, 2001, 25, p. 1037-1045.

WILBRAND, S., EKBOM, A., GERDIN, B. Cancer incidence in patients treated surgically for Dupuytren's contracture. *J. Hand Surg.*, 2000, 25, p. 283-287.

XIONG, S., SHE, H., SUNG, CK., TSUKAMOTO, H. Iron-dependent activation of NF-kappaB in Kupffer cells: a priming mechanism for alcoholic liver disease. *Alkohol*, 2003, 30, p. 107-113.

YANO, M., HAYASHI, H., WAKASUWA, S., et al.. Long term effects of phlebotomy on biochemical and histological parameters of chronic hepatitis C. *Am. J. Gastroenterol.*, 2002, 97, p. 133-137.

YANO, M., HAYASHI, H., YOSHIOKA, K., et al. A significant reduction in serum alanine aminotransferase levels after 3-month iron reduction therapy for chronic hepatitis C: a multicenter, prospective, randomized, controlled trial in Japan. *J. Gastroenterol.*, 2004, 39, p. 570-574.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ALD	- alkoholové jaterní poškození (alcoholic liver disease)
ALT	- alanin aminotransferáza
AST	- aspartát aminotransferáza
BclI	- restriční endonukleáza štěpící místo 5' – T/GATCA – 3', zdroj: <i>Bacillus caldolyticus</i>
bp	- pár bází
C282Y	- majoritní mutace v HFE genu, substituce cysteinu (C) tyrosinem (Y) v poloze 282 proteinu
C/EBPα	- CCAAT/enhancer – binding protein α - transkripční faktor uplatňující se v regulaci exprese hepcidinu při působení alkoholu
CI	- interval spolehlivosti (confidence interval)
CLD	- chronická jaterní onemocnění (chronic liver disease)
Dcytb	- duodenální cytochrom b, ferireduktáza
DD	- Dupuytrenova nemoc (Dupuytren's disease)
DMT1	- transportér pro divalentní kovy (Divalent Metal ion Transporter 1) - - transportér železa do buňky
DNA	- deoxyribonukleová kyselina
dNTP	- směs nukleotidů (pro PCR)
ELFO	- elektroforéza
GH	- genetická hemochromatóza
H63D	- minoritní mutace v HFE genu, substituce histidinu (H) kyselinou asparagovou (D) v pozici 63 HFE proteinu
HBV	- virus hepatitidy B, chronická hepatitida B
HCC	- hepatocelulární karcinom
HCP1	- heme carrier protein 1, enterocytární hemový importér
HCV	- virus hepatitidy C, chronická hepatitida C
HFE gen	- gen pro hereditární hemochromatózu

HinfI	- restriční endonukleáza štěpící místo 5' – G/ANTC – 3', zdroj: Haemophilus influenzae Rf
HO1	- hemová oxygenáza 1
HNE	- 4-hydroxyl-2 nonenal
IL	- interleukin
IRE	- iron responsive element, protein regulující intracelulární metabolismus železa
IRP	- iron regulatory protein
MaeI	- restriční endonukleáza štěpící místo 5' – C/TAG – 3', zdroj: Methanococcus aeolicus
mRNA	- mediátorová RNA
NF-κB	- nukleární faktor kappa B
NS	- statisticky nevýznamný rozdíl
PCR	- polymerázová řetězová reakce
PCT	- pozdní kožní porfyrie (porphyria cutanea tarda)
RFLP	- polymorfismus délky restričních fragmentů (restriction fragment length polymorphism)
RNA	- ribonukleová kyselina
ROS	- reaktivní kyslíkové radikály (reactive oxygen species)
RsaI	- restriční endonukleáza štěpící místo 5' – GT/AC – 3', zdroj: Rhodopseudomonas sphaeroides
SVR	- setrvalá virologická odpověď (sustained virological response)
S65C	- minoritní mutace v HFE genu, substituce serinu (S) cysteinem (C) v pozici 65 HFE proteinu
Taq	- Taq polymeráza
TfR1, TfR2	- transferinové receptory 1,2
TGF-β	- transformující růstový faktor β
TNF-α	- tumory nekrotizující faktor α
URO-D	- uroporfyrinogendekarboxyláza
Y250X	- mutace s TfR2 genu, záměna cytosinu thyminem v pozici 750 v nukleotidovém řetězci vede ke vzniku stop kodónu

9 PŘÍLOHY

9.1 PŘÍLOHA Č. 1

Protokol pro izolaci DNA z krve – QIAamp DNA Mini Kit

Poznámky:

Vytemperovat všechny vzorky, pufr AE a vodu na pokojovou teplotu.

Centrifugace rovněž vždy probíhá při pokojové teplotě.

Zahřát vodní lázeň nebo suchý blok na 56°C.

Přípravit zásobní pufr AW1, AW2 a QIAGEN proteázu.

QIAGEN proteáza pro 50 vzorků: 24 mg QIAGEN Protease + 1,2 ml Protease solvent (zásobní roztok můžeme skladovat 2 měsíce při 2-8°C, skladování při -20°C prodlužuje životnost proteázy, ale měli bychom se vyhnout opakovanému rozmrazování a zmrazování, doporučuje se rozalikvotovat celkový obsah).

Pufr AW1 pro 50 vzorků: 19 ml AW1 concentrate + 25 ml 96% etanolu (pufr AW1 je stabilní 1 rok, skladujeme při pokojové teplotě).

Pufr AW2 pro 50 vzorků: 13 ml AW2 concentrate + 30 ml 96% etanolu (pufr AW2 je stabilní 1 rok, skladujeme při pokojové teplotě).

Pokud se v pufru AL vytvořil precipitát, rozpustíme jej při 70°C (suchý blok).

Z 200 µl plné krve bychom měli získat 3-12 µg DNA. Pokud požadujeme vyšší výnos můžeme použít buffy coat.

1. 20 μ l QIAGEN Protease na dno 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky.
2. Přidat 200 μ l vzorku plné krve, plasmy, séra, buffy coat, nebo jiné tělní tekutiny, nebo více než $5 \cdot 10^6$ lymfocytů v 200 μ l PBS.

Je-li množství vzorku menší než 200 μ l je třeba doplnit objem PBS. Chcete-li DNA zbavenou RNA je třeba přidat ještě 20 μ l RNase A. Poznámka: Je-li naopak proteáza přidávána ke vzorku, je třeba dostatečně promíchat směs po přidání proteázy.
3. Přidat 200 μ l Buffer AL. Zvortexovat 15 s.
4. Inkubovat 10 minut při 56°C.
5. Krátce centrifugovat, abychom odstranili kapky z víčka zkumavky.
6. Přidat 200 μ l etanolu (96-100%) a zvortexovat 15 s. Po té opět zcentrifugovat, abychom odstranili kapky z víčka zkumavky.
7. Opatrně přenést směs do QIAamp kolonky bez potřísnění okrajů zkumavky. Centrifugovat 1 min při 6000 g (8000 rpm). Umístit QIAamp kolonku do čisté 2 ml sběrné zkumavky. Zkumavku obsahující filtrát vyhodit.
8. Otevřít opatrně QIAamp kolonku a přidat 500 μ l pufru AW1 bez potřísnění okraje zkumavky. Zavřít víčko a centrifugovat 1 min při 6000 g (8000 rpm). Opět přemístit kolonku do čisté sběrné zkumavky a vyhodit zkumavku s filtrátem.
9. Opět opatrně otevřít kolonku a přidat 500 μ l pufru AW2 bez potřísnění okrajů. Zavřít víčko a centrifugovat 3 minuty při 20000 g (14000 rpm).
10. Přemístit kolonku do 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky a vyhodit sběrnou zkumavku s filtrátem. Otevřít opatrně kolonku a přidat 200 μ l pufru AE nebo destilované vody. Inkubovat 1 minutu při pokojové teplotě. Centrifugovat 1 min při 6000 g (8000 rpm).

Inkubace při pokojové teplotě a opakování promytí AE pufrům zvyšuje výnos DNA. Promytí menším objemem pufru zvyšuje koncentraci DNA v roztoku, ale mírně snižuje výnos.

Pro delší skladování je vhodný AE pufr (ne voda). Skladovat při -20°C.

Výnos z 200 µl se pohybuje kolem 6 µg DNA/200 µl roztoku. A_{260}/A_{280} 1,7-1,9.

9.2 PŘÍLOHA Č.2

9.2.1 Osobní přínos disertanta

Na vzniku tří publikací, o něž se opírá předkládaná disertační práce, se Dr. Krátká podílela následovně:

High prevalence of HFE gene mutations in patients with porphyria cutanea tarda in the Czech Republic – Dr. Krátká osobně zorganizovala a provedla celou studii a připravila rukopis publikace.

Lack of association of iron metabolism and Dupuytren's disease – Dr. Krátká se významnou měrou podílela na vyšetřování nemocných, organizovala klinická a laboratorní vyšetření a sběr dat. Rovněž se podílela na přípravě publikace.

Iron overload and HFE gene mutations in Czech patients with chronic liver diseases – Dr. Krátká zajišťovala hepatologickou část studie, vyšetřování nemocných, sběr dat a významně se podílela na přípravě publikace.

9.2.2 Publikace

Krátká, K., Dostalíková-Čimburová, M., Michalíková, H., Stránský, J., Vránová, J., Horák, J. High prevalence of HFE gene mutations in patients with porphyria cutanea tarda in the Czech Republic. *Br. J. Dermatol.*, 2008, 159 (3), p. 585-590.

Hnaníček, J., Čimburová, M., Půtová, I., Svoboda, S., Stříteský, J., Krátká, K., Sosna, B., Horák, J. Lack of association of iron metabolism and Dupuytren's disease. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 2008, 22 (4), p. 476-480.

Dostalíková-Čimburová, M., Krátká, K., Stránský, J., Půtová, I., Cieslarová, B., Horák, J. Iron overload and HFE gene mutations in Czech patients with chronic liver diseases. Rukopis připraven k odeslání k publikaci.