

Niedokrwistość w chorobach wątroby ze szczególnym uwzględnieniem roli hepcydyny

Anaemia of liver disease with a special emphasis on the role of hepcidin

Iwona Malinowska¹, Joanna Pawłowska², Jerzy Socha²,
Anna Adamowicz-Salach¹, Michał Matysiak¹

¹ Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii Akademii Medycznej w Warszawie

² Klinika Gastroenterologii, Hepatologii i Immunologii, Instytut „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka”, Warszawa

Summary: Anaemia is a very common complication of chronic liver disease with a multifactorial etiology. Despite the well known causes such as: blood lost, shortening red blood cells survival, increasing plasma volume, hypersplenism, authors present the role of hepcidin. The anemia of chronic disease, including liver disease, is a hematologic syndrome characterized by hypoferrremia with adequate reticuloendothelial iron stores. Hepcidin is a heptide hormone that has been implicated in controlling the release of iron from cells.

Słowa kluczowe: anemia • choroby wątroby • hepcydyna

Key words: anaemia • liver disease • hepcidin

Adres do korespondencji: Iwona Malinowska, Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii Akademii Medycznej w Warszawie, ul. Marszałkowska 24, 00-576 Warszawa, Polska, e-mail: iwonalamal@kosnet.pl

Wstęp

U pacjentów w przebiegu chorób wątroby często obserwuje się powikłania hematologiczne. Anemia, neutropenia i trombocytopenia spotykane są u większości chorych. Etiologia tych objawów, w szczególności anemii, jest wieloczynnikowa. Za neutropenię i trombocytopenię najczęściej odpowiedzialny jest hypersplenizm, wtórny do nadciśnienia wrotnego.

U trzech czwartych pacjentów z przewlekłymi chorobami wątroby stwierdza się anemię. Wśród najbardziej znanych czynników wymienia się: skrócone przeżycie erytrocytów, niedobór kwasu foliowego i żelaza, przewlekły proces zapalny, utratę krwi, wpływ czynników toksycznych/infekcyjnych na szpik kostny, zwiększoną objętość krążącego osocza. Ostatnio coraz bardziej podkreśla się rolę hepcydyny – hormonu peptydowego biorącego udział regulacji metabolizmu żelaza.

Gospodarka żelaza i jej zaburzenia

Żelazo jest głównym składnikiem hemoglobiny, mioglobiny i wielu enzymów biorących udział w reakcjach utleniania i redukcji oraz przemiany energii. Obrót żelaza w organizmie człowieka jest procesem, który odbywa się niemal w cyklu

zamkniętym. Reutilizacja żelaza zgromadzonego w makrofagach, odzyskiwanego po rozpadzie starych erytrocytów, ma podstawowe znaczenie w utrzymaniu ogólnoustrojowej homeostazy tego pierwiastka. Żelazo uwolnione z makrofagów (20 mg dziennie) zwykle wystarcza do zaspokojenia potrzeb organizmu związanych z erytropoezą.

Żelazo wchłaniane w przewodzie pokarmowym ma na celu uzupełnienie niewielkich strat tego pierwiastka zawartego w złączających się komórkach naskórka i nabłonka przewodu pokarmowego. W prawidłowej diecie podaż żelaza wynosi od 10 do 15 mg dziennie, ale tylko 1 do 2 mg ulega absorpcji w początkowym odcinku dwunastnicy. Wchłanianie żelaza w dwunastnicy podlega ścisłej regulacji i wzrasta w odpowiedzi na zwiększone zapotrzebowanie na żelazo w warunkach ogólnoustrojowego niedoboru żelaza, anemii i niedotlenienia. Organizm ludzki nie posiada mechanizmów usuwających nadmiar żelaza i jedyną drogą do zachowania równowagi w gospodarce żelazem i pokrycia zapotrzebowania na żelazo jest regulowanie wchłaniania żelaza z przewodu pokarmowego.

Występowanie u ludzi licznych zaburzeń związanych z niedoborem lub nadmiarem żelaza spowodowało, że podjęto intensywne badania naukowe mające na celu wyjaśnienie biologicznych mechanizmów tych patologii. Odkrycie mutacji



w genie kodującym białko HFE było ważnym osiągnięciem [1]. Mutacja ta jest odpowiedzialna za występowanie hemochromatozy. We wrodzonej hemochromatozie wchłanianie żelaza z przewodu pokarmowego jest zwiększone i nadmiar żelaza gromadzony jest w wątrobie, gruczołach endokrynych, sercu i skórze. Innym rodzajem zaburzeń gospodarki żelazem są schorzenia, gdzie podaż żelaza w diecie jest prawidłowa, ale jego wchłanianie, krążenie, dystrybucja z magazynów jest nieprawidłowa, aby sprostać potrzebom syntezy hemoglobiny w szpiku kostnym. Takie zaburzenia w gospodarce żelazem obserwuje się w zespole niedokrwistości związanych z przewlekłym stanem zapalnym.

Wyjaśnienie mechanizmu regulacji wchłaniania i dystrybucji żelaza w warunkach fizjologicznych oraz w hemochromatozie i anemii w chorobach zapalnych możliwe było dzięki odkryciu hepcydyny.

Hepcydyna

Hepcydyna (HAMP) jest białkiem składającym się z 25 aminokwasów produkowanym głównie w wątrobie [2]. Ostatnio stwierdzono również syntezę niewielkiej ilości hepcydyny w neutrofilach i makrofagach [3]. Hepcydynę pierwotnie nazywano LEAP-1 (liver expressed antimicrobial peptide-1) i przypisano jej właściwości bakteriobójcze i przeciugrzybiczne. Hepcydyna wykazuje *in vitro* niewielką aktywność przeciwbakteryjną a jej struktura przypomina budowę wielu białek o właściwościach przeciwbakteryjnych jednak obecne badania koncentrują się na wyjaśnieniu jej roli w metabolizmie żelaza. Pigeon i wsp. po raz pierwszy zwrócili uwagę na powiązanie hepcydyny z metabolizmem żelaza. Stwierdzili oni zwiększoną ekspresję mRNA HAMP w wątrobach myszy nastrzykiwanych dekstranem żelaza oraz u myszy karmionych dietą wzbogaconą żelazem. Prace Nicolasa i wsp. wykazały wiodącą rolę tego białka we wchłanianiu żelaza w jelicie cienkim i uwalnianiu z makrofagów [4,5]. Hepcydyna wpływa na ten proces wiążąc i inaktywując ferroportynę, która jest jedynym znanym transporterem usuwającym żelazo z komórek.

Regulacja syntezy hepcydyny przez żelazo

Obserwacje na zwierzętach i ludziach wykazały, że synteza hepcydyny wzrasta po 1 dniu stosowania diety o wysokiej zawartości żelaza oraz przez długotrwale stosowanie diety bogatej w żelazo [6]. U ludzi stężenie hepcydyny w moczu wzrasta znacząco po 1 dniu spożywania żelaza. Nie wyjaśniono, w jaki sposób synteza hepcydyny regulowana jest przez żelazo. Odzwierciedleniem regulatorowej roli hepcydyny w gospodarce żelazem są obserwacje wskazujące na nadekspresję genu hepcydyny (*HAMP*) w hepatocytach przeładowanych żelazem.

Na zwiększenie ekspresji genu hepcydyny (*HAMP*) wpływ ma też wzrost ilości żelaza w płynach ustrojowych. Nadmierne wytwarzanie hepcydyny może być jednak zahamowane za pomocą mediatorów sygnalizujących wzmoczoną erythropoezę. Gen hepcydyny i mRNA nie posiadają żadnych miejsc wiążących białka regulujące gospodarkę żelazem. Hodowle ludzkich i zwierzęcych hepatocytów po stymulacji IL-6 wykazywały wzrost mRNA hepcydyny, ale nie obserwowano takiego zjawiska po dodaniu żelaza do hodowli [6]. Obserwacje te wskazują, że inne komórki mogą być włączone w regulację poziomu hepcydyny w hepatocytach w zależności od poziomu żelaza.

Regulacja poziomu hepcydyny przez anemię i niedotlenienie

Większość żelaza wchłoniętego z przewodu pokarmowego i odzyskanego z hemoglobiny erytrocytów zużywana jest w procesie erythropoezy. W sytuacji niedotlenienia lub w następstwie krwawienia dochodzi do zwiększonej produkcji erytrocytów. Nicolas i wsp. zaobserwowali spadek poziomu hepcydyny i zwiększone wchłanianie oraz uwalnianie żelaza zmagazynowanego w makrofagach i hepatocytach u pacjentów w przebiegu krwawienia lub hipoksji [7]. Obecnie uważa się, że spadek produkcji hepcydyny w anemii może być następstwem niedotlenienia tkanek i narządów, zwiększonej produkcji erytropoetyny i zmniejszonego poziomu żelaza w surowicy i tkankach, zużywanego przez powstające prekursor erytrocytów. Wydaje się, że zarówno poziom erytropoetyny jak i żelaza wpływa na syntezę hepcydyny. Jednak erytropoetyna jest najsilniejszym supresorem syntezy hepcydyny. Do chwili obecnej nie wyjaśniono molekularnych mechanizmów tej regulacji.

Rola hepcydyny we wrodzonej hemochromatozie

Zaburzenia produkcji hepcydyny oraz nieprawidłowości jej funkcji regulatorowej stwierdzono u pacjentów z hemochromatozą. We hemochromatozie wrodzonej występuje nadmierne wchłanianie żelaza pokarmowego, prowadzące do jego kumulacji, wysycenia transferyny i odkładania żelaza w ważnych narządach. Jony żelaza niezwiązane z ligandami, mogą reagować ze zredukowanymi formami O_2 . W wyniku tych reakcji powstają toksyczne wolne rodniki tlenowe. W hemochromatozie może dojść do niewydolności wątroby, kardiomiopatii, uszkodzenia gruczołów wydzielania wewnętrznego i uszkodzenia stawów.

Najczęściej występującą postacią hemochromatozy w populacji europejskiej jest postać zależna od mutacji genu *HFE*, powodująca powstanie autosomalnej recesywnej choroby, występującej u starszych mężczyzn. Mutacja receptora transferyny 2 Tfr2 występuje znacznie rzadziej, ale fenotypowo obie te postaci choroby są podobne.

Postaci autosomalne recesywne związane z mutacją genu hepcydyny *HAMP* albo genu hemojuweliny *HJV* występują zarówno u młodych mężczyzn jak i kobiet (młodzieńcza hemochromatoza) i mają znacznie cięższy przebieg. Postać autosomalna dominująca hemochromatozy jest następstwem mutacji genu ferroportyny.

Większość postaci hemochromatozy jest następstwem niedoboru hepcydyny a postać autosomalna dominująca jest wynikiem niedoboru lub nieprawidłowej funkcji ferroportyny [8].

Homeostaza żelaza u człowieka

Żelazo w pokarmach występuje w większości w formie żelaza trójwartościowego Fe^{+3} lub w postaci hemu. We wchłanianiu żelaza uczestniczy reduktaza żelazowa, która redukuje Fe^{+3} do żelaza dwuwartościowego. Transporter żelaza dwuwartościowego enterocytów DMT1 (divalent metal transporter 1) wiąże żelazo i przenosi je przez błonę komórkową do wnętrza enterocytów. Na błonie podstawnobocznej enterocytów znajduje się ferroportyna, która wiąże żelazo dwuwartościowe i przenosi je do krążenia, gdzie ulega ono związaniu z transferyną. W warunkach fizjologicznych żelazo

wchłaniane z diety ma na celu uzupełnienie potrzeb związanych ze wzrostem organizmu i uzupełnieniem utraconego żelaza. Zwiększenie absorpcji żelaza obserwuje się również w sytuacjach, gdy konieczne jest uzupełnienie jego zasobów zgromadzonych w hepatocytach wątroby. Żelazo zapasowe w tych komórkach związane jest głównie z ferrytyną.

Starzejące się erythrocyty są wychwytywane z krążenia przez makrofagi śledziony i wątroby. Wewnątrz makrofagów erythrocyty ulegają lizie. Żelazo dwuwartościowe uwalniane jest z hemu przy udziale oksydazy hemu. Transferyna (Tf) jest białkiem osocznym pełniącym rolę nośnika jonów żelaza do wszystkich komórek organizmu posiadających receptor transferyny (TfR). Największą ekspresję TfR1 stwierdzono na retikulocytach w szpiku kostnym. Transport żelaza do komórek za pośrednictwem TfR1 obejmuje endocytozę kompleksu TfR1-Tf-Fe²⁺, odłączenie się jonów żelaza od Tf wewnątrz endosomu, a następnie ich transport za pomocą DMT1 przez błonę endosomu do cytoplazmy. Enterocyty, komórki syncytiotrofoblastu, makrofagi i hepatocyty mają zdolność transportowania żelaza do osocza. Białko błonowe ferroportyna jest jedynym znanym białkowym transporterem żelaza występującym w komórkach mających zdolność usuwania żelaza. Badania na myszach z konstytucyjnym brakiem ferroportyny wykazały, że ferroportyna jest niezbędna do transportu żelaza przez łożysko, absorpcję żelaza w dwunastnicy i uwalniania jego zasobów z makrofagów [9]. Rola ferroportyny w transporcie żelaza z hepatocytów nie jest potwierdzona.

Uwolnione jonowe żelazo jest transportowane przez ferroportynę wspomaganą przez ferrooksydazę do osocza, gdzie wiąże się z transferyną. Ostatnie badania wykazały, że hepcydyna reguluje transportem żelaza przez wiązanie ferroportyny, wchłonięcie kompleksu przez komórkę i degradację w lizosomach. Następstwem usunięcia ferroportyny z błony komórkowej jest zmniejszenie transportu żelaza do osocza.

W odpowiedzi na prawidłowe lub zwiększone zasoby żelaza, wątroba produkuje hepcydynę, która powoduje degradację ferroportyny w enterocytach i blokuje transport żelaza do osocza. Gdy zasoby żelaza są niewystarczające, produkcja hepcydyny ulega zahamowaniu i ferroportyna enterocytów umożliwia transport żelaza z cytoplazmy do transferyny osocza.

Podobne zależności między hepcydyną i ferroportyną zachodzą w makrofagach i tłumaczą zjawisko obładowania makrofagów żelazem w procesach zapalnych, charakteryzujących się zwiększoną produkcją hepcydyny.

Rola hepcydyny w anemii w przebiegu procesów zapalnych

Różnym chorobom układowym, ciężkim lub przewlekłym infekcjom, nowotworom, chorobom autoimmunologicznym, przewlekłemu odrzucaniu po transplantacji narządów oraz przewlekłym chorobom nerek towarzyszy niedokrwistość o różnym nasileniu.

Anemia w przebiegu schorzeń przewlekłych jest anemią hipoproliferacyjną z niskim poziomem żelaza w surowicy i prawidłowym poziomem żelaza zmagazynowanego w układzie siateczkowo-śródbłonkowym. Obecność zmagazynowanego żelaza potwierdzana jest przez oznaczenie ferrytyny, której poziom mieści się w granicach normy lub jest podwyższony. Całkowita zdolność wiązania żelaza (TIBC) i/lub stężenie transferyny

w tego typu anemii są prawidłowe lub obniżone. W patogenezie niedokrwistości w przebiegu schorzeń przewlekłych występuje kilka mechanizmów. Skrócenie przeżycia erythrocytów powoduje zwiększenie zapotrzebowania na te komórki i jest sygnałem do ich produkcji w szpiku kostnym. Zaburzenia erythropoezy i mechanizmu mobilizacji żelaza zmagazynowanego w układzie siateczkowo-śródbłonkowym powodują, że szpik nie może podać zapotrzebowaniu. Zaburzenia erythropoezy wynikają z obniżonej produkcji erythropoetyny w odpowiedzi na anemię oraz ze słabej odpowiedzi progenitorów erytroidalnych na erythropoetynę. Wspólnym dla procesów zapalnych, zakażeń oraz schorzeń nowotworowych mechanizmem patofizjologicznym jest udział cytokin TNF, IL-1, IL-6 i interferonów, które są odpowiedzialne za wszystkie patofizjologiczne procesy włączone w powstawanie anemii [10].

Podczas infekcji i w przebiegu procesów zapalnych synteza hepcydyny zwiększa się w mechanizmie, który jest niezależny od poziomu erythropoetyny i żelaza. Zaburzenia gospodarki żelazem występujące u ludzi i zwierząt transgenicznych z nieprawidłową ekspresją genu hepcydyny doprowadziły do potwierdzenia hipotezy o kluczowej roli tego białka w powstawaniu anemii w przebiegu chorób przewlekłych [11]. IL-6 jest silnym stymulatorem syntezy hepcydyny [12]. Ostatnio opublikowane badania Wrightinga i wsp. dowodzą, że IL-6 reguluje syntezę hepcydyny bezpośrednio przez regulację aktywności czynnika transkrypcyjnego STAT3 [13].

Wzrost poziomu hepcydyny pod wpływem IL-6 zaburza procesy uwalniania żelaza zmagazynowanego w makrofagach i enterocytach wywołując hipoferemię. Zaburzenia w homeostazie żelaza powodują zahamowanie, różnicowanie i dojrzewanie komórek progenitorowych linii erytroidalnej. Obserwacje kliniczne wskazują na wzrost poziomu hepcydyny w moczu w przebiegu infekcji i obniżanie się jej poziomu wraz z ustępowaniem procesu zapalnego. Badania *in vitro* wykazały wzrost mRNA hepcydyny w hepatocytach w ciągu 8 godzin od dodania IL-6. Wykazano również, że TNF powoduje zmniejszenie ekspresji hepcydyny.

Ostatnio przeprowadzone badania na modelu zwierzęcym wskazują, że również inne cytokiny w tym IL-1, TGF-β (transforming growth factor-β) i BMP 2, 4 i 9 (bone morphogenic protein) włączone są w proces regulacji syntezy hepcydyny [14,15]. Rola tych cytokin w regulacji gospodarką żelazem u ludzi nie jest wyjaśniona.

IL-1 nasila proces translacji mRNA ferrytyny. Powstała w nadmiarze ferrytyna może działać jako pułapka dla żelaza, które mogłoby być wykorzystane w procesie erythropoezy. Powstały w procesie zapalnym tlenek azotu (NO) wywołuje zwiększoną translację mRNA ferrytyny i mRNA receptora transferyny. Alfa-1 antytrypsyna, białko ostrej fazy, hamuje erythropoezę przez zaburzenie wiązania transferyny z jej receptorem i wbudowanie kompleksu receptor-transferyna do komórek linii erythrocytarnej [11].

Inne czynniki biorące udział w powstawaniu anemii w chorobach wątroby

Zmiany hematologiczne w wirusowych zapaleniach wątroby

Oстрыm wirusowym zapaleniem wątroby najczęściej towarzyszy niewielkiego stopnia anemia, zmniejszenie liczby retiku-



locytów, obniżenie czasu przeżycia erytrocytów, makrocytoza, leukopenia, limfocytoza oraz trombocytopenia.

Leukopenia obserwowana jest w okresie przedżółtaczkowym, towarzyszy jej granulocytopenia i limfocytoza, często w postaciach atypowymi. Nie do końca wyjaśniona jest przyczyna leukopenii, najprawdopodobniej związana jest ona z przejściową supresją szpiku. Poza obniżeniem liczby granulocytów obojętnochłonnych, u niektórych pacjentów, szczególnie HBs dodatnich, obserwuje się zaburzenia ich funkcji.

Rzadziej spotykana anemia związana jest ze skróconym czasem przeżywalności erytrocytów i występującą u niektórych pacjentów hemolizą.

Anemia aplastyczna

Anemia aplastyczna w przebiegu ostrej niewydolności wątroby (ONW) po raz pierwszy została opisana przez Lorenza i Quaisera w 1955 roku [16]. Początkowo wydawało się, że dotyczy to głównie pacjentów po transplantacji wątroby, ale

coraz częściej opisuje się przypadki przed przeszczepieniem. Częstość występowania anemii aplastycznej w przebiegu ONW związanej z zakażeniem wirusami zapalenia wątroby nie-A nie-B szacuje się na 33% przypadków pediatrycznych i 28% pacjentów dorosłych [17]. Leczeniem z wyboru jest przeszczepienie komórek krwiotwórczych od dawcy spokrewnionego w pełni zgodnego. W przypadku braku dawcy rodzinnego stosuje się leczenie immunosupresyjne [18].

Hypersplenizm

W wyniku nadciśnienia wrotnego dochodzi do przewlekłego przekrwienia śledziony z jej powiększeniem, a w miarę upływu czasu jej wtórnego przerostu. Zjawisku temu towarzyszy powstanie nadczynności śledziony – hypersplenizmu. W wyniku hypersplenizmu dochodzi do anemii, leukopenii i trombocytopenii. Początkowo niedokrwistość jest normocytarna lub makrocytarna z podwyższoną retikulocytosą. W miarę pogłębiania się niewydolności wątroby, szczególnie przy ostrym lub przewlekłym krwawieniu, nasila się niedokrwistość mikrocytarna.

Piśmiennictwo:

1. Feder JN: The hereditary hemochromatosis gene (HFE): a MHC class I-like gene that functions in the regulation of iron homeostasis. *Immunol Res*, 1999; 20(2): 175–85
2. Park CH, Valore EV, Waring AJ i wsp: Hepsidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem*, 2001; 276: 7806–10
3. Peyssonnaud C, Zinkernagel AS, Datta V i wsp: TLR4-dependent hepcidin expression by myeloid cells in response to bacterial pathogens. *Blood*, 2006; 107: 3727–32
4. Nicolas G, Bennon M, Porteu A i wsp: Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002; 99: 1596–601
5. Nicolas G, Bennoun M, Devaux I i wsp: Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001; 98: 8780–85
6. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V i wsp: IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest*, 2004; 113: 1271–76
7. Nicolas G, Chauvet C, Viatte L i wsp: The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia and inflammation. *J Clin Invest*, 2002; 110: 1037–44
8. Ganz T: Hepsidin and its role in regulating systemic iron metabolism. *Hematology*, 2006; 29–35
9. Donovan A, Lima CA, Pinkus JL i wsp: The iron exporter ferroportin/Sic40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metabolism*, 2005; 1: 191–200
10. Means RT: Advances In the anemia of chronic disease. *Int J Hematol*, 1999; 70: 7–12
11. Means RT: Hepsidin and Anemia. *Blood Rev*, 2004; 18: 219–25
12. Nemeth E i wsp: Hepsidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood*, 2003; 101: 2461–63
13. Wrighting DM, Andrews NC: Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood*, 2006; 108: 3204–9
14. Babitt JL, Huang FW, Wrighting DM i wsp: Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat Genet*, 2006; 38: 531–39
15. Wang RH, Li C, Xu X i wsp: A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell Metabolism*, 2005; 2: 399–409
16. Seeff LB: Acute liver disease due to infectious agents. W: Zakim D, Boyer TD, editors. *Hepatology. A textbook of liver disease*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1996; 1067–145
17. Tzakis AG, Ardit M, Whittington PF i wsp: Aplastic anemia complicating orthotopic liver transplantation for non-A, non-B hepatitis. *N Eng J Med*, 1988; 319: 393–400
18. Schrezenmeier H, Bacigalupo A: *Aplastic anemia – Pathophysiology and Treatment*. Cambridge, Cambridge University Press, 2000