

Masteroppgave i farmasi

Undersøke sammenhengen mellom jernstatus og jernabsorpsjon Sammenligning av friske og pasienter med hemokromatose



Stud.pharm Eirik Svandal Bø

**Senter for Farmasi
Instituttet for Indremedisin
Universitetet i Bergen**

Juni 2008

Innholdsfortegnelse

Innholdsfortegnelse	3
Forord	5
Forkortelser brukt i oppgaven.	6
Sammendrag	7
1.0 Innledning.....	9
2.0 Jernmetabolismen.....	11
2.1 Tilførsel av jern i kosten.....	11
2.2 Tarmvevets oppbygning.....	12
2.3 Opptak fra tarm til enterocytten	13
2.4 Fra enterocytten til sirkulasjonen	15
2.5 Sirkulasjon.....	16
2.6 Erytroide celler.....	18
2.7 Makrofager	18
2.8 Hepatocytter	19
2.9 Frisetting av jern fra hepatocytter og makrofager	22
3.0 Molekylær regulering av jernopptaket	25
3.1 Hvordan blir jernopptaket regulert?	25
3.2 Hvordan blir DMT1, TfR, ferritin og FPN regulert?	29
3.3 HFE	30
3.4 Hpcidin	31
4.0 Hva er hemokromatose?.....	33
4.1 Oppdagelsen og utviklingen av hemokromatose type 1.....	34
4.1.1 Type 1 HFE-hemokromatose	36
4.1.2 Type 2 Juvenile (ungdoms) hemokromatose	37
4.1.3 Type 3 Transferrinreseptor 2 (TfR2).....	37
4.1.4 Type 4 Ferroportin 1 (FPN 1)	38
4.1.5 Andre former for jernoverskudd	38
4.2 Behandling	38
5. 0 Metode:.....	43
5. 1 Screening av frivillige på BKK Kokstad og Frank Mohn as Sandsli (FRAMO).....	43
5.1.1 Inklusjonskriterier	43
5.2 Jernbelastningstest.....	44
5.3 Prøvetakning av hemokromatosepasienter.....	44
6.0 Analysemetoder.....	45
6.1 Transferrin (Total jernbindingskapasitet (TIBC)).....	45
6.2 Serum Jern (s-jern)	45
6.3 Ferritin	46
6.4 Transferrinmetningen (Tf-sat).....	47
6.5 Hemoglobin (Hb)	47
7.0 Resultater.....	49
7.1 Kontrollgruppen	49
7.2 Homokromatosepasienter.....	62
7.3 Kasusstikk på et forholdet mellom en infeksjon, ferritin, s-jern og Tf-sat	65
8.0 Diskusjon.....	67
8.1 Kontrollgruppen	67
8.2 Hemokromatose pasienter	69
8.3 Sammenligning av de to gruppene	70

8.4 Screening for hemokromatose?	71
8.5 Formålet med en jernabsorpsjonstest.	72
8.6 Svakheter i denne studien og dens utviklingspotensial.	74
9.0 Konklusjon	75
10.0 Referanser:	77
11.0 Vedlegg:	83
11.1 Prosjektprotokoll	83
11.2 Informasjonsbrev	89
11.3 Forespørsmål om å delta i forskningstudie:	91
11.4 Jernbelastningstest.....	93
11.5 Oversikt over noen av de viktigste proteinene som er med i jernabsorpsjonen og jernmetabolsimen.	95
11.6 Oversikt over noen av de viktigste enzymene og proteinene som inneholder jern.....	97

Forord

Denne masteroppgaven i farmasi er skrevet på Instituttet for Indremedisin, UIB og Haukeland Universitets sykehus. Dette arbeidet vil gå inn som en pilotstudie i en større studie om jernabsorpsjon ved hemokromatose.

Jeg vil rette en stor takk til min veileder prof. dr. med Rune J. Ulvik for god veiledning og rettleiding gjennom denne oppgaven.

Jeg vil også rette en takk til bioingeniør Ann Cathrin Kroksveen og bioingeniør Olgunn Lid for stor hjelp med å ta alle blodprøvene.

En stor takk skal også rettes til bedriftssykepleier Ingjerd Leversen og bedriftssykepleier Agnes Øye på henholdsvis Frank Mohn as avd. Sandsli og BKK Kokstad. Takk for den hjelpen jeg fikk av dere til å finne friske personer som ville være med i denne studien, og for den koordineringen dere utførte for at disse personene møtte opp til avtalt tid de dagene vi var ute på bedriften deres.

Og til slutt må jeg sende en takk til alle de som har stilt opp i studien min, både de friske og pasienter med hemokromatose, i tillegg til alle på LKB, som har analysert prøvene.

Bergen 1. juni 2008

Eirik Svandal Bø

Forkortelser brukt i oppgaven.

ABCB7	Membran transportør for FeS	IL-6	Interleukin 6
ABCG2	Hemeksporter	IL-6R	Interleukin 6 reseptor
ABC-me	Hemeksporter	IRE	Iron regulatory element
ALAT	Serum Alanin-aminotransferase	IRP	Iron regulatory protein
ALP	Serum Alkaliske fosfataser	LKB	Lab for klinisk biokjemi på Haukeland sykehus
Apo-tf	Apo-transferrin	JAK	Janus kinase
β 2-m	β 2-microglobulin	LRP	low-density lipoprotein reseptorrelatert protein
BMP	Bone morphogenetic protein	MAPK	Mitogen-activated protein kinase
	Caco-2 celler Simulering av menneskelig tarmceller	MCV	Gjennomsnitt volum av erythrocytter
Cd	Cadmium	MRI	Magnetic resonance imaging
CD163	Hemoglobinreseptor	Mn	Mangan
CE-9	Conserved element 9	Na ⁺	Natriumion
CO	Karbonmonooksid	NTBI	non-transferrin bound iron
Co	Cobolt	OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
Cp	Ceruloplasmin	P	Fosfat
CRP	Serum-C-reaktive protein	RBC	Røde blod celler
CT	Computed tomography	RES	Reticuloendotelie system
DcytB	Duodental cytochrome B	RGM	Repulsive guidance molecules
DMT 1	Brush border iron divalent metal transporter 1	sHJV	Soluble hemojuvelin
E	Ebox	SLA	Sex-linked anemic (mus med innførte genetiske mutasjoner)
ER	Endoplasmatisk reticulum	SF	Serum ferritin
EPP-IX	Erythrocytt portoporphyrin IX	SJ	Serum jern
Fe	Jern	SMAD	Mothers agianst decapentaplegic homologue
FeS	Jernsvovel forbindelser	STAT	signal transducer and activator of transcription
FLVCR	Hemeksporter	STEAP	Six-transmembran epithelial antigen of protease protein
FPN 1	Ferroportin 1	STEAP3	Ferrireduktase
Gp	Glykoprotein	TBI	Transferrin bound iron
GT	Serum Gama-glutamyltransferase	TIBC	Total jernbindingskapasitet
H ⁺	Hydrogenion	Tf	Transferrin
HAMP	Hepcidin anti-microbial peptid gene	Tf-sat	Transferrin mettning
Hb	Hemoglobin	TFR 1 / 2	Transferrin reseptor 1 / 2
HCP 1	Heme carrier protein 1	TGF	Transforming growth factor
HEPH	Hephaestin	USF	Upstream stimulation factor
HFE	Membranprotein på celler som har TfR 1	UTR	Utransformerte delen av et mRNA
HH	Hæreditær (arvelig) hemokromatose	ZIP14	Zink regulated transporter and Iron regulated transporter like protein 14
HIF-1	Hypoxia-inducible factor-1	Zn	Sink
HJV	Hemojuvelin		
HMOX 1	Heme oxydase 1		
Hp	Haptoglobulin		
IFN- γ	Interferon γ		
IL-1	Interleukin 1		

Sammendrag

Bakgrunn: Jern er et essensielt spormetall som vi har ca 3-4 g av i kroppen. Jern inngår i flere proteiner, der hemoglobin er det viktigste. Jern er også delaktig i flere redoksreaksjoner i kroppen vår. Vi trenger daglig et tilskudd på 1-2 mg jern for å kompensere for tapet vi har gjennom tap av hud- og tarmceller og for kvinners menstruasjon. Kroppen vår har ingen utskillesemekanismer for jern, derfor er opptaket nøye regulert og avpasset etter behov. Behovet reduseres normalt gradvis ved øket jernlager. Jernabsorpsjonen er derfor relatert til jernstatus som i denne sammenheng er bedømt ut fra s-ferritin, et mål for størrelsen på jernlageret. Transferrinmetning er brukt som et mål for hvor mye jern som transporteres i blod til vev og organer. Transferrinmetningen øker ved økende absorpsjon av jern.

Sykdommen hemokromatose er ikke uvanlig i Norge og skyldes som regel genfeil på HFE-genet. Sykdommen gjenkjennes ved at det over tid genereres et overskudd av jern, hovedsakelig i lever. Overskuddet vil til slutt komme opp i verdier som kan føre til irreversible organskader, dersom pasienten ikke blir behandlet. Et viktig kjennetegn ved hemokromatose er øket transferrinmetning, som viser at det taes opp for mye jern fra tarmen. Etersom jernlageret øker, øker også s-ferritin.

Mål: Undersøke sammenheng mellom jernstatus og absorpsjon av jern bedømt ut fra en klinisk standardmetode for jernbelastning.

Se om det er forskjell på jernabsorpsjon hos friske og pasienter med hemokromatose.

Metode: Vi har utført en liten åpen pilot-/casekontrollstudie med en kontrollgruppe bestående av 20 friske frivillige menn og 15 friske frivillige kvinner. Disse ble sammenlignet med en gruppe på 10 hemokromatosepasienter med ulik genstatus. Kontrollgruppen gikk først gjennom en screeningundersøkelse, der vi testet ulike parametere for å se om det var noen som ikke oppfylte inklusjonskriteriene våre. Deretter ble det utført en standard jernbelastningstest. Hemokromatosepasienter ble rekruttert fra poliklinikken på Haukeland Universitetsykehus, disse gjennomgikk også en standard jernbelastningstest. Jernstatus ble bedømt ut fra transferrinmetning og s-ferritin. Også hemoglobin og andre hematologiske parametre ble registrert for å oppdage eventuelt jernmangelanemi i kontrollgruppen.

Resultater: Det var store variasjoner i opptak av jern ved bruk av jernbelastningstest både i kontrollgruppen og personer med hemokromatose. Der man i begge gruppene hadde personer som ikke tok opp noe jern, til de som tok opp mye jern. Kontrollgruppen tok i snitt opp mer jern enn hemokromatosegruppen, og kvinnene hadde et høyere gjennomsnittsoptak enn mennene. Men det var ingen noen signifikant forskjell mellom disse gruppene ($p=0,43$). Noen

hemokromatosepasienter hadde tross høy s-ferritin, uventet lav transferrinmetning. Den ene pasienten som var homozygot for C282Y og pasienten som var ”compound heterozygot” C282Y/H63D hadde høyest transferrinmetning av alle, så her kan det være en sammenheng. Av hemokromatosepasientene var 4 personer genetisk normale, mens resten hadde en eller to genfeil på HFE-genet.

Konklusjon: Vi finner ikke noen signifikant forskjell på opptaket av jern mellom friske personer og pasienter med påvist hemokromatose ved bruk av jernbelastningstest ($p=0,25$). Siden vi har en så liten kontrollgruppe og pasientgruppe er det åpenbart at det er stor usikkerhet i tallene våre og vanskelig å trekke konkrete slutninger.

Studien viser at det antagelig ikke vil være behov for å gjennomføre prøv 1 i jernbelastningstesten, siden denne ikke vil gi så mye mer tilleggsinformasjon. Dette fordi det største opptaket i de fleste personer skjer mellom prøve 1 til 2. Dette vil i så fall frigjøre resurser og kostnadene ved denne testen.

1.0 Innledning

Jern er et viktig metall i kroppen og er involvert i mange funksjoner i cellene våre. Jernets evne til å akseptere og donere elektroner er en viktig egenskap i redoksreaksjonen $\text{Fe}^{2+} \leftrightarrow \text{Fe}^{3+}$. Denne reaksjonen er helt avgjørende for at enkelte proteiner og enzymer i kroppen skal fungere, slik som i O_2 -transport og for å danne energi via ATP i mitokondrienes respirasjonskjede. Kroppen vår inneholder i gjennomsnitt 3-5 gram jern, som er bundet til ulike proteiner. I normal tilstand finner man mest jern bundet til hemforbindelser, til hemoglobin og litt til myoglobin, totalt ca. 70 % (ca. 2 g). En del jern er bundet til ulike enzymer og proteiner i kroppen 0,3 % (ca. 8 mg). Mens 0,1 % (ca. 3 mg) er bundet til transferrin (Tf), som er det protein som har ansvaret for å frakte jern rundt i kroppen. Resten ca. 15-30 % (0,3-1,5 g) er lagret i ferritin i kroppens retikuloendoteliale system og i leverens parenkymceller [1, 2]. En voksen mann mister ca. 1 mg jern pr dag hovedsak via avstøtning av tarmceller og utskiftning av hudceller, mens kvinner mister litt mer på grunn av menstruasjon. Det finnes ikke noen aktiv måte å utskillelse ut jern på, så derfor må opptaket nøye reguleres. Av det jernet vi spiser klarer bare kroppen og ta opp ca. 10-15 % gjennom i tarmen, derfor er det daglige behov for menn ca. 10 mg, mens det er opp mot 18 mg jern for fertile kvinner [3]. Siden tarmen er en så viktig del i reguleringsmekanismen for jern, har jeg i oppgaven gått inn på hvordan den er bygget opp og hvordan denne reguleringsmekanismen fungerer.

Sykdommen arvelig hemokromatose (HH) fører til at det tas opp ca. 1-3 mg jern pr dag mer enn det man har behov for. I løpet av 40-60 år kan det akkumuleres et overskudd på opptil 20-30 g jern i kroppen, hovedsakelig i leverparenkymet, men jern avleires også i andre organer og vev. Sykdommen kommer derfor snikende og blir ofte ikke oppdaget før i 30-40 års alderen eller kanskje enda senere hos menn og ca. 50-60 års alderen for kvinner. Grunnen til at kvinner ofte blir oppdaget senere er fordi de kvitter seg naturlig med jern mens de er i fertil alder på grunn av menstruasjon og svangerskap, dette kan være nok til å unngå jernoverskudd og sykdom [3, 4].

Ubehandlet HH kan gi leddsmerter, tretthet, gonadesvikt (impotens), buksmerter, økt hudpigmentering og store organskader spesielt i lever, som senere kan utvikles til levercirrhose (skrumplever) og levercellekraft. Hjertekomplikasjoner og diabetes kan man se som sjeldne komplikasjoner. [5-7]

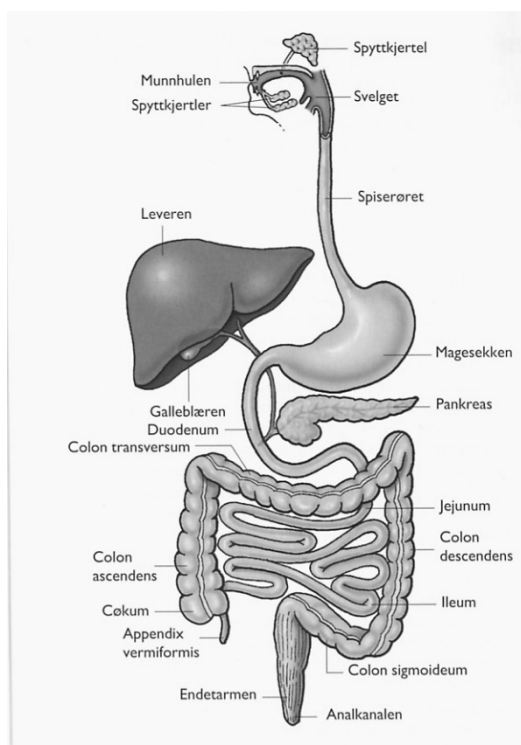
Målet med oppgaven er å finne ut om det er noen signifikant forskjell på opptaket mellom friske og personer som har HH. Vi vil også se om ferritin status påvirker opptaket. Opptaket av jern ble målt ved standard jernbelastningstest ved Lab for klinisk biokjemi (LKB) ved Haukeland Universitetssykehus.

2.0 Jernmetabolismen

2.1 Tilførsel av jern i kosten

Kroppen vår får tilført jern på to måter, enten gjennom uorganisk jern (non-hemjern) som jernion Fe^{2+} eller Fe^{3+} , der Fe^{3+} er den vanligste formen i matvarer. Vi kan i tillegg ta opp jern som hemjern fra hemforbindelser i kjøtt/blodmat. Fe^{2+} og Fe^{3+} får vi gjennom kosten i form av salter eller jernkomplekser, som først må løses opp og frigis i ventrikkelen, slik at kroppen kan nyttgjør seg av det. Biotilgjengeligheten for Fe^{3+} varierer da i forhold til hvor vanskelig det er å få frigjort jernet fra kompleksene det sitter i. Magesyren og askorbinsyre spiller en

Figur 1: Oversikt over gastrointestinal trakt [8].



viktig rolle for å få frigjort jernet fra komplekset [9].

Magetarmsystemet i mennesker er bygget opp av flere deler, som vist på figur 1. Alle delene har ulike oppgaver i forhold til fordøyelsen av maten. Kjeven brukes til å tygge og kverne maten, der blir det også tilsatt spytt, som bløtgjør og som inneholder enzymer slik at nedbrytingen kan starte. I magesekken blandes mat med syre. Dette gjøres for at maten lettere skal bli spaltet til mindre molekyler, slik at vi kan nyttgjør oss av den.

Etter at maten har vært i magesekken går den ned i tarmen der vi får utskilt enda flere enzymer og galle fra lever og pankreas. Dette er viktige bestanddeler

for at vi skal kunne klare å ta opp alle næringsstoffene vi trenger [8]. Vi skal gå litt mer i detalj på hvordan en tarmcelle er oppbygget og hvordan opptaket av jern skjer i denne.

Opptaket av jern skjer hovedsakelig i duodenal epitel i tyntarmen, men også litt i proksimale jejunum. Det er flere faktorer som spiller inn på hvor tilgjengelig det jernet vi får i oss er. Tas jern for eksempel samtidig med kalsiumfosfat eller enkelte andre ioner/molekyler kan det bli dannet tungt løselige komplekser som fører til at jernet ikke blir absorbert gjennom tarmen. Tanniner i for eksempel te og litt i kaffe, i tillegg en del andre matvarer kan også binde jernet og påvirker jernopptaket negativt i mer eller mindre grad [10, 11]. Det finnes noen medisiner slik som protonpumpehemmere og H_2 -blokkere som har vist seg å reduserer tilgangen på jern

i tarmen [12]. Man har sett i eksperimenter at andre metaller også kan påvirke opptaket negativt, her er sink, kopper, kobolt, cadmium, og mangan beskrevet [13]. De eneste av disse metallene som antagelig kan bety noe for oss i praksis er sink og kopper. Den tilførte mengden av de andre metallene er gjennom kosten så liten. Studier har vist at disse hindrer opptaket ved å bruke samme inngangsvei inn i cellene som jern. Det må også tas hensyn til jernets kjemiske form. Det må også tas hensyn til kjemisk form på jernet, magesyre og andre organiske syrer.

Det finnes noen stoffer som virker positivt på opptaket av jern slik som askorbinsyre (vitamin C). I tillegg har man det man har kalt en kjøttfaktor, det har vist seg gjennom forskning at spiser man kjøtt eller fisk samtidig som man spiser jern, øker opptaket [3, 9, 14-16].

2.2 Tarmvevets oppbygning.

Som vist på figur 2 ser vi at tarmvevet er bygget opp av flere lag der mukosa som betyr slimhinne, ligger som den ytterste delen og den delen vi skal konsentrere oss om. Innenfor dette laget finner man submukosa, muskulatur og serosa, som har ulike funksjoner som å overføre nervesignaler, opprettholde struktur og utføre muskelkontraksjonene til tarmen.

På figuren kan man se at mukosa ytterst består av et enkelt lag med epitelceller (enterocytter) med bindevevslag innenfor, dette danner tarmtotter som stikker ut i tarmen. Enterocytene på tarmtotten har ca. 3000-6000 håraktige utvekster som kalles mirco villi. Siden denne overflaten ser ut som en børste i mikroskop, blir den ofte kalt "brush border" eller tarmtotter. Disse utvekstene stikker ut i tarmen slik at det blir dannet en veldig stor overflate for absorpsjon, dette for å øke muligheten for å få tatt opp det som kommer ned i tarmen. I bindevevslaget finner man tilførende og fraførende blodårer, i tillegg til at det går en lymfeåre. Disse årene har ansvaret for å frakte næringsstoffene som blir tatt opp av tarmen videre ut i sirkulasjonen. Det finnes også nerveceller helt ut til tottene for å påvirke absorpsjonen.

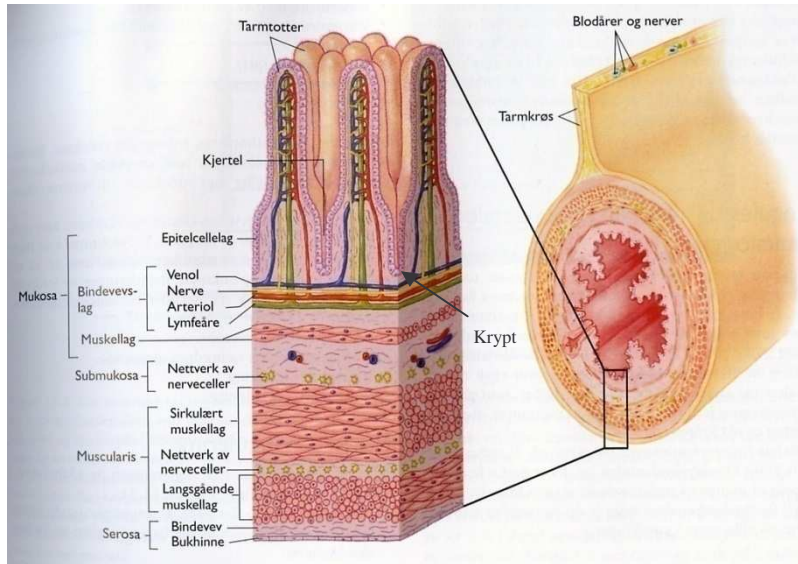
Det ytterste laget danner epitellaget, et enkelt cellelag som består av enterocytter, som sitter tett i tett bundet sammen av tette cellebindinger (tight junctions), der bare små ioner slik som blant annet Cl^- klarer å diffundere gjennom. I enterocytene finnes det mange ulike proteiner som danner et utall av kanaler, pumper, transportører, som er med i opptaket av ulike næringsstoffene. Vi skal se nærmere på noen av dem i neste avsnitt.

Absorpsjonen i tarmen må være nøye regulert. Det er ikke alle stoffer som ønskes tatt opp i kroppen, slik som giftstoffer og bakterier. Siden det er så stor slitasje på enterocytene blir de byttet ut ca. hver 2-3 dag, det vil si at det hele tiden blir dannet nye tarmceller. Tarmcellene

blir produsert nede i krypten, og erstatter de tapte cellene på tottene etter hvert som det blir avstøtt.

Det siste laget i mukosa er muskelaget, dette laget er med på å lage små kontraksjoner som fører til formforandring som kan være med å påvirke opptaket fra tarmen [8].

Figur 2: Oppbyggingen av tarmvev [8].



2.3 Opptak fra tarm til enterocytten

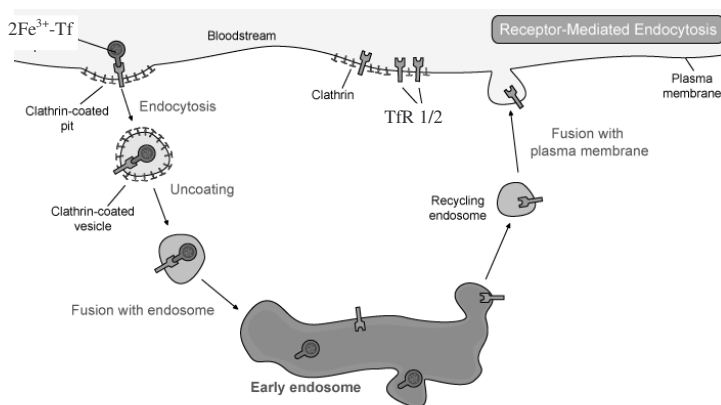
Opptaket av hemjern og non-hemjern er i første trinnet forskjellige. Før hemet kan bli tatt opp i enterocytten må hemet bli frigjort fra proteiner som hemoglobin (Hb) og myoglobin, dette skjer ved proteolytisk aktivitet i magesekken [17]. Opptaket av hemjern er ennå ikke helt forstått, men studier på cellekulturer, så kalte Caco-2 celler (simulering av menneskelig tarmepitel), kan tyde på at det er en metningsbærende mediert prosess [18]. Andre studier har beskrevet en hemreseptor på tarmtottene i duodenum og på erythroleukemi celler [19]. Det ble for ikke lenge siden oppdaget en enterocyt hemimporter, som har fått navnet "heme carrier protein 1" (HCP1). Det er denne som nå er den mest gjeldende oppfatning av rett transportvei for hemet [20, 21]. Når hemet er tatt opp i epitelcellene antagelig da av HCP1, blir det sannsynligvis spaltet av "intracellulær heme oxydase 1" (HMOX1) for å få frigjort jernet, slik at det kan gå videre inn i det vanlige jern kretsløpet [21]. Det har vist seg at det prosentvise opptaket av hemejern er større enn opptaket av non-hemjern [22].

Jern i uorganisk form er ofte bundet til salter eller andre proteiner oftest som Fe^{3+} og må da først løses fra disse, deretter bli redusert til Fe^{2+} , for å bli klar til opptak. Det jernet som allerede ikke er blitt redusert av askorbinsyre på vei ned til tarmen blir ved hjelp av enzymet "Duodenal cytochrome B" (DcytB) redusert for så etterpå å bli tatt opp av "brush border iron transporter divalent metal transporter 1" (DMT1) [9]. Nyere forskning på DcytB knockout

mus har vist at det må være enda en mekanisme for redusering av jern og man har da funnet at six-transmembran epithelial antigen of protease protein (STEAP) familien er en mulig metallreduktase kandidat [23].

Fe^{2+} blir transport gjennom DMT1 ved hjelp av H^+ ioner, som blir pumpet lokalt ut i tarmen ved hjelp av en Na^+/H^+ pumpeveksler [9]. H^+ virker som en positiv gradient for å lage det elektrokjemiske potensialet som trengs for å drive jernopptaket fremover. Ulike studier har prøvd å finne ut om H^+ også har en annen rolle i opptaket, og om pH har noe å si på opptaket. Gunshin, H., et al [24] viste i en studie det seg at DMT1 blir stimulert av lav pH mens i en annen ble den stimulert rundt pH 6 [13]. I samme studie er det også vist at H^+ bandt seg til DMT1 og dermed økte affiniteten til Fe^{2+} . Ved hjelp av Caco-2 celler er det vist at DMT1 også transporterer Mn, Co, Zn og Cd, men hvor viktig denne transporten er, er fortsatt usikker [13, 25]. Man har funnet transportere i mus som kan transportere hele jernkomplekser over den apikale membranen, så det er en mulighet for at mennesker også har slike transportere, men ingen er ennå funnet [9]. Studier de siste årene på Caco-2 celler viser at opptil halvparten av jernet kan bli tatt opp ved hjelp av endocytose eller nærmer bestemt transcytose, istedenfor den tradisjonelle veien gjennom DMT1. Der man kan se at endosomer fra den apikale membranen som inneholder DMT1 og endosomer fra den basolaterale membranen som inneholder ferroportin (FPN 1) og apotransferrin møtes i den apikalen delen av cellen. Innholdet som i dette tilfellet er jern blir overført og de ulike proteinene returnerer til sine respektive membraner [26].

Figur 3: Endocytose [27]



Dept. Biol. Penn State ©2003

Figuren viser hvordan en endocytose blir utført. Det vi ser er at substratet binder til reseptoren blir dratt inn i cellen, tømmer sitt innhold og går ut til membranen igjen, for å hente ny ladning. Når det gjelder endocytose av transferrin (Tf), så blir den med reseptoren ut igjen, ikke som vist på figur at det blir værende i "early endosome", det er bare jernet som blir værende igjen.

Ved transcytose vil denne vesikkelen møte en vesikkel fra den basolaterale membranen slik at innholdet blir utvekslet og fraktet gjennom hele cellen og ut på andre siden.

2.4 Fra enterocytten til sirkulasjonen

Inne i enterocytten blir det jernet som ikke blir fraktet gjennom cellen av transcytose, men som kommer fra DMT1 og HCP1, samlet i en "pool" der noe kan bli lagret i ferritin molekyl. Ferritin er et vannløselig molekyl som består av 24 subenheter, og har mulighet til å lagre opp til 4500 jernatomer [28]. Resten av jernet blir enten værende i "poolen" eller blir det transportert gjennom enterocytten til den basolaterale membranen. Hvordan denne transporten blir utført er ikke helt sikker, men noen har foreslått chaperon molekyl, men disse er ennå ikke funnet. En annen teori er transcytose, der små vesikler blir fraktet gjennom cellen og innholdet blir overført til Ferroportin 1 (FPN 1) [26], også kalt i litteraturen for Ireg1 [29], SLC40A1 [25] eller MTP-1 og derifra ført ut av enterocytten [30, 31] (figur 4). FPN 1 er den eneste jerneksportøren som er oppdaget i mennesker og den viser seg å være et viktig hastighetsregulerende steg i jernmetabolismen [31, 32]. Proteinet FPN 1 er begrenset til basolaterale membraner og da hovedsakelig til enterocytter i duodenum. I tillegg til at den finnes både i placenta, hepatocytter, makrofager, hjerte og milt [32, 33]. Felles for alle disse cellene er at de kan lagre og frigi jern. En over ekspresjon av FPN 1 i dyrkede vevsceller førte til uttømming av cytosolisk jern fra cellen [32]. Ved en eventuell jernmangel vil kroppen regulere opp dette proteinet, dette for å ta opp mer jern fra tarmen og ellers nyttegjør seg av det jern man har til rådighet i kroppen [30].

På utsiden av enterocytten blir jernet oksidert ved hjelp av ferroxidase hephaestin (HEPH) som er en membranbundet homolog av serum multikobber oksidase proteinet Ceruloplasmin (Cp) [32, 34-36]. Dette proteinet oksiderer Fe^{2+} tilbake til Fe^{3+} igjen, slik at apotransferritin (apo-Tf) kan komme og plukke opp jernet. Apo-Tf er en tom transferrin (Tf). Det er også vist at det finnes mer HEPH inne i cellen enn på cellemembranen, grunnen til dette er litt uklar, men det kan ha noe med intracellulær ferrioksidase aktivitet eller en annen funksjon for å få overført Fe^{3+} til serum Tf. Det gjenstår å finne ut [9, 34]. I sla (sex-linked anemic) mus, der man har innført en genetisk mutasjon som fører til mangel på HEPH, ser man at det blir en blokkering i jerntransporten slik at overføringen av jern ut av enterocytten blokkeres, som da igjen vil føre til en jernmangel hos individet [32, 37]. Derfor må HEPH ha en viktig rolle i overføringen av jern ut fra enterocytter over den basolaterale membranen og videre ut til Tf. Siden HEPH har denne egenskapen vil den også være med i reguleringen av opptaket av jern, men det er ennå uklart om ferrioksidase aktiviteten til HEPH er kritisk for jern utskillelsen. I studier på rotter og Caco-2 celler fant man at kobbermangel førte til økt jern opptak i et studie [9, 35], men minsket i ett annet [38], så her må det mer forskning til for å fastslå helt hva som

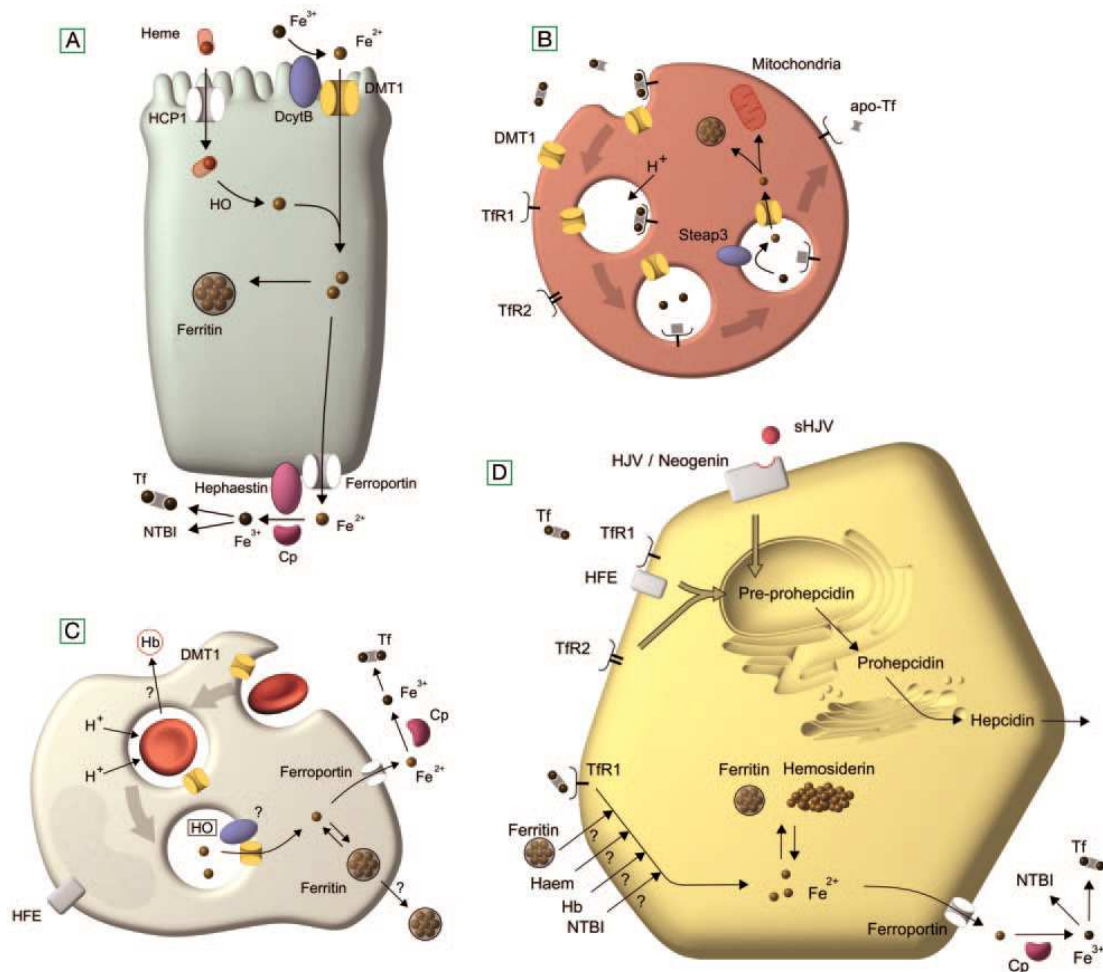
er riktig. Med disse motstridene data kan man konkludere med at HEPH har en viktig rolle i overføringen av jern som kanskje ikke krever den kobberavhengige ferrioxidasen [39]. Det er også studier som viser at mangel på kobber fører til at HEPH ikke blir skikkelig utviklet og at man dermed kan se jernstatus i sammenheng med tilførslen av nok kobber [32].

2.5 Sirkulasjon

Når jernet har kommet seg gjennom den basolaterale membranen blir det tatt opp av Tf, som frakter jernet rundt i blodbanen. Tf er et 80 kDa glykoprotein bestående av en singel polypeptidkjede og to N-linkede glycankjedekomplekser, som hovedsakelig syntetiseres i leveren, i tillegg til en liten produksjon i hjernen, testiklene og i brystkjertelen [28]. Dette komplekset har to bindingssteder for jern, og nesten alt jern som transporteres i blodet er bundet til dette komplekset. Ved normal jernstatus er bare omtrent 1/3 av alle bindingssetene okkupert. Tf er ansvarlig for å levere ca. 24 mg jern/dag rundt i kroppen, der mellom 70-90 % går til beinmargen og til syntesen av nye røde blodceller (RBC), mens resten går til andre vev der det blir tatt opp, brukt eller lagret [40]. Tf kan binde to jernatomer, og forefinnes i blodet i tre former, apo Tf, monoferric Tf og diferric Tf, alt etter hvor mange jernatomer den bærer. Ved 30 % metning er forholdet mellom diferric Tf og monoferric Tf 1:2, mens bare 1:5 ved 15 % metning, det vil si at konsentrasjonen av diferric Tf er veldig avhengig av totalkonsentrasjonen [41]. Dette vil ha stor innvirking på regulering av inntak som vi kommer til senere. Det viser seg at bindingen mellom jern og Tf er avhengig av pH, og man har høyest bindingsgrad ved pH 7,4 som man finner i plasma [42].

Man vil også finne jern i små mengder i blodet som ferritin eller som "non-tf bound iron" (NTBI), som vanligvis er mindre enn 1 μM , beskrevet i mer detalj under opptak i leveren. Ved en eventuell HH kan NTBI være forhøyet opp til 10 μM , men høyere verdier er også registrert. Ca. 50 – 70 % av alle NTBI komplekser som transporteres i plasma opptrer som jerncitratkomplekser. Ved første passasje i leveren blir ca. 75 % av disse fjernet fra plasma og tatt opp i leveren, mot bare ca. 2 % for Tf bundet jern (TBI). Halveringstiden for TBI i plasma er ca. 50 min, mens den for NTBI er bare 30 sek. En vesentlig grunn for at NTBI har mye kortere halveringstid er fordi ukontrollert jern kan være farlig for kroppen og kan gjøre stor skade i form av ukontrollerte redoksreaksjoner [28].

Figur 4: Jernmetabolismen [43, 44]



A Enterocyt (tarmcelle), hem blir transportert inn i enterocytten, ved hjelp av en "hemeimporter" (HCP1), der det blir nedbrutt av "heme oxidase 1" (HO) og går inn sammen med resten av det vanlige uorganiske jernet. Det uorganiske jernet blir først redusert ved hjelp av enzymet "Duodenal cytochrome B" (DcytB), og blir så fraktet over celledmembranen ved hjelp av "Divalent metal transporter 1" (DMT1) og går inn i sammen med jernet fra hem. Deretter blir jernet enten lagret i ferritin inne i enterocytten, eller så blir det fraktet ut av cellen ved hjelp av Ferroportin (FPN1). Utenfor cellen blir jernet oksidert enten ved hjelp av det membranbunne proteinet Hephaestin (HEPH) eller plasma proteinet Ceruloplasmin (Cp), og blir tatt opp av transferrin (Tf).

B Umoden erytrocytt (røde blodcelle), her blir Tf proteinene tatt opp ved endocytose av TfR 1/2 og jernet blir frigjort fra Tf. Jernet blir så fraktet inn i mitokondriene der det går inn i syntesen av nytt hem eller andre proteiner/enzymer som trenger jern.

C Makrofag, de tar opp gamle erytrocytter og bryter disse ned slik at jernet kan bli frigjort igjen. Litt av den samme mekanismen som i enterocytter. Kan også ta opp jern som haptoglobin (Hp) ved hjelp av hemoglobinreseptoren (CD163), Tf ved Transferrinreseptor 1 (TfR 1) og fagocytose av bakterier (ikke vist på figur).

D Hepatocyt (levercelle) Her blir overskuddet av jern tatt opp, det er litt usikkert hvordan opptaket skjer, men Tf og NTBI blir nå tatt opp. I hepatocytter blir jernet lagret enten som ferritin eller for lengre tidslagring som hemosiderin. I tillegg har hepatocytter en viktig rolle i reguleringen av opptaket av jern ved utskillelse av peptidet hepcidin.

2.6 Erytroide celler

Jern som har blitt tatt opp i en umoden erythrocytt (RBC) i beinmargen, blir fraktet inn i mitokondriene ved hjelp av mitokondrielle jernimporter slik som Mitoferrin, det er også mulig at det finnes andre importere av jern, men disse er enda ikke funnet [45]. Etter at jernet er kommet inn i mitokondrien regulerer proteinet Frataxin hvilke synteser jernet skal være med i. Den vil da fordele jernet mellom syntese av jernsulfidkomplekser, lagring eller produksjon av hem. Jernsulfidkomplekser blir muligens transportert ut av mitokondrien ved hjelp av membrantransporter (ABCB7). Mesteparten av jernet blir sendt til produksjonen av hem, som skjer ved at Fe^{2+} blir inkorporert i erythrocytt protoporphyrin IX (EPP-IX) ved hjelp av ferrochelatase og man får dannet hem, som er en viktig bestanddel i hemoglobin. Det er litt ukart hvordan hem transporteres ut av mitokondriene, men det er beskrevet 3 ulike hemeksportere (FLVCR, ABC-me og ABCG2) [2, 45, 46].

2.7 Makrofager

Etter at en RBC har vandret rundt i blodbanen i ca. 120 dager er den utslitt og blir helt eller delvis tatt opp av makrofager ved fagocytose. Inne i makrofagen blir RBC brutt ned og hemoglobinet (Hb) blir frigjort. Hb blir så nedbrutt til hem ved hjelp av "hemoxygenase". Hemet blir så nedbrutt til biliverdin, CO og Fe^{2+} . Biliverdin blir så videre redusert til bilirubin og sammen med CO blir fraktet ut av cellen, mens Fe^{2+} enten lagres i ferritin eller skilles ut ved hjelp av FPN 1. Utenfor makrofagen blir Fe^{2+} oksidert til Fe^{3+} ved hjelp av Ceruloplasmin (CP) og blir så tatt opp av Tf, som sirkulerer rundt i blodbanen og kretsløpet er sluttet [2, 44, 46]. Ca. 12 timer etter at en RBC er fagocyttert, gjennomgått det retikuloendoteliale system (RES) og jernet er transportert tilbake til sirkulasjonen, er ca. 60 % av jernet blitt brukt til å danne nye RBC. Resten har gått inn i kroppens jernlager eller blitt brukt i produksjon av andre proteiner. Ved behov kan erytropoesen (produksjon av RBC) økes opptil 6 ganger og har da et daglig behov for jern på 100-125 mg/dag. Dette jernet må tas fra økt opptak av jern fra tarmen eller fra jern lagret i ferritin eller hemosiderin inne i blant annet levercellene [2].

RES er en kombinasjon av monocytter og vevsmakrofager som spiller en viktig rolle i nedbrytning av jernbindende molekyler og resirkulering av jern. Monocytter blir produsert i beinmargen, og vandrer videre ut i blodbanen til de ulike vevene i kroppen og modnes der til makrofager. Man finner høyest tetthet av disse cellene i leveren, tarm, beinmarg, milt og lunger, der milten er det viktigste organet for resirkuleringen av jern, men fjernes milten så tar de andre organene over funksjonen [2].

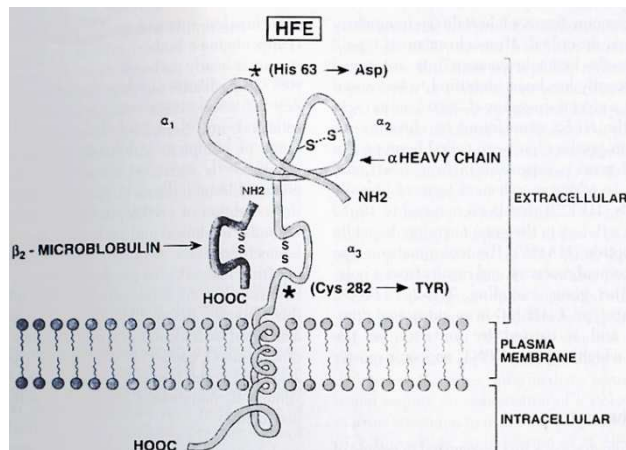
Makrofagene har 4 ulike måter den tar til seg jern på, den første er som tidligere nevnt over fagocytose av utslitte RBC ved hjelp av erytrofagocytose. Den andre metoden er å ta opp Hb eller Hb-komplekser som er bundet til haptoglobin (Hp). Hb kommer fra de 10 til 20 % RBC som sprekker i blodbanen før de blir fagocyttert. Hb og Hp blir begge tatt opp ved hjelp av Hemoglobinreseptoren (CD163). Den tredje metoden er ved hjelp av Transferrinreseptor 1 (TfR 1), som vi kommer til senere under opptak til lever. Mens den siste og kanskje den minst viktige for jernet sin del er fagocytose av bakterier. Mange av disse transportveiene forskes det mye på og mange av de nye proteinene er oppdaget bare de siste få årene [43]

2.8 Hepatocytter

Leveren spiller en viktig rolle i jernmetabolismen, og står for ca. 8 % av plasma jern omsetning i kroppen. Jernet blir tatt opp gjennom flere mekanismer, men det er TfR1 som er den viktigste etterfulgt av TfR2 [47].

Opptaket skjer ved at en eller to diferric Tf, som har 4 ganger høyere affinitet på reseptoren enn monoferric Tf og 24 ganger høyere enn apo Tf, binder seg til TfR1, man får da en endocytose og reseptoren sammen med Tf blir fraktet inn i cellen. Inne i endosomet blir jernet frigjort fra Tf ved at pH kan blir redusert så mye som til pH 4,5. Ved denne pH vil affiniteten til reseptoren gå ned og alt jernet vil slippe Tf. Jernet blir så redusert til Fe^{2+} av STEAP 3 og fraktet inn i cellen ved hjelp av DMT1, mens reseptorene blir transportert ut til cellemembranen igjen [28, 43, 44, 46, 47]. Dette tar ca. 3,8-15 min [41]. Det som er hovedforskjellen på TfR1 og TfR2, er at TfR1 har 30 ganger sterkere binding av Tf og at TfR1 finner du på nesten alle typer celler mens TfR2 hovedsak bare finnes på hepatocytter, kryptceller i duodenum og erytrocytter [48]. TfR1 har også muligheten til å binde HFE i stedet for Tf, slik at reseptoren blir blokkert og den ikke klarer å ta opp Tf. Det er og vist i nyere studie av Goswami et al [49] og av Schmidt et al [50] at HFE også kan bindes til TfR2 i en musehepatocytt. Dette har antagelig med reguleringen av hepcidin å gjøre, men det er ennå usikkert.

HFE er et 343 aminosyre membranprotein som finnes i størst antall i kryptceller, hepatocytter, Kupfferceller, men finnes også på alle TfR1-inneholdende celler. Det består av et stort ekstracellulært domene som igjen består av 3 looper ($\alpha 1$ - $\alpha 3$) (figur 5). For at HFE skal ha den korrekte konformasjonen på cellemembranen slik at det klare å binde seg til TfR1, så må det binde til seg $\beta 2$ -microglobulin [51]. Det at TfR1 har mulighet til å binde til seg både

Figur 5: Tegning av HFE-proteinet med dens hovedgenfeil.

HFE og Tf tyder på at man her også har en reguleringsmekanisme, for ved normal tilstand dannes det en likevekt mellom antall bundet HFE og Tf til TfR1. Derfor vil man forskyve likevekten når det er mye "diferric-Tf" i blodet og man vil da presse vekk HFE proteinet fra reseptoren som da bare vil flyte løst rundt på cellemembranen. Har man dermed lite jern i kroppen og med det færre fulle Tf, så vil flere HFE binde seg til TfR1 reseptorer og levercellen merker at det er lite løst HFE og modulerer signalene slik at man kan oppregulere jernopptaket. Reguleringen av dette kommer vi til litt senere. TfR1 har også en link til intracellulær jern regulerende protein (IRP), som ved mangel på jern, starter transkribering og man får øket antallet TfR1 reseptorer på celleoverflaten [28, 47, 50]. I HFE-knockout mus er det vist at antallet TfR1 blir nedregulert, mens opptaket er allikevel større enn i normale mus, noe som igjen speiler på at HFE har med bremsingen av inntaket av jern å gjøre [52].

Siden TfR2 har en 30 ganger svakere binding til transferrin enn TfR1, vil den derfor bare være mest aktiv når det er mye "diferric-Tf" tilstede [28, 47].

I tillegg til opptaket av jern gjennom Tf via TfR1/2 i leveren, har man også opptak av RBC og hemprodukter, via den samme mekanisme som hos makrofagene, dette skjer hovedsaklig i Kupfferceller (leverens egne makrofager).

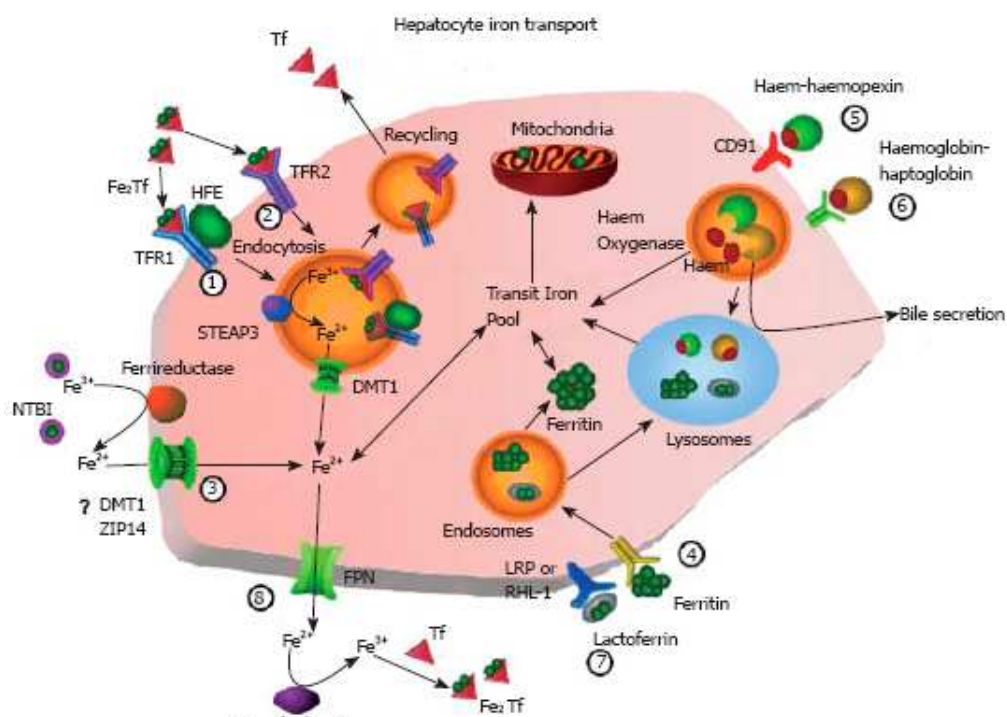
Det er også mekanismer for å ta opp ferritin, lactoferrin samt Hb og Hp. Disse er mye de samme opptaksmekanismene som man har i makrofagene, der de binder seg til de spesifikke reseptorer, slik at det kan bli tatt opp via endocytose og videre fraktet til lysosomene for nedbrytning og videre lagring (figur 6).

Til slutt har vi opptaket av NTBI, som er en metningsbærende og temperatur avhengig prosess, som ikke er avhengig av energi eller er sensitiv til jernstatus i kroppen. NTBI blir redusert av en ferricreduktase, en slektning av Dcyb som finnes i endotelcellene, muligens også STEAP3, og tatt opp gjennom en cellemembranbærende prosess sannsynligvis ved hjelp

av DMT1 og ”Zink regulated transporter and Iron regulated transporter like protein 14” (ZIP14). Man ser også at opptaket her kan bli senket ved konkurranse med andre metaller som sink, mangan, kobolt og nikkel [47, 53]. Det snakkes også om at kalsium kan ha en rolle i opptaket av NTBI, men det gjenstår å finne mer ut av [47]. Det er i senere tid kommet fram at dette er kanskje et av de viktigste opptakene av overskuddsjern i blodet, og at man ved hemokromatose vil ha mer av NTBI i blodet, siden kapasiteten til Tf er så å si brukt opp. Og at det er dette som akkumulerer et overskudd [28].

Inne i hepatocytten blir jernet lagret som ferritin eller hemosiderin, mens noe blir fraktet ut igjen ved hjelp av FPN 1 eller brukt til produksjon av enzymer som trenger jern for å fungere. Hemosiderin er et ikke-vannløselig molekyl og et biprodukt av en ufullstendig nedbrytning av ferritin i lysosomene. Fordelen med hemosiderin er at det kan lagre mer jern per volumenhet og mindre fare for at det dannes frie radikaler [28, 43].

Figur 6: Jerntransporten ut og inn av en hepatocyt [47]



Hepatocyte Jerntransport. (1) (2) Tfr1-mediert og Tfr2-mediert opptak av diferric transferrin er veldig like. Diferric Tf binder til spesifikke reseptorene Tfr1 og Tfr2, som igjen fører til endocytose. I endosome blir pH senket, Fe³⁺ frigjort og redusert av STEAP3 til Fe²⁺. Jernet blir transportert ut av endosomet via DMT1 og apo-Tf blir exocyttert.

(3) Opptaket av NTBI. Jernet blir redusert og transportert inn i cellen via en carrier-mediær prosess.

(4) Opptaket av ferritin. Ferritin binder seg til en spesifikk reseptor og blir endocyttert. Endosomet blir styrt til et lysosom og jernet blir skilt ut i jernpoolen eller som endogent ferritin. (5) (6) Opptaket av hemprodukter. Heme produkter binder seg til den spesifikke reseptorer som CD91 og endocytteres. Hem blir fjernet og degradert av HO. Restene blir dirigert ut av cellen og til gallen eller nedbrutt av lysosomer. (7) Opptaket av lactoferrin. Lactoferrin binder seg til LRP eller RHL-1 og blir endocyttert og fraktet til lysosomer for nedbrytning. (8) Jernfrigivning. Jern blir løslatt fra cellen og eksportert ut ved hjelp av FPN 1, og deretter oksidert ved hjelp av Cp slik at det kan binde til apo-Tf.

TfR1: transferrin reseptor 1, TfR2: transferrin reseptor 2, STEAP3: six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 3, Tf: transferrin, DMT1: divalent metal transporter 1, NTBI: non-transferrin bound iron, ZIP14: zink-regulerende transporter og jern-regulerende transporter like protein 14, LRP: low-density lipoprotein reseptorrelatert protein, FPN: ferroportin.

2.9 Frisetting av jern fra hepatocytter og makrofager

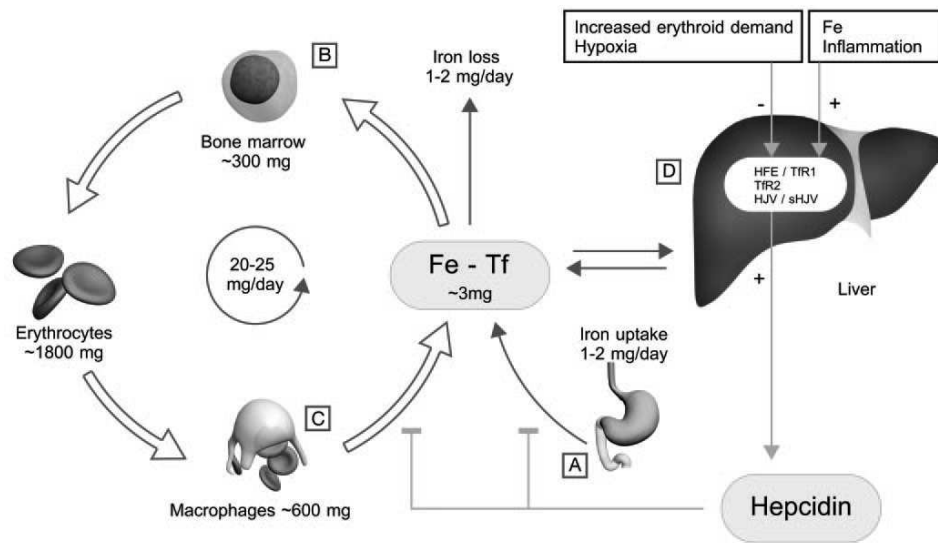
Hepatocytterne fungerer som et av hovedjernlagene i kroppen, mens makrofagene fungerer mer som et mellomlager. Det viser seg at bare ca. 20 % av jernet normalt blir løslatt fra lageret ved normal tilstand, det vil si at det hele tiden vil bygge seg opp et lager, men hos normale personer er bidraget til lageret så lite at dette ikke vil føre til noen sykdom. Dette er et mye større problem hos HH, som tar opp altfor mye jern og det da blir overført mer til lageret, og disse vil da bli mer og mer fulle. Man har funnet ut mye om hvordan opptaket av jern i hepatocytterne skjer, men frisettingen er et større mysterium. Det man har funnet ut er at frisettingen av jern er avhenging av temperatur og øker ved tilstedeværelse av apo Tf, citrat og deferrioksamin (Desferal®) [28]. Deferroksamin er et legemiddel som kan gis til personer ved en jernforgiftning eller som har et jernoverskudd som ikke kan fjernes med årelating, for eksempel thalassemi, se ytterligere beskrivelse under behandling (4.2). Deferroksamin er et chelaterende pulver med høy binding til Fe^{3+} og aluminium. Det binder til seg fritt jern fra celler og plasma, i tillegg til jern fra ferritin og hemosiderin. Det dannes så komplekser som lett blir skilt ut hovedsakelig gjennom urinen. Fordelen ved denne behandlingen er at det ikke binder seg til jern som er bundet til andre proteiner som Hb [54].

Det vil si at bruker man Deferroksamin så vil man få en økning av utskillelse av jern fra hepatocytter og makrofager slik at jernlagret går ned.

Man har også sett at graden av frisetting varierer ved mengden oksygen til stede. Det er derfor mulig at oksygen er innblandet i en redoksreaksjon. Men til syvende og sist ser det ut til at det er FPN 1 som er hovedeksportør av jernet ut av disse cellene slik som i enterocytterne, bare at i dette tilfelle blir jernet oksidert av plasma CP istedenfor HEPH, for så og bli tatt opp av apo-Tf etterpå [28, 47].

Den siste og kanskje viktigste oppdagelsen de siste årene innen dette feltet har vært hvordan peptidet hepcidin som produseres i leveren påvirker jernopptaket. Hepcidin er et lite β -sheet-rikt peptid med en hairpin struktur på 25 aminosyrer (aa), som kan måles i blod og urin. Det er også funnet hepcidin med bare 22 og 20 aa i urinen, som er kuttet på N-terminalen [55]. Hepcidin har også en antibakteriell effekt på både gram positive og negative bakterier samt sopp [41, 56]. Kommer tilbake senere hvordan dette peptidet fungerer og reguleres.

Figur 7: Jern i kroppen



Figuren viser hvor vi finner mesteparten av jernet i kroppen. Jernet blir tatt opp av enterocytene, fraktet inn i blodbanen til transferrin, videre til beinmargen som produserer erythrocytter og til slutt makrofagene som bryter disse ned og sender jernet tilbake til sirkulasjonene igjen. Vi ser også at leveren blir som en buffer og kontrollør av systemet. Vi legger også merke til hvor hepcidinet har sine angrepspunkt [44].

3.0 Molekylær regulering av jernopptaket

3.1 Hvordan blir jernopptaket regulert?

Siden det ikke finnes noen mekanismer for å kvitte seg med jern, er det viktig at reguleringen av opptaket, transporten og lagringen av jern blir nøye regulert [28].

Mengden av jern som blir absorbert er avhenging av ulike faktorer som jernlager, forandring i erytropoese, hypoksi, inflammasjon, infeksjon og graviditet [41]. Disse faktorene er med på å styre uttrykket av de ulike enterocytiske proteinene som har med jerntransport å gjøre, spesielt DMT1, DcytB og FPN 1, både på mRNA og protein nivå.

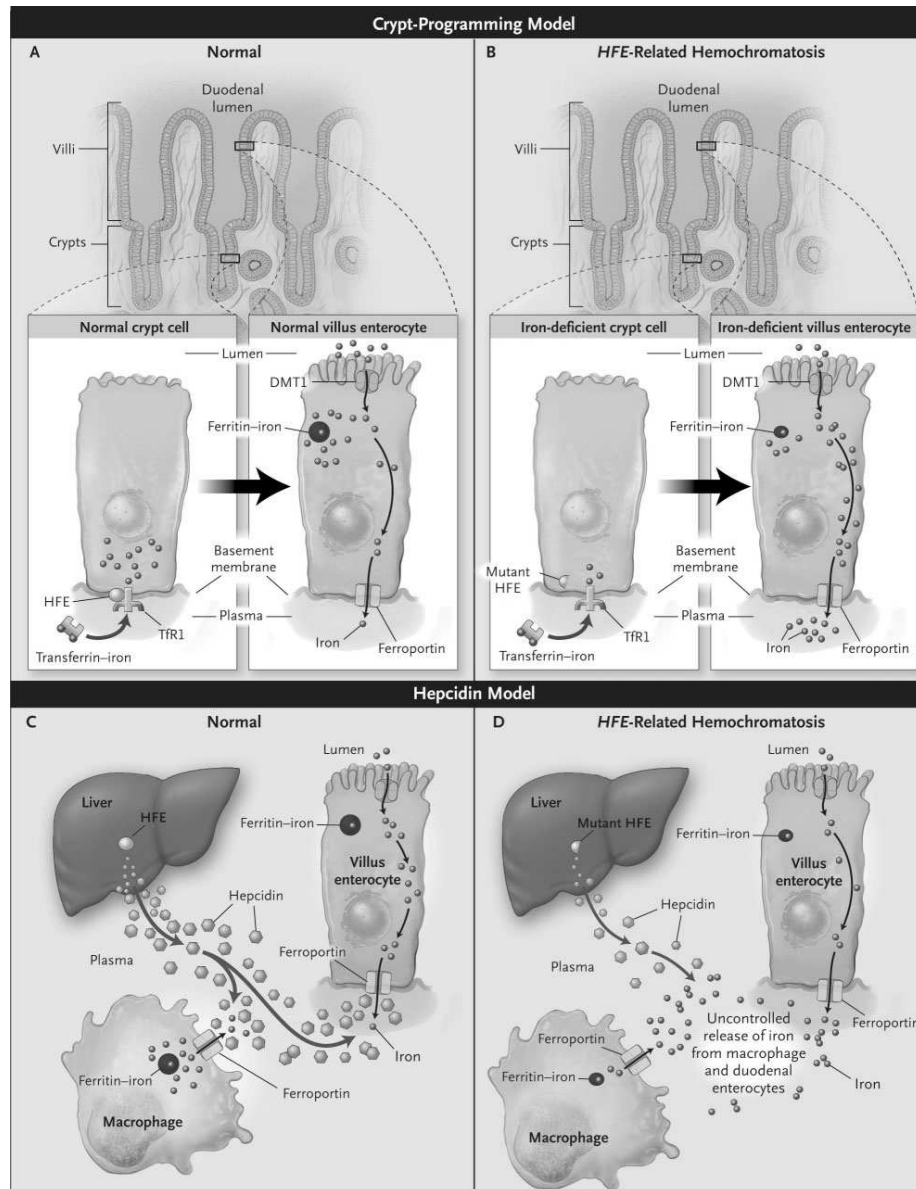
Oppdagelsen av hepcidin førte til utfordringer i forhold til gjeldende oppfatning av hvordan kroppen styrte opptaket av jern. Denne oppfatningen bestod av at enterocytene ble programmert i krypten (kryptteorien) ved at det ble tatt opp Tf fra blodbanen, og ut fra dette ble DMT 1, DcytB og FPN 1 regulert opp eller ned alt etter hvor mye jern som ble tatt opp. Tf mettingen (Tf-sat) i blodet gjenspeiler godt den generelle jerntilstanden i kroppen, så derfor var det logisk å tenke at det var Tf som styrte reguleringen. I tillegg så finnes også HFE på kryptceller, som styrket teorien enda mer, siden genfeil på dette genet kan føre til overskudd av jern.

Ut fra nyere studier viser det seg at dette antagelig ikke er helt riktig og at det er hepcidin som er hovedmekanismen for regulering av jernopptaket. Det er i studier vist at den tiden det tar fra for eksempel erytropoesen øker til jern absorpsjonen øker er ca. 4 dager. Man har da funnet ut at dette er den tiden det tar før kroppen oppdager at jernnivået er lavt for deretter klare å nedregulere hepcidin. Studiene viser også at hepcidin har mer å si for reguleringen av reseptorene i forhold til det konkrete opptak, enn oppregulering av FPN1, DMT 1 og DcytB i krypten [32, 56, 57]. I studier gjort på Caco2 celler og mus, som har blir stimulert av hepcidin i 24 timer, ser man tydelig at antallet DMT 1 reseptorer går ned og opptaket synker [58, 59]. Mens en annen studie både på cellekulturer og mus, der det er injisert hepcidin, har vist at det er forskjell på reguleringen av FPN 1 i makrofagene og enterocytene. I makrofagene var det en kraftig nedregulering av FPN 1 etter bare 4 timer, mens det var ingen umiddelbar endring i reguleringen i enterocytene. Først etter 24-72 timer kunne man se endringer. Dette kan muligens forklares med at FPN 1 har en annen isoform på enterocytten som trenger sterkere og eventuell lengre påvirkning av hepcidin enn i makrofagene for å bli påvirket. Dette er også logisk siden makrofagene resirkulerer 20-24 mg jern/døgn, mot 1-2 mg jern/døgn for enterocytten, og vil da være en mye bedre og større buffer enn enterocytene [59-61].

Det er ikke alle som er helt enig i hepcidinteorien heller og mener at det er en blanding av hepcidin og kryptteorien [62], men jeg har tatt utgangspunktet i hepcidin teorien slik de fleste forskningsgrupper skriver om den nå.

Det er også kommet en teori om at det i hovedsak er to mekanismer som påvirker opptaket av jern. Den ene styrer opptaket inn i enterocytten mens det andre styrer opptaket fra enterocytten til sirkulasjonen. Slik det kan se ut blir også DMT1 regulert lokalt i cellen, men antagelig da i forhold til hvor mye jern den har tatt opp fra tarmen, og ikke i forhold til hvor mye jern som er i kroppen. Det vil si kommer det mye jern ned i tarmen vil enterocytten nedregulere DMT1 og omvendt. Mens den basolaterale transporten blir mer styrt av det systemiske apparatet med hepcidin i forhold til det behovet kroppen har. Det er ennå litt uklar hvordan begge disse blir regulert. [32, 40, 57, 63, 64]. Fra studier som er gjort på mus og Caco-2 celler viser det seg at man ved stor tilgang på jern får endocytose av både DMT 1 og FNT 1 reseptorer, noe som tyder på at dette er en rask og effektiv reguleringsmekanisme [26]. Ser vi mer på oppregulering av antall reseptorer i detalj, så kan det ser ut til at DMT 1 blir regulert ved at overskuddsjern binder seg til "iron regulatory proteins" (IRPs), som da igjen binder seg til et "iron responsive elements" (IREs) på DMT1s mRNA og påvirker dens uttrykk. En stimulering av IRE på DMT1 mRNAet vil da føre til en nedregulering av reseptoren. DcytB har ingen IRP aktivitet, så den må bli regulert på en annen måte, som ennå ikke er kjent [57]. Hvordan disse signalene blir brukt i kroppen forskes det en god del på nå [40, 45].

Figur 8: Den gamle krypt programmeringsmodellen mot den nye hepcidin modellen



Her ser vi forskjellen på hvordan de tenker seg at reseptorer på enterocytten blir regulert. Vi ser på den øverste tegning den klassiske krypt teorien, der den umodne enterocytten regulerer antallet reseptorer i forhold til konsentrasjonen av transferrin i blodet når den ennå er i krypten. Når den da etter noen dager kommer opp til villi så har den opp eller nedregulert etter om kroppen trenger jern eller ikke. Mens den nye hepcidin teorien går ut på at det er peptidet hepcidin som produseres i leveren som er som en bremse på disse reseptorene, både direkte og indirekte, ved å opp- og nedregulere antallet reseptorer. [64]

Hepcidin er en negativ regulator. Det vil si at jo mer hepcidin der er i blodbanen, jo mer vil den bremse opptaket av jern ved å binde seg til FNT 1 og stoppe utstrømningen av jern fra FNT 1 uttrykkende celler. Siden hepcidin regulerer utstrømningen av jern, hvordan blir så hepcidin regulert? Det viser seg at hepcidin blir produsert når det tas opp mye jern og ved inflammasjoner og infeksjoner, mens det blir nedregulert ved graviditet, jernmangel, hypoksi (oksygenmangel) og ved økt erytropoese. Dette skjer via transkribering av HAMP genet, som

koder for hepcidin [41, 55]. Dette tyder på at hepcidin har mye med reguleringen av opptaket av jern å gjøre. Dette peptidet lager da en direkte link mellom leveren, beinmargen og tarmene for å justere det daglige behovet for jern. Hepcidin regulerer bare transporten ut av enterocytten og vil derfor ikke hemme opptaket av jern fra tarmen. Men fordi enterocytten bare er aktiv 2-3 dager før den blir avstøtt ut i tarmen, kommer da mye av det jernet som er tatt opp ikke til nytte og forsvinner ut med avføringen [47].

En annen mulig regulering av hepcidin går ut på at HFE og Tf kan binde seg til et overlappede bindingssete på TfR1, her vil de konkurrere om hvem som bindes til reseptoren. Det vil si at hvis konsentrasjonen av Tf går opp, vil den fortrenge bundet HFE, som vil føre til økt antall frie HFE på cellemembranen. Det motsatte vil skje ved lite Tf. Det foreslås at ubundet HFE på overflaten av cellen vil være med å stimulere en signalvei, som igjen fører til økt utskillelse av hepcidin og nedregulering av TfR 1. Dette kan forklare hvorfor man vil få minsket utskillelse av hepcidin ved feil på HFE genet [28, 50, 57, 65]. I en helt ny studie av Schmidt et al [50] fant de ut at HFE blir skjøvet vekk fra TfR1 og vil binde seg til TfR2, som slik at man får et signal inn i cellen, som vil regulere hepcidin produksjonen. Denne signalveien er ennå ikke helt forstått. Om man må ha både ”diferric-Tf” og HFE bundet til TfR2 for at dette signalet skal aktiveres er ennå usikkert. Det man kan se er om tilgangen på diferric Tf går ned vil også utskillelsen av hepcidin gå ned og man vil få økt opptak av jern [28, 66]. I TfR2 knockout mus fører mangel på TfR2 til en HH lignende tilstand [67].

Muligens kan det hepatiske jernlagret også ha noe å si for opptaket, der lav cellulært jerninnhold vil øke uttrykket av TfR1 på cellemembranen. Dette fører til at flere HFE bindes til TfR1 i tillegg til at TfR1 utkonkurrere TfR2, siden den bindingen har 30 ganger sterkere affinitet for diferric Tf. Begge disse mekanismene vil minske utskillelsen av hepcidin og opptaket av jern vil øke. Har man for mye jern vil det motsatte skje og man får minsket opptak [37, 57].

Den siste kjente måten kroppen regulerer hepcidin på er gjennom hemojuvelin (HJV), som er i en familie kalt repulsive ”guidance molecules” (RGM). Det hersker imidlertid ennå noe usikkerhet på hovedfunksjonen til HJV. Dette er et protein som finnes i mange vev som lever, skjelettmuskler og hjerte. I tillegg finnes det i en løselig form i plasma. Høyt innhold i muskler og hjerte, kan tyde på at de signaliserer sitt jernbehov gjennom løselig HJV, men mekanismen her er ennå uklar. Det kan vise seg at det er lavere innhold av dette proteinet i leverceller hos enkelte pasienter som har fått påvist HH, noe som tyder på at det er her dette proteinet også regulerer hepcidin.

HJV er koblet til inflammasjon, men ikke til erythropoesen og jern nivå. Det kan være at dette proteinet binder seg til noen av overstående proteinene eller at det på cellemembranen i hepatocytter binder seg til "bone morphogenetic" (BMP), slik at dette sender et signal inn i cellen via et "familieprotein" som kalles SMAD og man får regulert hepcidin transkripsjonen (figur 10) [28, 37, 45, 57, 65, 68].

Det er også vist en nær sammenheng mellom mengde kobber og opptaket av jern. Ved mangel på kobber i en studie gjort på mus, viste det seg at de ikke klarte å oppregulere FPN 1 ved minsket tilgang til jern. Kobber er også viktig som en kofaktor i Cp og hephaestin som kroppen bruker til å oksidere Fe^{2+} til Fe^{3+} slik at jernet kan binde seg til Tf i blodbanen [37, 57].

Ved en eventuell inflammasjon eller infeksjon, ser man en økt hepcidinproduksjon, for at makrofagene antagelig skal holde igjen jernet inne i cellene. Dette gjøres sannsynligvis for å assistere immunforsvaret ved å minske tilgangen på jern. Hvis inflammasjonen eller infeksjonen blir kronisk, kan dette føre til at erythropoesen ikke får tilført nok jern og man vil da få en mild form for anemi [32, 69].

3.2 Hvordan blir DMT1, TfR, ferritin og FPN regulert?

For å gå litt mer i detalj på hvordan de ulike proteinene i jernmetabolismen reguleres må vi se litt mer på hvilke alternative reguleringsmekanismer vi har. Den første er post-transkripsjon (etter at mRNA er skrevet av DNA). Denne reguleringen går ut på at jernet i cellen binder seg til et "iron regulatory protein" (IRP), som da bindes til en spesiell mRNA loop konstruksjon kjent som "iron regulatory element" (IRE). Proteiner som har med transport og lagring av jern har IRE enten i 5`-(ferritin, FPN) eller 3`-(TfR1, DMT1) på den uttransformerte delen (UTR) av sitt mRNA. Det vil si om det er lite jern til stede, vil IRP binds til IRE på 3`-UTR, slik at vi vil få en økning av transkripsjonen av TfR1 og DMT1. IRP vil binde IRE på 5`-UTR og man vil da stabilisere mRNA, slik at man ikke får dannet mer ferritin. Ved mye jern vil IRP ikke klare å binde seg til IRE og man opplever det motsatte. Ser man da på de proteinene som blir regulert via denne veien, så kan det stemme veldig bra. Dersom man har lite jern, så vil produksjonen av TfR 1 og DMT1 gå opp. Mens dersom vi har mye jern så vil vi få mer ferritin til å lagre jernet eller kvitte oss med det gjennom flere FPN 1. Det finnes i hovedsak to typer IRP 1 og 2, og begge har litt forskjellig plass og måter de virker på.

Nitrogenmonoksid og hydrogen peroksid som blir dannet av oksidativt stress vil også være med å regulere TfR1 via IRP 1 og 2, slik at vi får en større produksjon av denne reseptoren [28].

Den andre måten å regulere proteiner på er ved transkripsjonsregulering, for det viser seg at DcytB ikke har noen IRE, men allikevel blir regulert av jernstatus direkte på transkripsjonen. Man har funnet ut at cytokiner som IFN- γ , IL-1 og IL-6 påvirker uttrykket av ferritin, TFR 1, hepcidin og FPN 1 mRNA. Det er også tegn som tyder på at ved hypoksi vil man få transkribert hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1), som igjen er med på og påvirker uttrykket på alle de tidligere nevnte proteinene i tillegg til Tf og CP.

Den siste hovedreguleringsmekanismen er post-translasjon (etter at proteinet er ferdig produsert). Her ser vi at hepcidin binder seg til FPN 1 og nedregulerer denne reseptoren, slik at mindre jern blir sluppet ut av cellen. Diferric Tf binder seg til TfR 2 og stabiliserer den samt forlenger halveringstiden på reseptoren. Dette medfører til at man bremser produksjonen av hepcidin. Til slutt kan aktivisering av proteinkinase C regulere endocytosen av TfR1 [28, 55, 65].

3.3 HFE

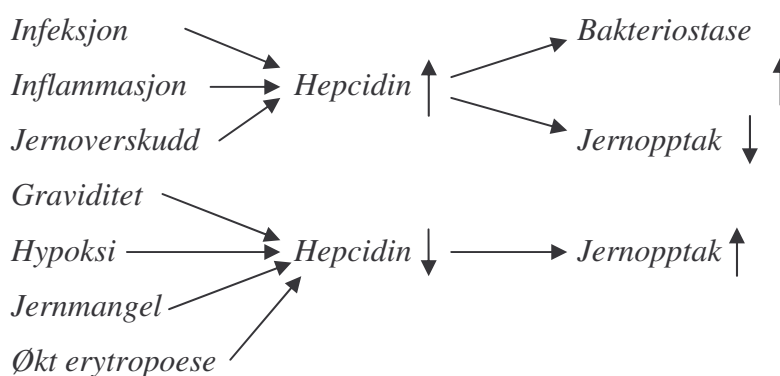
Vi har noen proteiner som ikke er direkte med i opptaket, men som viser seg å være viktige i reguleringen av det allikevel. Som tidligere beskrevet kommer HFE inn her. Man har funnet ut at HFE binder seg til TfR1 i et HFE-TfR1-diferric-Tf kompleks 1:2:1 på celleoverflaten [28, 70]. I HFE knockout mus har man sett at antallet DMT 1 reseptorer blir oppregulert slik at mer jern blir tatt opp både i enterocytter og i hepatocytter. Som følge av at DMT1 blir oppregulert vil også opptaket av NTBI i hepatocytene gå opp [28]. Et annet forsøk på HFE knockout mus har vist en nedgang på ca 70 % i antall TfR1 reseptorer på cellemembranen til hepatocytene. Grunnen til nedgangen i TfR1 er nok økningen av jern i cellen og regulering via IRE- IRP systemet, men det man også så var at opptaket av jern ikke ble redusert, slik som man så ved tilsvarende forsøk på friske [28, 52]. Det er også vist at ved overproduksjon av HFE, vil affiniteten til TfR1 synke i forhold til Tf med 5-10 ganger. Dermed minsker opptaket av Tf bundet jern (TBI), som igjen fører til økt IRP-aktivitet. Resultatet blir økt produksjon av TfR1, men redusert ferritin produksjon. Derfor må HFE ha en viktig reguleringsmekanisme for å bremse opptaket av jern inn i cellen. [28]. I to nye studier er det vist at HFE ikke påvirker jernhomeostasen likt. Studier på genmodifiserte mus viser seg at HFE i kryptceller og makrofager ikke spiller så stor rolle i reguleringen av jern som tidligere antatt [71], men at HFE i hepatocytter har veldig mye å si for reguleringen av jern og da igjennom reguleringen av

hepcidin. Dette har man også sett ved organdonasjon, der friske pasienter har fått lever fra HH pasient og person har utviklet HH, og det motsatte er observert ved at HH pasient har fått frisk lever og jernoverskuddet har forsvunnet [72]. Dette kan igjen støtte hepcidinteorien enda mer. Men det er ennå litt usikkerhet rundt HFE, om den styrer en regulering av hepcidin direkte eller om det går inn i en av de andre reguleringsveiene som vist på figur 10 [72]. Schmidt et al [50] har foreslått i et studiet at løst HFE på cellemembranen binder seg til TFR2 og påvirker hepcidin gjennom den signalveien.

3.4 Heparidin

Det viser seg at hepcidin blir produsert når det tas opp mye jern, ved infeksjoner og ved inflammasjoner, mens det blir nedregulert ved graviditet, jernmangel, hypoksi og ved økt erytropoese. Dette skjer via transkribering av HAMP genet, som koder for hepcidin [41, 55]. Dette tyder på at hepcidin har mye med reguleringen av opptaket av jern å gjøre. Dette peptidet lager da en direkte link mellom leveren, beinmargen og tarmene for å justere det daglige behovet for jern. Gjennom gjentatte eksperimenter har man vist at hepcidin binder seg bare til FPN 1 og hemmer utskillelsen av jern og man har da en systemisk mekanisme for å regulere jernopptaket direkte etter behovet for jern [47, 73]. Der vi har erytropoeseaktivering, jernlager og inflammasjonsregulering, som stimulerer cellen utenfra. Det er i tillegg en intra cellulær regulering [55, 65] (figur 10).

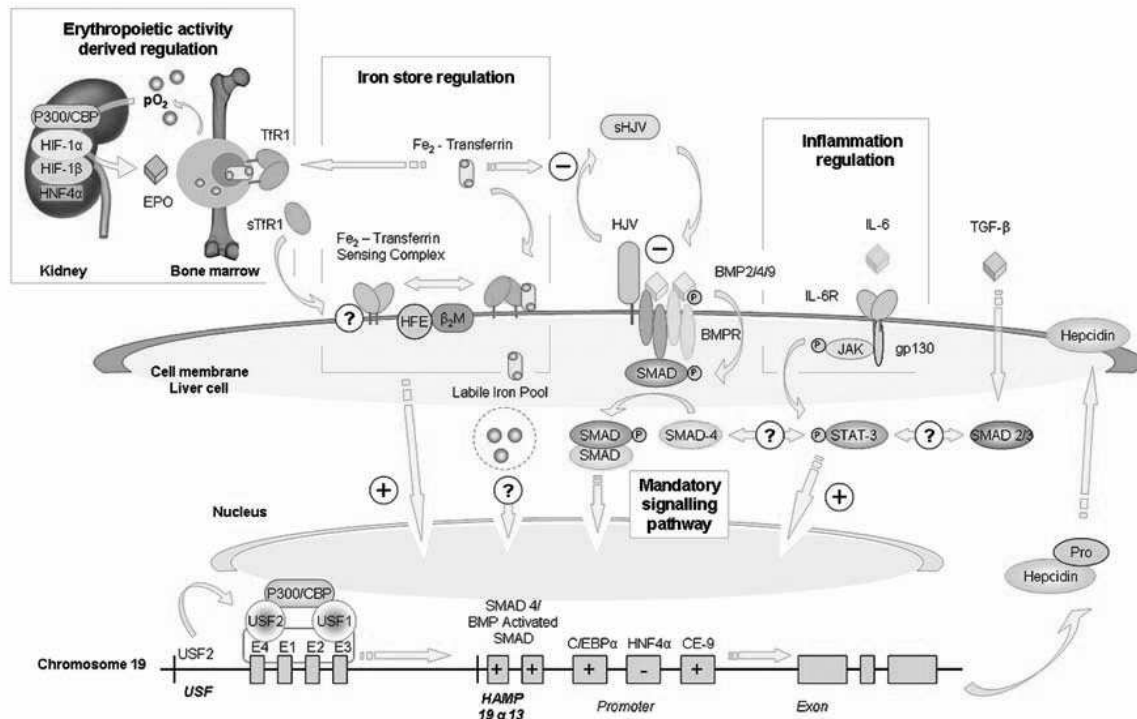
Figur 9: Enkel skjematisk oversikt over hva som påvirker hepcidin og hva som skjer etterpå.



Dette er en forenkling av figur 10.

Figuren viser at det er mange ulike faktorer som spiller inn på produksjonen av hepcidin. Alle disse veiene går inn under ulike mekanismer for regulering av hepcidin som vist på figur 10.

Figur 10: Transkripsjon av hepcidin [55]



Vi har fire hepcidin regulerende veier, erytropoeseaktivisering, jernlager, og inflammasjonsregulering utenfra cellen og intracellulær regulering.

Erytropoeseaktivisering er regulert ved hypoksi induisert erythropoietin (EPO), som blir produsert i nyrene, og sendt videre til beinmargen. Beinmargen kommuniserer med jernlagrende celler ved noen ukjente faktorer. Jernlager styres av at Tf som transporteres i blodet, der disse blir tatt opp via TfR 1/2 i kamp med HFE. Opptaket her er avhengig av antall TfRer og konsentrasjon av Tf i blodet. En direkte link fra jernlagret i cellen til reguleringen av hepcidin er ennå ikke funnet.

Inflammasjonsregulering går via IL-6, har vist seg å reagere mer aktivt enn de andre signalveiene.

Den intracellulær regulering virker gjennom HJV signaloverføring til BMP/SMAD som videre påvirker hepcidin uttrykket. Til slutt har vi metabolske syndrom kandidat gene USF 1 og 2 som styrer direkte HAMP-genet. Her foreslås en direkte link mellom glukose, lipider og jernmetabolismen.

pO₂: partiasial oksygentrykk, HIF: hypoxia inducible factor, CBP: CREB bindende protein, EPO: erythropoietin; HNF: hepatic nuclear factor; TfR: transferrin reseptor, sTfR: soluble Tf, HFE: hemokromatose jern protein, β₂M: b-2 microglobuline, HJV: hemojuvelin, sHJV: soluble HJV, BMP: bone morphogenetic protein, BMPR: BMP reseptor; P: fosfat, SMAD: mothers against decapentaplegic homologue (*Drosophila*), IL: interleukin, IL-6R: interleukin-6 reseptor, gp: glykoprotein, JAK: Janus kinase; STAT: signal transducer and activator of transcription, TGF: transforming growth factor, USF: upstream stimulation factor, E: Ebox, Tf: Transferrin HAMP: hepcidin anti-microbial peptide gene, CE-9: conserved element 9.

4.0 Hva er hemokromatose?

Hemokromatose blir i dag hovedsakelig delt inn i to hovedgrupper, primær- og sekundærhemokromatose. Primær- eller hereditær (arvelig) hemokromatose (HH) er en autosomal, recessivt arvelig tilstand som forklarer 80 - 90 % av pasienter med påvist Denne kan igjen deles inn i flere undergrupper alt etter hvilken/hvilke genmutasjon(er) de har. Den vanligste her er C282Y mutasjonen i HFE-genet på kromosom 6. Ca. 80-85 % av de som utvikler sykdom har denne i homozygot form (C282Y/C282Y) og dette utgjør ca. 0,5 % eller 1 av 200 av den kaukasiske befolkning. En studie gjort i Nord-Trøndelag (HUNT-undersøkelsen) fant at det var ca. 0,7 % som var homozygote, det vil det si ca. 20-30000 personer på landsbasis [7, 74]. Det finnes ca. 12-14 % av den voksne befolkningen som er heterozygote (C282Y/wt) for dette genet, siden de har et friskt og et sykt gen. Flesteparten av disse vil ikke utvikle noen sykdom [4, 5, 74, 75]. Genmutasjonen C282Y fører til at aminosyren cystein er byttet ut med tyrosin på plass 282 på HFE-proteinet. Dette fører til at proteinet ikke helt får den konformasjonen det skal ha. En slik mutasjon kan føre til at proteinet mister deler eller hele dets funksjon, i dette tilfelle at β 2-microglobulin ikke klarer å binde seg skikkelig til HFE [53]. Den andre mutasjonen er H63D, der histidin er byttet ut med asparginsyre, i posisjon 63 i det samme HFE-proteinet. Denne feilen er ca. 22 % feilen er representert i ca 22 % av Europas befolkning. På verdensbasis er denne mutasjonen også i større grad utbredt enn C282Y som hovedsakelig er en kaukasisk genfeil [76]. Det kan se ut som at man i mindre grad utvikler HH ut fra bare H63D, sannsynligvis fordi denne feilen ikke påvirker opptaket i så stor grad. Det finnes personer som er heterozygote for begge disse genfeilene og blir da kalt "compound heterozygote" (C282Y/H63D), disse har igjen større potensial til å utvikle sykdommen. I tillegg er det avdekket genfeil for HJV, HAMP, Tfr2 og FPN 1 som også kan føre til hemokromatose. Disse har Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), delt inn i 4 grupper (tabell 1). Imidlertid hevder mange som arbeider innen feltet jernmetabolisme, at dette er en utilfredstillende inndelingsmåte siden den ikke tar hensyn til verken genotype eller fenotype. Den gir heller ingen rom for å identifisere atypiske eksempler og det er satt opp kunstige genfamilier som ikke finnes. I tillegg finnes det HH tilfeller som ikke er nevnt i OMIM [31, 44].

Sekundære hemokromatose også kalt hemosiderose, en samlebetegnelse på jernavleiringsykdommer og som ikke er direkte knyttet til en genmutasjon. Det kan være sykdommer som talassemi (arvelige blodsykdommer som behandles med blodtransfusjoner), og andre tilstander der man får tilført mye blod ved blodtransfusjon, i tillegg til

leversykdommer og stort alkoholforbruk. Det er også mulig å bygge opp et overskudd ved stort inntak av jerntabletter [4, 77, 78].

Det er imidlertid personer som har HH type 1 altså genfeil på HFE genet som vi har jobbet med i denne oppgaven.

Tabell 1. Genetisk oversikt over primær hemokromatose [79-81]

Sykdom	Arv	Gen	Protein	Locus	Diagnose	Klinisk
Type 1	AR	HFE	HFE	6p21	↑SJ ↑SF ↑Tf-sat	Sen begynnelse 40-50 årene
Type 2					↑SJ ↑SF ↑Tf-sat	Tidlig begynnelse 20 årene
Type 2A	AR	HJV	Hemojuvelin	1p21		
Type 2B	AR	HAMP	Hepcidin	19p13		
Type 3	AR	TfR2	Transferrin reseptor 2	7p22	↑SJ ↑SF ↑Tf-sat	Sen begynnelse 40-50 årene
Type 4	AD	SLC40A1	Ferroportin 1	2p32	=SJ ↑SF =Tf-sat	

Figuren viser de vanligste typene arvelig hemokromatose vi har, der det er vist hvilke arvegenskaper, hvilket gen og locus de påvirker. I tillegg til hvilke parametere som blir forøyet og når man kan forvente at sykdommene muligens inntreffer.

AR, autosomal recessiv; AD, autosomal dominant; SJ, Serum jern; SF, Serum ferritin; Tf-sat, Transferrinmetning

4.1 Oppdagelsen og utviklingen av hemokromatose type 1

Jern har blitt brukt i lange tider til behandling av ulike sykdommer som i gamle Egypt der man brukte rust (jernoksid) som behandling for skallethet, mens i Hellas brukte man en blanding av vin og jern i et forsøk på å gjenopprette potensen hos menn. På 1800-tallet ble jern brukt til å behandle klorose (kombinert jernmangelanemi og albuminmangel). Først i 1932 ble det skikkelig bevist at det er jernoverskudd som forårsaker hemokromatose [2].

Det første kjente tilfelle av denne sykdommen ble beskrevet i 1865 av den franske legen Trousseau, men han brukte aldri ordet hemokromatose. Den første personen som brukte ordet hemokromatose var von Recklinghausen i 1889, fordi han trodde at det jernholdige pigmentet (hemosiderin) i vevene måtte komme fra blod. Den første boka om emnet "Haemochromatosis" ble gitt ut i 1935 av den britiske legen Sheldon, der han analyserte 311 tilfeller som hadde vært beskrevet de siste 70 årene. Han greide å skape et bilde av den patologisk tilstanden, som han mente måtte være forårsaket av en medfødt stoffskiftefeil [80].

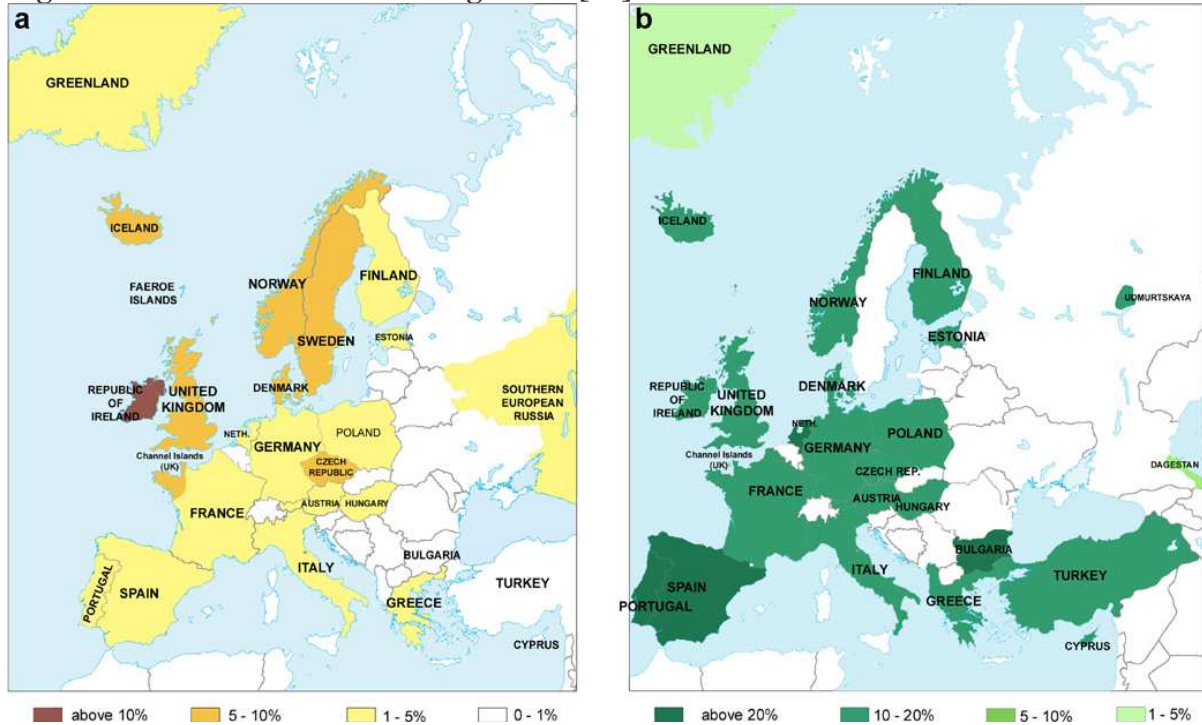
I 1975 greide Simon og medarbeiderne hans [82] å vise at HH er assosiert med HLA-type A3, B7 og B14, og det ble dermed klart at hvis det var et hemokromatosegen, så måtte det ligge på kromosom 6. HFE-genet ble til slutt funnet av Feder og teamet [83] hans i 1996 etter flere års leting fra flere forskerteam. [79, 80] Etter oppdagelsen av dette genet har flere gener i forbindelse med HH dukket opp som vist i tabell 1.

Man er ennå usikker på hvor gammel C282Y mutasjonen er, men den er sannsynligvis en nylig oppstått mutasjon. Noen mener at den oppstod i Nord-Europa for 60-70 generasjoner og ca. 2000 år siden [84], men nyere studier har konkludert med at den kan ha oppstått ca. 4000 år f. Kr [85]. Det har også vært diskusjoner hvor denne genefeilen oppstod og hvem som har dratt den med og hvor. Andre teorier går ut på at den oppstod i Sentral-Europa og ble spredd med den keltiske-, romerske-, anglikanske-, vikingske- og den siste tidens normanske befolkningsspredningen. Ser vi på kartet (figur 11), kan vi se at det er Irland som har størst forekomst med deler av Norge og Skandinavia ikke langt bak. Vi kan også se at noen befolkningsgrupper har reist rundt i verden og tatt med seg genefeilen på sine reiser slik som vikingene, som antagelig tok genefeilen med seg innover Baltikum og Russland [85].

Allelefrekvensen i Europa er i dag i følge enkelt studier på ca. 3,8 %, mens i studier gjort i Norge kan den være så høy som 6,9 % [86] i en undersøkelse og 8,2 % i den norske HUNT-undersøkelsen [74]. Det er stor variasjoner fra land til land som vist på figur 11 [86]. Grunnen til at mutasjonen antagelig har overlevd såpass godt, kan være den gunstige fordelingen med at den kan ha beskyttet unge kvinner mot jernmangel, da spesielt når man gikk fra jakt og fiske og over til jordbruk der tilgangen på jern ble mindre [80, 85].

H63D genefeilen viser seg å være betydelig eldre og har større allelefrekvens på opptil 25 % i Europa og er mer spredd ut over hele verden [85].

Figur 11:Utbredelsen av C282Y og H63D [85]



Her ser vi allelefrequensen på de to mutasjonene i Europa, det mangler data fra noen land. a) C282Y og b) H63D. Som vi ser er H63D mye større og jevnere utbrett enn C282Y.

4.1.1 Type 1 HFE-hemokromatose

Som vist i tabell 1 har OMIM beskrevet 4 forskjellige typer av primær hemokromatose.

Type 1 er genfeil på HFE genotop der det i hovedsak er to hovedgenfeil, den mest vanlige C282Y, der aminosyren cystein har byttet plass med tyrosin. Denne feilen gjør at disulfur broen på $\alpha 3$ loopen, slik at proteinet få en annen konformasjon som igjen fører til at HFE ikke klarer å binde til seg $\beta 2$ -mikroglobulin (figur 5). Dette fører igjen til at HFE ikke blir transportert til cellemembranen, men blir værende i ER og det midtre golgieapparatet, hvor det raskt blir nedbrutt [28, 51]. I den andre vanlige og en god del eldre mutasjonen H63D, har aminosyren histidin byttet plass med asparaginsyre. Denne feilen sitter oppe på $\alpha 1$ loopen og har da ikke så mye å si for bindingen til $\beta 2$ -mikroglubulin, men mer til bindingen til TfR1, som blir svakere [28, 79]. Den siste genfeilen påvirker ikke jernopptaket så mye som den første, så derfor vil den bare i sjeldne tilfeller danne HH alene. I noen tilfeller finnes mennesker med begge genfeilene ”compound heterozygote” og man har da en større mulighet til å utvikle sykdom enn hvis man bare har den ene feilen i heterozygot utgave.

De to genfeilene vi har sett på i min oppgave, både hetero-, homozygote, i tillegg til ”compound heterozygote”.

Det ble i 1999 også funnet en annen genfeil S65C, i tillegg til en god del andre, men ingen av disse har til nå hatt så veldig mye klinisk verdi i forhold til utvikling av HH, men har man en av disse feilene sammen med at man er heterozygot for C282Y eller H63D, kan sjansene for å utvikle HH øke [79].

Det er ikke mange årene siden man måtte bruke leverbiopsi og kliniske symptomer som hudpigmentering eller diabetes for å diagnostisere sykdommen, men med de nye biokjemiske prøvene som ferritin, Tf-sat og ikke minst genidentifikasjon, er diagnostiseringen blitt mye lettere og man kan klarer å identifisere sykdommen på et mye tidligere tidspunkt, allerede i den prekliniske fasen før organskader har oppstått.

Man har ved studier av nærfamilie til HH pasienter funnet tidlige symptomer som kan øke mistanken for sykdom på et tidligere stadium. Disse kliniske symptomene er kronisk tretthet/utmattelse, ledd og muskelsmerter, nedsatt libido og hepatomegali (forstørret lever). Alle disse sykdommene utenom artropati (leddsykdommer), der man får avleiring av jern i leddkapselen, er knyttet til graden av overskudd [79]. Man vil ved å måle ferritin og Tf-sat nivået i blodet kunne få bekrefte om en person har et jernoverskudd, fordi begge disse verdiene da er forhøyet i forhold til det normale.

4.1.2 Type 2 Juvenile (ungdoms) hemokromatose

HH type 2 deles i en type A og B, der A typen er en sjelden autosomal recessive mutasjon på HJV genet, mens B typen er en sjelden mutasjon på HAMP genet. Som skrevet under jernmetabolismen så deltar antagelig begge disse to proteinene i regulering av hepcidin. Pasienter med denne tilstanden har som regel veldig lave verdier av hepcidin i urinen.

Det som er spesielt med denne typen er at den har så å si alle de samme symptomene på sykdom som type 1, men den dukker opp mye tidligere. Ofte har den allerede utviklet seg til sykdom ofte før pasienten er 30 år. Det er hovedsakelig bare homozygote pasienter som utvikler sykdommen. Ubehandlet sykdom kan også føre til hjertefeil og alvorlige arrytmier. Sykdommen fører til økt transferrinmetting, i tillegg til økte verdier av serum jern og ferritin [79].

4.1.3 Type 3 Transferrinreseptor 2 (TfR2)

Dette er en autosomal recessive genfeil på TFR2. Rollen til dette proteinet er ennå litt uklar i jernmetabolismen, men som beskrevet tidligere, er det indikasjoner på at det betyr noe for signalene til produksjonen av hepcidinproduksjonen, spesielt siden den så og si bare finnes på hepatocytene. Den inngår der som en viktig del av opptaket av jern til hepatocytene gjennom

reseptormediert endocytose. Ved denne typen HH finner man også mange av de samme symptomene som ved type 1, og her er det også hovedsakelig bare homozygote som blir rammet av sykdommen [79].

Det er vist i mutant TfR2 mus at opptaket av jern øker og man får øket jernlager, i tillegg til at hepcidin produksjonen går ned, noe som er med på å understreke at denne reseptoren er med og styrer jernmetabolismen [66].

4.1.4 Type 4 Ferroportin 1 (FPN 1)

I forhold til de tidligere nevnte typene er denne typen autosomal dominant og er forårsaket av en genfeil på SLC40A1 genet som koder for FPN 1. Denne feilen fører til at transporten av jern ut fra spesielt makrofager blir kraftig redusert eller stopper helt opp. Dette vil da føre til en opphopning av jern inne i disse cellene, og tilgjengeligheten til jern for binding til Tf i sirkulasjonen vil minske, og dermed vil jernopptaket øke. I tidlige stadier av sykdommen vil man vanligvis ha Tf-sat normal eller kanskje litt lav, men et høyt serum ferritin. Det kan i noen tilfeller oppstå en mild anemi på grunn av lite tilgang til jern for å opprettholde erytropoesen [31, 79].

4.1.5 Andre former for jernoverskudd

Det er de senere årene også påvist andre mulige proteiner som er kan resultere i jernoverskudd, deriblant genfeil som fører til mangel eller feil på HEPH, Cp, apo-Tf og DMT 1 [87] i tillegg til en kombinasjon av stor hepatisk jernlagring og perinatal leversvikt. Disse er mindre vanlige og er lite forsket på [64].

4.2 Behandling

Referanseverdien for s-ferritin er 18-240 µg/L for kvinner og 34-300 µg/L for menn, mens pasienter kan ha s-ferritin på flere tusen µg/L. Hvis det blir påvist høy ferritin, blir det ofte i tillegg tatt en Tf-sat måling. Hvis denne viser >50 %, så er sannsynligheten stor for at man har hemokromatose. Har man Tf-sat på over 61 % har en undersøkelse vist at sensitiviteten og spesifisiteten vil være ca. 95 % for hemokromatose [4]. Det blir da ofte sendt en blodprøve til gentesting, for å finne ut hvilke genfeil pasienten eventuelt har. Er denne negativ kan det i noen få tilfeller være aktuelt å ta en leverbiopsi, MR eller CT.

Pasienten vil etter påvist sykdom gå ukentlig eller ca. hver 14 dag til årelating, der man tapper opptil 0,5 L hver gang og får da fjernet ca. 250 mg jern, som teoretisk tilsvarer en nedgang i s-ferritin på ca. 30-50 µg/L per gang. Dette vil si at noen må kanskje gå til tapping i over ett år før når et ferritin nivå på ca. 50 µg/L og som er behandlingsmålet. Når dette nivå er oppnådd,

går pasienten til tapping 4-8 ganger i året for å forebygge et nytt overskudd av jern. Det man ofte ser når man årelater personer med høy ferritin, er at Hb vil gå ned til en viss verdi, varierende fra person til person, for der å bli liggende ganske stabilt helt til man har tappet så mye blod at det blir problemer med å opprettholde erytropoesen [6, 7, 88].

Enkelte pasienter klarer ikke å følge et slikt tappingsregime som for eksempel ved type 4 pasienter der man må ta det roligere for å klare å opprettholde erytropoesen og ikke påføre pasienten en anemi. I noen tilfeller som ved thalassemi, som får blodtransfusjon som behandling, kan man ikke tappe noe blod i det hele tatt. I disse tilfeller blir ofte det tidligere nevnte legemiddelet deferoxamin (Desferal™) brukt. Det som er problemet med dette legemiddelet er at det må gis daglig intramuskulært eller som en kontinuerlig venøs eller som subcutant injeksjon. Siden effekten er dårlig kan man maksimalt klare å få tatt ut ca. 20 mg jern pr dag eller 5-7 gram i året. Der man ved vanlig tapping kan oppnå ca 15-20 g. Man kan i tillegg få allergiske, kardiovaskulære, neurologiske, gastrointestinale og oftalmologisk bivirkninger.

Pasienters egenbehandling vil bli å unngå jerntilskudd i form av jerntabletter [54, 78].

De bør ha et måtehold i forhold til alkohol, dette fordi både jern og alkohol er levertoksisk. Ved påvist leverskade er totalt avhold anbefalt.

Inntakt av Vitamin C bør begrense til under 500 mg/dag.

Det anbefales at man bare bruker mineraltilskudd uten jern, dersom det er påvist mireralmangel.

Man bør være forsiktig med å spise rå skalldyr (østers eller skjell) fra varme farvann på grunn av fare for overføring av en bakterieart som kan påføre disse pasientene en livsfarlig infeksjon [88]. Men i praksis kan man så å si spise og gjøre hva man vil.

Det er også vist at personer som drikker mye te, behandles med protonpumpehemmere eller H₂-blokkerer, trenger færre tappinger enn personer som ikke gjøre det [12].

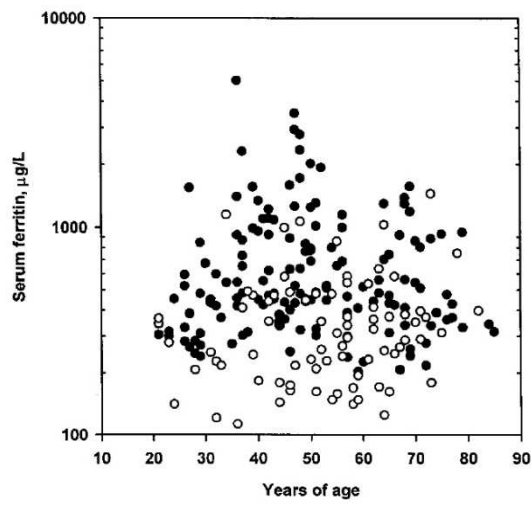
Siden denne sykdommen er så godt korrelert med genfeil, så er det noen som mener at det ikke skulle være noe problem å undersøke alle barn for denne genfeilen ved fødsel og at man da følger disse i oppveksten og i voksen alder. Som tidligere nevnt er antagelig ca. 0,5 % av den hvite nordeuropeiske befolkningen homozygote for HFE genet, mens ca. 14 % er heterozygote [5]. For at det skal være fare for leverskader og eventuell utvikling av andre sykdommer, må ferritin verdien >1000 µg/L, vist i tre studier [89]. I en undersøkelse om HH og høy ferritin som ble gjort på 330 000 blodprøver fra vel 100 000 personer i England, som

var inne på kontroll på sykehus eller hos allmennleger [90], ble funn av ALAT >50 U/L sendt videre til ferritin og Tf-sat testing. Prøvene for personer som hadde fastende Tf-sat >55 % ble sendt videre til gentesting, og der det viste seg at bare 32 stk totalt var homozygote. Ut ifra estimatet om 0,5 %, så skulle man egentlig ha funnet ca. 500 personer. Vi vet derfor lite om grunnen til at det bare slår ut på noen, og ikke alle. Det ble også konkludert med at kostnytteverdien av en total screening av befolkningen var for lav, på grunn av at de bare fant 32 av 100 000 personer som var homozygote i denne studien. De samme tallene fant man også i tre tilsvarende undersøkelser [5, 91, 92]. Dette viser at prevalensen for hemokromatose er lav, 0,36 % for kvinner og 0,72 % for menn som vist i den norske HUNT-undersøkelsen [74]. Dette medfører til at det er vanskelig å forutsi hvem som utvikler sykdommen, og det kan forklare at det også kan være andre tilstander som kan forårsake høyt ferritin, og at det er bedre å behandle tilstanden når den dukker opp senere i livet, og ikke bare konkludere med at høyt ferritin automatisk er hemokromatose [5].

Resultater fra en studie viste stor korrelasjon mellom ferritinverdi ved det tidspunktet diagnosen ble satt, og antall venøse tappinger de måtte ha før de kom ned til en verdi <50 µg/L. Dette viser at s-ferritin er et bra mål for jernstatus i resten av kroppen og ikke minst i leveren [90]. Etter erfaringer fra flere studier deriblant HUNT-undersøkelsen [74] og flere utenlandske data om overdødelighet hos hemokromatose pasienter med levercirrhose, er det beregnet at fenotypisk screening av 1000 menn ved 30-årsalder kan spare 8 kvalitetsjusterte leveår, til en screeningkostnad på ca. 1750 kroner per kvalitetsjusterte leveår [93]. HUNT-undersøkelsen viste at man kan måle Tf-sat med en relativt lav kostnad på US\$ 1,6 pr screening, hvis man utfører den sammen med andre undersøkelser. Det vil så bli en kostnad på US\$ 390 for hver oppdaget tilfelle (kurs 7,6) [74]. Problemet med å innføre en screening ved fødsel er at man da må følge opp alle som har disse genfeilene. Som tidligere nevnt er det ikke alle som utvikler jernoverskudd, mens andre som ikke har genfeil, også kan generere stort overskudd. Det beste alternativet vil derfor være å ta en enkel ferritin og Tf-sat test ved vanlig rutineundersøkelse når man kommer opp i 20-30 åra.

På figur 12 fra [74] ser vi at ferritinverdiene for nyoppdagede HH tilfeller varierer veldig i forhold til alder. Dette kan vi også se blant de friske i våre data (figur 15), selv om våre personer har langt fra så stor spredning. Vi ser også at mennene ligger høyere enn kvinnene på ferritin nivå, noe som kan forklares ved menstruasjonstap. Dette ser vi også tydelig i våre data (figur 15).

Figur 12: Serum ferritin plottet mot alder. [74]



Her ser vi at man har plottet serum ferritin mot alder i 228 nyopptagede tilfeller av HH. Svart er menn og hvit er kvinner. Vi ser forekomsten er høyere hos menn. Vi ser også at det stor variasjon i hvor mye ferritin hvert individ har. Y-aksen er logaritmisk.

5.0 Metode:

Protokoll ble skrevet (*11.1 prosjektprotokoll*). Protokollen sammen med søknad om å få utføre dette kliniske studiet på mennesker ble sendt til den regional etisk komité (REK vest). Det ble også sendt en søknad til Datatilsynet grunnet behandling av personopplysninger til personene som skulle være med i studiet vårt.

Alt ble godkjent, med noen små endringer.

Del 1: Prosess for å finne friske frivillige.

5.1 Screening av frivillige på BKK Kokstad og Frank Mohn as Sandsli (FRAMO).

Det ble opprettet kontakt med sykepleierne på de respektive bedriftene. Vi fikk rekruttert 20-25 personer på hver plass til en frivillig screening. Prøvene ble tatt ikke fastende mellom 9 og 13 de respektive dagene vi var på bedriftene.

Det ble fylt 4 glass blod, 2 EDTA glass der det ene ble raskt pakket inn i aluminiumsfolie og 2 gelglass. Gelglassene ble stående ca. 50 minutter før de ble sentrifugert ved 3000 omdreninger/min i 10 minutter.

Prøvene ble analysert av personell på LKB, der følgende parametere ble testet Hb, B-EVF, B-Leukocytter, B-Tromocytter, MCV, CRP, Ferritin, Tf-sat, EPP-IX, Transferrinreseptor, Jernbindingskapasitet, s-jern, ALAT, ALP, GT, Albumin

Noen av disse prøvene ble bare brukt som støtteanalyser.

5.1.1 Inklusjonskriterier

Inklusjonskriterier var de samme for kontrollgruppen og for hemokromatose pasienter. De måtte være over 18 år, mens gravide og personer med annen alvorlig sykdom ble utelatt. Hb 11,5 – 17,5 g/dL og CRP < 5 mg/L. Etter å ha sett over resultatene, var det kun en person i kontrollgruppen som ikke oppfulgte kravene til å delta videre i studien, dette på grunn av Hepatitt b. Det var noen personer som lå i ytterpunktene av referanseområdet da spesielt med tanke på ferritin. To menn var litt over referanseområdet og en var litt under, disse ble allikevel tatt med i kontrollgruppen. Alle kvinnene var innenfor s-ferritin referanseintervallet.

5.2 Jernbelastningstest

Personene møtte fastende, til avtalt tid mellom 0800-0900. Det ble først tatt en 0-prøve, det ble så gitt en Niferex™ 100 mg jernkapsel sammen med et glass vann. Deretter ble det tatt en ny prøve etter 1 og 2 timer.

Jernbelastningstest ble utført i henhold til standard jernbelastnings prosedyre ved LKB. (11.4 jernbelastningstest)

Ved 0-prøven ble det fylt opp 1 EDTA glass og 3 gelglass med blod. For at man ville undersøke Hb, MCV, CRP, GT og ALAT, i tillegg til ferritin og Tf-sat. Ved prøve 1 og 2 ble det bare fylt 1 gelglass, og det ble bare testet for Tf-sat.

De som var med i studien skulle i utgangspunktet bare lov til å drikke vann mens de ventet, men ble de veldig sultne så kunne de spise et eller to rundstykker med ost etter prøve 1, som beskrevet i utlevert skriv (11.2 informasjonsskriv). Alle gelglassene ble stående i ca. 45-55 min, for så å bli sentrifugert med på 3000 omdreninger/min i 10 min.

Det ble gjennomført screening av 26 menn.

1 person ble ekskludert fra studien på grunn av Hepatitt b.

5 personer trakk seg fra studien av ulike grunner, ikke skrevet under samtykkeskjema (1), sykt barn (1) eller på reise (3).

Det ble gjennomført 20 jernbelastningsprøver på menn.

Det ble gjennomført screening av 19 kvinner, ingen ble ekskludert.

4 personer trakk seg fra studien av følgende grunner, syk barn(1), reise (2) og ukjent/møtte ikke opp (1).

Det ble gjennomført 15 jernbelastningsprøver på kvinner.

Ei av kvinnene ble dårlig etter prøve 1 og drog hjem og vi fikk dermed ikke tatt prøve 2 av henne.

5.3 Prøvetakning av hemokromatosepasienter

Hemokromatosepasienter ble rekruttert av prof. dr med. Rune J. Ulvik via poliklinikken ved Haukeland universitetssykehus. Pasientene som ble rekruttert til prosjektet var hovedsakelig pasienter som nettopp var blitt utredet og skulle starte med årelating. Disse gjennomførte samme prosedyre som beskrevet under del 2 jernbelastningstest.

Vi fikk tatt prøver av 10 pasienter med hemokromatose.

6.0 Analysemetoder.

6.1 *Transferrin (Total jernbindingskapasitet (TIBC))*

For å analysere Transferrin konsentrasjonen i serum ble det brukt analysemaskin Modular p 800 fra Roche. Dette er en helautomatisk fotometrisk testing maskin, som ved å tilsette reagens 1 (R1) og reagens 2 (R2) an analyserer antallet Transferrinmolekyler i blodet.

R1 består av Phosphate buffer 55 mmol/L, pH 7,2; NaCl: 25 mmol/L; polyethylene glycol (PEG): 5 %; konserveringsmiddel.

R2 er Anti-human transferrin antibodies (fra kanin): avhengig av titreringsvæske; NaCl: 100 mmol/L; konserveringsmiddel.

Fremgangsmåte:

Prøven blir tilsatt R1 som buffer.

R2 blir så tilsatt og reaksjonen starter, Anti-Tf antistoffer reagerer med antigenet i prøven og danner et antigen/antistoff kompleks. Man får så en sammenklebning av disse kompleksene, som man måler ved hjelp av turbidimetri. Tilsetting av PEG gjør at reaksjonen går raskere til endepunktet og blir mer sensitiv.

Dataen blir oversendt til en datamaskin der man kan lese av verdiene.

Denne analysemetoden har et måle-området mellom 1.26-126 $\mu\text{mol/L}$ (0,1-10,0 g/L). Omregningsfaktor på 25,1 $\mu\text{mol/g}$ for omregning fra g/L til $\mu\text{mol/L}$ [94, 95]

$$\text{TIBC } (\mu\text{mol/L}) = 25,1 (\mu\text{mol/g}) \times \text{Transferrin } (\mu\text{mol/L})$$

6.2 *Serum Jern (s-jern)*

For å finne jernkonsentrasjonen bundet til TF i serum ble det brukt analysemaskin Modular p 800 fra Roche. Dette er en helautomatisk fotometrisk testing maskin, som ved å bare tilsette reagens 1 (R1) og reagens 2 (R2) får ut konsentrasjonen av jern bundet til Tf i serum.

R1 består av citric acid 200 mmol/L; thiourea: 115 mmol/L; detergent (rensemiddel).

R2 består av Natrium ascorbat 150 mmol/L; FerroZine: 6 mmol/L; konserveringsmiddel.

Fremgangsmåte

Prøven blir tilsatt R1 som buffer og rensemiddel.

Deretter blir R2 tilsatt, reaksjonen starter og vi får reaksjonen

Tf-Fe³⁺ komplekset $\xrightarrow{\text{pH} < 2,0}$ apo-Tf + Fe³⁺

Det sure miljøet i løsningen fører til at jern bundet til Tf, blir frigjort.

Fe³⁺ $\xrightarrow{\text{ascorbat}}$ Fe²⁺

Ascorbat reduserer jernet slik at vi får alle jernatomene over på Fe²⁺ form slik at de lettere kan detekteres, ved hjelp av FerroZine.

FerroZine + Fe²⁺ → farget kompleks

Det fargede komplekset blir detektert ved hjelp av fotometri, der fargeintensiteten er proporsjonal med konsentrasjonen av jern i løsningen. Dataen fra analysen blir sendt til en datamaskin der verdiene kan avleses [96].

6.3 Ferritin

For å finne ferritin konsentrasjonen i serum ble det brukt analysemaskin Modular E 170 fra Roche. Dette er en helautomatisk fotomultimetrisk maskin, som ved å tilsette reagens 1 (R1), reagens 2 (R2) og reagens 3 (R3) bestemmer konsentrasjonen av ferritin i serum.

R1 består av Anti-ferritin-Ab~biotin 18 mL: Biotinylated monoclonat anti-ferritin antistoff (mus) 3,0 mg/L; fosfat buffer 100 mmol/L, pH 7,2; konserveringsmiddel.

R2 består av Anti-ferritin-Ab~Ru (bpy)₃²⁺ 18 ml: Monoclonalt anti-ferritin antistoff (mus) merket med ruthenium kompleks 6,0 m/L; fosfat buffer 100 mmol/L, pH 7,2; konserveringsmiddel.

R3 består av Streptavidin-coated mikropartikler 12 mL: streptavidin-coated mikropartikler 0,72 mg/L; konserveringsmiddel.

Fremgangsmåte:

10 µL av prøven blir tilsatt R1 og R2, det vil bli dannet et sandwichkompleks mellom de to ulike antistoffene og med ferritin i midten.

Så blir R3 tilsatt og sandwichkomplekset blir bundet til Streptavidindekterte antipartikler via en binding mellom biotin og streptavidin. Ikke bundet substrat blir fjernet med ProCell.

Det bundne komplekset blir så dratt ut og overført til en målingscelle, der mikropartiklene blir magnetisk farget på overflaten på elektroden. Strøm blir påsatt elektroden, som igangsetter en kjemoluminesens emisjon, som kan måles med et fotomultimeter. Resultatet blir sammenlignet med en kalibrert standardkurve og sendt til en datamaskin for avlesning.

Prøveanalysen tar 18 minutter [97].

6.4 Transferrinmetningen (Tf-sat).

For å finne Tf-sat må man ha s-jern og transferrin, disse finner man ved de beskrevne analyser over, og settes opp i denne ligningen.

$$Tf - sat = \frac{s - jern \frac{\mu mol}{L}}{transferrin \frac{\mu mol}{L}} * 100\%$$

6.5 Hemoglobin (Hb)

For å finne konsentrasjonen av hemoglobin i blodprøven, bruker man analysemaskinen CELL-DYN 4000, som utfører absorpsjonsspektrometri.

Denne maskinen er bygget på prinsippet med at det er en lineær sammenheng mellom mengden lys som blir absorbert ved en bestemt bølgelengde i en godt mikset og stillestående prøve, vil være lik konsentrasjonen i prøven i sin helhet.

Instrumentet virker med at den fortynner prøven og bruker hemoglobinkomplekset som lysabsorberende kilde.

Før Hb konsentrasjonen blir funnet, blir alle RBCer fullstendig ødelagt (lysert), ved hjelp at CELL-DYN 4000 Hemoglobin Reagent. Blandingen blir så overført til en singel chromagen som har en absorpsjonstopp på 544 nm. Så blir følgende målt.

1. Mengden lys som kommer igjennom "Hemoglobin Flow Cell", når den er fylt med lysert prøve.
2. Mengden lys som kommer igjennom "Hemoglobin Flow Cell", når den er fylt med bare ren Hemoglobin Reagent.

Man finner da forskjellen på den mengden lys som kommer igjennom "Hemoglobin Flow Cell" i de to tilfellene. Forskjellen er den mengden lys Hb har absorbert, og man kan da sammenligne den mengden lys med en forhåndskalibrert lineær kurve, for å få ut nøyaktig konsentrasjon av Hb i blodprøven. Det ble også utført en del andre standard analyser, som ble brukt til støtteanalyser. Disse er nevnt under metodedelen, men disse går jeg ikke inn i detalj på hvordan disse ble utført [98].

7.0 Resultater

7.1 Kontrollgruppen

Gjennomsnittsalder (range) for kontrollgruppen var 40.0 år (26-60) for menn og 39.7 år (22-56) for kvinner. Gjennomsnitt s-ferritin (range) var for menn 167.5 µg/L (15-322) og 63.3 µg/L (15-132) for kvinner (figur 13A og 13B). Vi ser at ferritinverdiene er mer samlet hos kvinnene, i forhold til hos mennene der spredningen går fra under til over det normale referanseområdet. Referanseområdet for de ulike prøvene vi har brukt på kontrollgruppen finnes i tabell 2.

Av støtteanalyser som er gjort, lå de fleste analysene innenfor det normale referanseområdet. Det var 2 menn som hadde litt for lave trombocytverdier og 17 av mennene hadde litt forhøyet albumin (tabell 3 B). Grunnen til at så mange hadde forhøyt verdi er usikkert, men det skal ikke ha noe å si for de studien vi har gjennomført. Alle kvinnene lå innenfor de respektive referanseområdene.

Andre elementer som kan ha påvirket resultatene våre, var at en mann hadde spiste frokost og en hadde drukket en kopp kaffe. Hos kvinnene hadde ei spist en God morgen yoghurt og drukket en kopp kaffe, mens ei hadde tatt en slurk te (tabell 3B og 4B). Det var i tillegg en mann som hadde gjennomgått en mikrobakteriell infeksjon 3 måneder før prøvetakning. Om disse avvikene har påvirket studien er usikkert, men vi har behandlet de som at det ikke har gjort det og tatt de med i kontrollgruppen.

Sammenligner vi Hb og s-ferritin (figur 14A og 14B), ser vi at det er en liten korrelasjon mellom Hb og serum ferritin hos menn $r^2=0,23$ og ingen hos kvinnene $r^2=0,01$. Grunnen til at mennene har bedre korrelasjon enn kvinnene kan ha med at ferritinverdiene hos mennene har en større spredning. Setter vi hele gruppen sammen så øker korrelasjonen til $r^2=0,41$, selv om at dette heller ikke er noe god korrelasjon. At det er en slik korrelasjon strider jo egentlig mot det som er normal lære, der man mener at Hb stiger opp til et visst punkt og så flater ut, punktet varierer litt fra person til person. Grunnen til denne økningen i Hb kan være at det muligens er en liten sammenheng mellom god tilgang på jern og økt erytropoese. Det er vanskelig å trekke noen klare slutninger, siden det er så stor spredning og at prøvematerialet er så lite.

Tabell 2: Referanse området for en del av de parametrene vi har testet for.

	Hb (g/dL)	MCV (fL)	Ferritin (µg/L)	Tf-sat (%)	EPP IX (µmol/L eryt)	TfR (mg/L)	s-jern 0-p. (µmol/L)	TIBC (µmol/L)
Kvinner	11,7-15,3	82-98	18-240	20-50	0-1,9	1,9-4,4	9,0-34	49-83
Menn	13,4-17,0	82-98	34-300	20-50	0-1,9	2,2-5,0	9,0-34	49-83

Tabell 3A: Jernbelastningstest på de mannlige kontrollpersonene, n=20

Id	Alder (år)	Hb (g/dl)	Ferritin (µg/L)	Tf-sat 0-p. (%)	Tf-sat 1-p. (%)	Tf-sat 2-p. (%)	Tf-sat 1-Tf-sat 0 (% poeng)	Tf-sat 2-Tf-sat 1 (% poeng)	Tf-sat 2-Tf-sat 0 (% poeng)
1	33	14.5	138	33	34	32	1	-2	-1
2	39	17.4	144	27	32	33	5	1	6
3	46.5	16.5	265	25	24	25	-1	1	0
4	40	14.9	285	31	35	43	4	8	12
5	47.5	14.2	35	27	36	60	9	24	33
6	27.5	15.2	138	31	33	33	2	0	2
7	49	14.3	139	40	49	63	9	14	23
8	32.5	16.6	174	43	43	49	0	6	6
9	47.5	15.6	51	23	27	41	4	14	18
10	34	14.9	35	40	41	59	1	18	19
11	46.5	16.3	322	23	26	27	3	1	4
12	45.5	16.2	241	27	30	34	3	4	7
13	39	15.3	242	36	42	50	6	8	14
14	28	14.8	67	23	23	27	0	4	4
15	41	14.7	15	23	36	59	13	23	36
16	37.5	14.6	126	51	56	61	5	5	10
17	32.5	15.8	122	37	48	64	11	16	27
18	60	16.2	218	41	55	73	14	18	32
19	46.5	16.1	300	41	40	42	-1	2	1
20	26	15.5	293	51	53	63	2	10	12

Gjen.snitt	40.0	15.5	167.5	33.8	38.1	46.9	4.5	8.8	13.3
95 % konfid. int for mean	35.9- 44.1	15.1- 15.9	121.6- 213.4	29.4- 37.9	33.4- 42.9	39.9- 53.9	2.4- 6.6	5.0- 12.5	7.8- 18.7
Range	26-60	14.2-17.4	15-322	23-51	23-56	25-73	-1-14	-2-24	-1-36
Std. Avvik	8.75	0.88	98.13	9.09	10.15	15.03	20.6	63.3	136
Varians	76.50	0.78	9630.2	82.66	103.0	225.8	1.01	1.78	2.61
Std. Error	1.96	0.20	21.94	2.03	2.27	3.36	4.54	7.95	11.7

Tabell 3B: Andre relevante prøver hos de mannlige kontrollpersonene, n=20.

Id	MCV (fL)	s-jern 0-p. (µmol/L)	s-jern 1-p. (µmol/L)	s-jern 2-p. (µmol/L)	TIBC (µmol/L)	Annet
1	96	21	21.5	20.4	63	
2	93	19.5	22.5	23.3	71	
3	94	17.7	16.6	17.2	70	
4	90	18.1	20.3	24.8	58	
5	99	22.3	29.6	49.4	83	*1
6	87	20.8	22.1	22.4	67	
7	102	23.2	28.6	36.5	58	
8	88	38.1	38.3	43.5	89	
9	94	16.6	19.7	29.4	72	
10	94	26.6	27.4	39.4	67	*2
11	91	15.3	17.1	17.9	66	
12	102	16.7	18.1	20.7	61	
13	91	22.1	25.8	30.7	62	
14	95	16.5	16.3	19.2	71	
15	89	21.8	34.2	55.3	94	
16	96	35	38.1	41.6	68	*3
17	93	21.5	28	37.2	58	
18	98	25.2	33.4	44.7	61	
19	91	27.8	27.4	28.8	68	*4
20	99	27.8	28.6	34	54	*5

Gjen.snitt	94.1	22.7	25.7	31.8	68.1	
95 % konfid. int for mean	92.1-96.1	19.9-25.5	22.5-28.9	26.5-37.1	63.2-74.9	
Range	87-102	15.3-38.1	16.3-38.3	17.2-55.3	54-94	
Std. Avvik	4.34	6.04	6.87	11.28	10.36	
Varians	18.83	36.54	47.16	127.3	107.4	
Std. Error	0.97	1.35	1.54	2.52	2.32	

*1 B-Trombocyt: 132 (10**9/L), *2 spist frokost *3 B-Trombocyt 141 (10**9/L) *4 1 kopp kaffe. *5 Hadde en mikrobiologiskinfeksjon 3 måneder i forkant av prøvetakningen.

Tabell 4A: Jernbelastingstest hos de kvinnelige kontrollpersonene, n=15

Id	Alder (år)	Hb (g/dl)	Ferritin (µg/L)	TF-sat 0-p. (%)	TF-sat 1-p. (%)	TF-sat 2-p. (%)	TF-sat 1- TF-sat 0 (% poeng)	TF-sat 2- TF-sat 1 (% poeng)	TF-sat 2- TF-sat 0 (% poeng)
30	22	13.3	53	37	47	63	10	16	26
31	39.5	14	94	21	24	37	3	13	16
32	37.5	14.1	42	23	24	32	1	8	9
33	35.5	14	117	22	23	28	2	5	7
34	38.5	13.3	29	21	38	53	17	15	32
35	43.5	13.8	132	34	37	37	2	1	3
36	36.5	13.8	18	19	36	54	17	18	35
37	34.5	12.9	15	12	14	20	2	6	8
38	39.5	14.2	96	29	36	54	7	18	25
39	53.5	14.1	118	22	23	28	2	4	6
40	29.5	13.4	63	16	24	i.u.	7	i.u.	i.u.
41	46.5	13.9	33	25	36	51	11	16	27
42	41.5	14.7	19	25	29	43	4	14	18
43	56	12.5	44	11	14	24	2	10	12
44	41	12	77	25	26	31	2	4	6
Gjen.snitt	39.7	13.6	63.3	22.7	28.6	39.6	5.7	10.7	16.4
95 % konfid. int. for mean	35.0-44.4	13.2-14.0	41.3-85.4	18.8-26.6	23.38-33.74	31.8-47.4	2.4-9.1	7.3-14.1	10.1-22.7
Range	22-56	12.0-14.7	15-132	11-37	14-47	20-63	1-17	1-19	3-35
Std.Avvik	8.45	0.72	39.79	7.04	9.36	16.54	5.58	5.88	10.86
Varians	71.37	0.52	1583	49.55	87.57	273.6	31.1	34.6	118.0
Std. Error	2.18	0.19	10.27	1.82	2.42	4.27	1.44	1.57	2.90

Tabell 4B: Andre relevante prøver hos de kvinnelige kontrollpersonene, n=15.

Id	MCV (fL)	s-jern 0-p. (µmol/L)	s-jern 1-p. (µmol/L)	s-jern 2-p. (µmol/L)	TIBC (µmol/L)	Annet
30	95	22.4	28.5	38.3	61	
31	102	14.6	16.6	25.7	70	
32	95	13.7	14.2	18.9	60	*1
33	92	17.5	18.7	23	81	
34	97	12.1	22.1	30.9	58	
35	99	24.1	25.7	26.1	70	
36	99	15.7	30	45.3	84	
37	88	9.2	10.4	15.3	77	*2
38	101	22.1	27.1	41.3	76	
39	104	16	17.1	20.4	74	
40	101	12.8	18.6	i.u.	78	*3
41	99	15.1	21.7	31.4	61	
42	102	18.6	21.8	32.1	75	
43	92	7.8	9.2	16.2	68	
44	100	14.4	15.3	17.7	58	

Gjen.snitt	97.7	15.7	19.8	27.3	70.1	
95 % konfid. int. for mean	95.2-100.2	13.2-18.3	16.3-23.3	21.8-32.9	65.3-74.9	
Range	88-104	7.8-24.1	9.2-30.0	15.3-45.3	58-84	
Std.Avvik	4.50	4.64	6.29	9.58	8.71	
Varians	20.21	21.53	39.52	91.83	75.78	
Std. Error	1.16	1.20	1.62	2.47	2.25	

*1 1 god morgen yoghurt og en kopp kaffe *2 En slurk te *3 Ble kvalm og gikk hjem før vi fikk tatt siste prøve

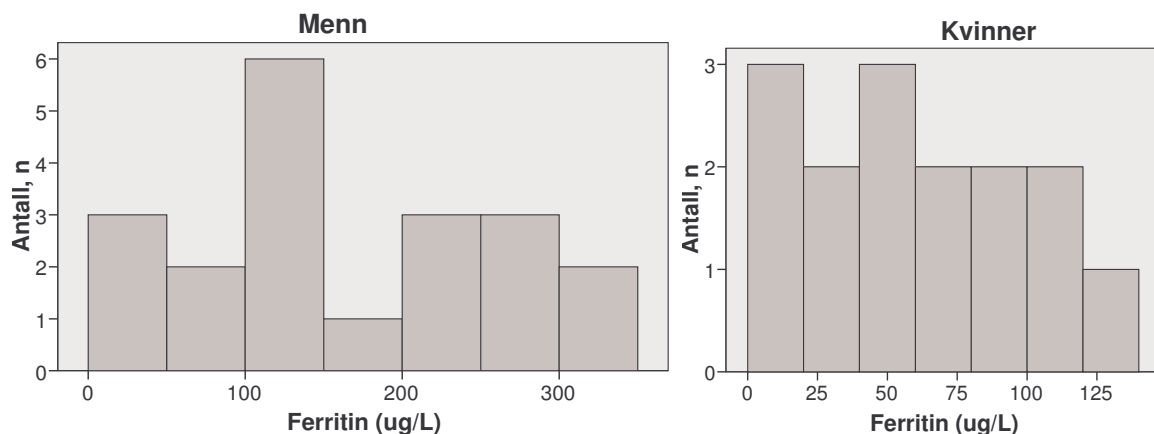
Andre verdier lå innenfor referanseområdet og er derfor ikke tatt med.

Tabell 5: Forskjellene i transferiinmetningen mellom de ulike prøvene i persentiler

Persentiler	Menn			Kvinner		
	Tf-sat 1-0	Tf-sat 2-1	Tf-sat 2-0	Tf-sat 1-0	Tf-sat 2-1	Tf-sat 2-0
2,5 %	-1	-2	-1	1	1	3
50 %	3	7	11	3	12	14
97,5 %	13	23	34	17	19	34

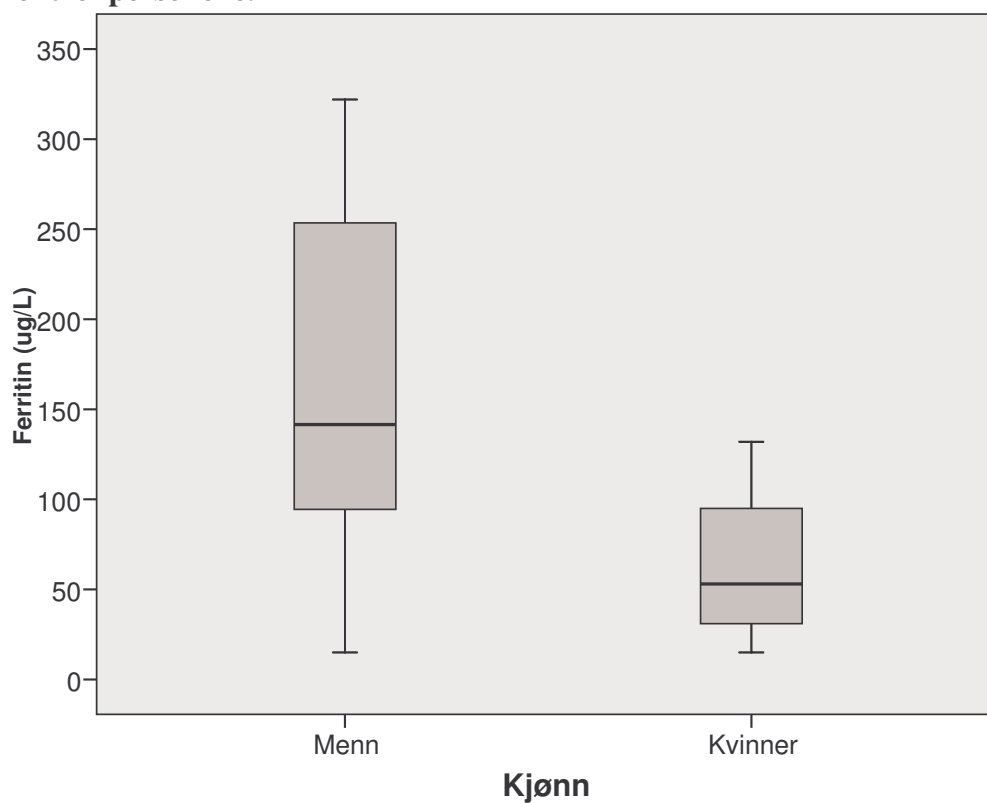
Her er alle tallene oppgitt i % poeng endring. Tallmateriellet er hentet fra tabell 3A og 4A. Vi ser at på 2,5 % persentilen for menn er alle negative verdier, dette fordi en person hadde negativ endring i Tf-sat. Her er muligens 0 % poeng endring bedre å bruke.

Figur 13A: Fordeling av serum ferritin hos de mannlige og kvinnelige kontrollpersonene.



n =20 for menn, n =15 for kvinner. Aldersspredning var for menn 26-60 år og kvinner 22-56 år

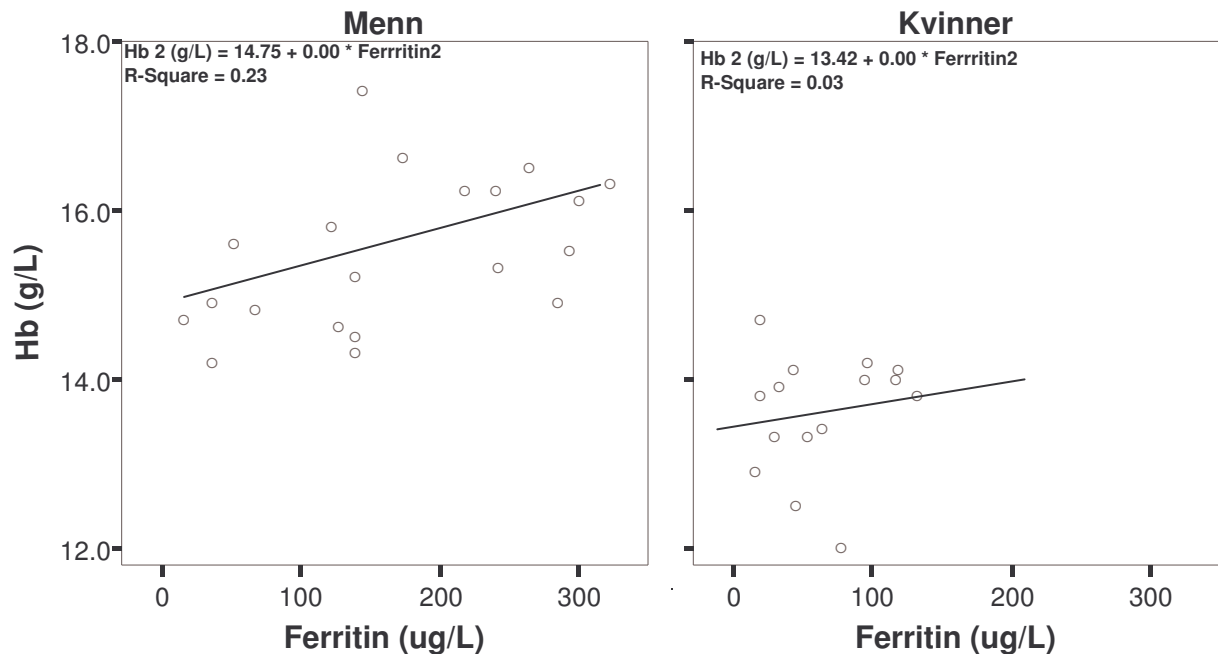
Figur 13B: Spredingen på serum ferritin hos de mannlige og kvinnelige kontrollpersonene.



Boksen representerer 50 % av verdiene, mens øvre og nedre strek representerer størst og minste verdi.

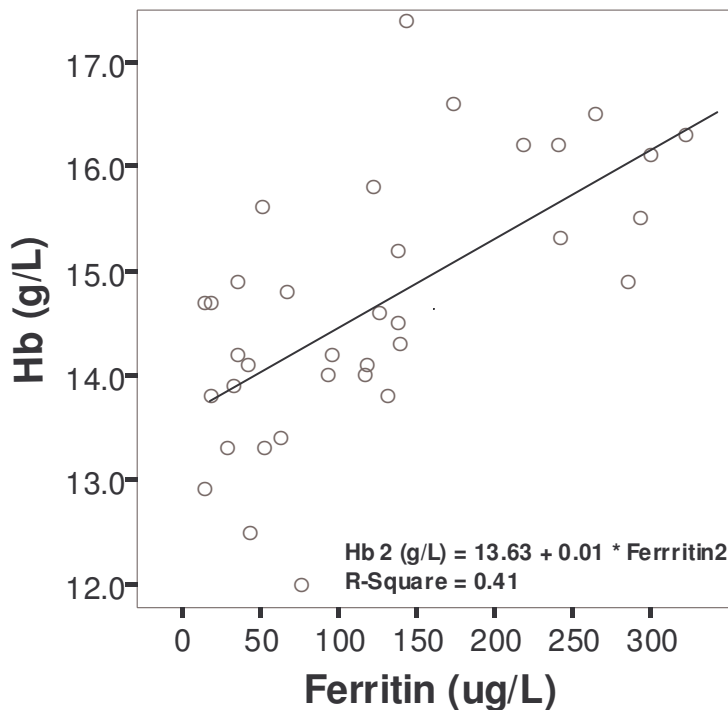
n =20 for menn, n =15 for kvinner. Dette gjelder for alle grafer og tabeller, hvis ikke annet er skrevet. Aldersspredning var for menn 26-60 år og kvinner 22-56 år

Figur 14A: Sammenheng mellom Hb og serum ferritin hos kontrollgruppen.



n = 20 for menn, n = 15 for kvinner Hb = hemoglobin

Figur 14B: Sammenheng mellom Hb og serum ferritin hos kontrollgruppen, menn og kvinner samlet.

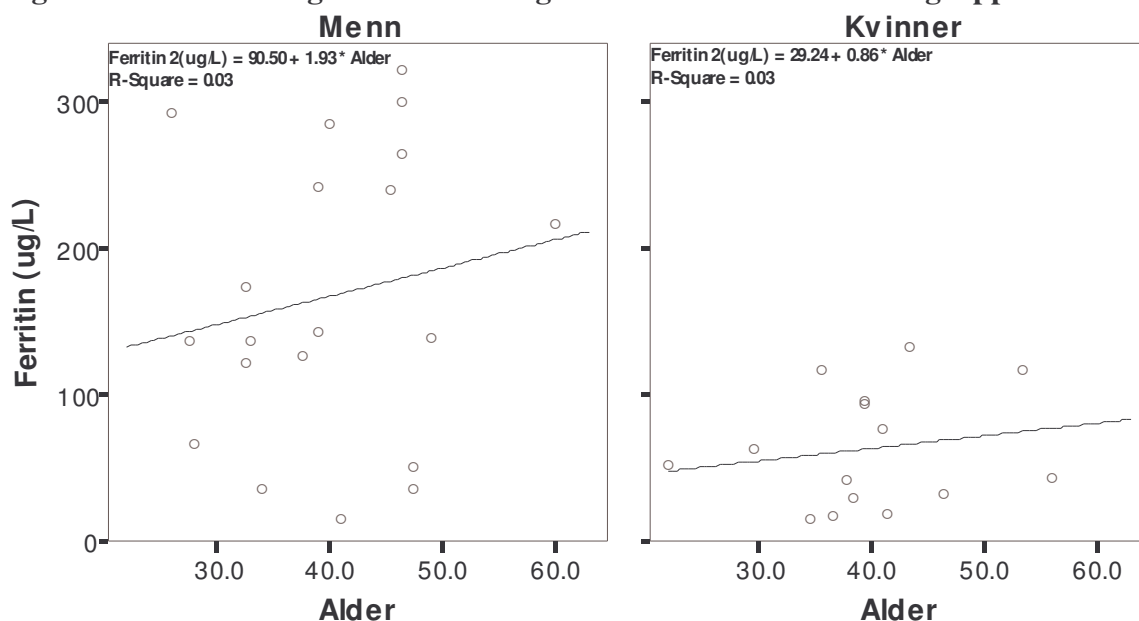


n = 20 for menn, n = 15 for kvinner, samlet n = 35. Hb = hemoglobin

Sammenlignes ferritin og alder (figur 15), transferrinmetning og ferritin (figur 16) og transferrinmetning og Hb (figur 17), kan man se små tendenser på alle figurene, men det er vanskelig og komme med noen klare konklusjoner. Vi finner en signifikant forskjell ($p=0,00$) på gjennomsnittet mellom kjønnene både for Hb og ferritin (figur 14A). Våre data viser også en signifikant forskjell ($p=0,00$) på gjennomsnittet mellom kjønnene på Tf-sat ved 0-prøven (figur 17), men ingen forskjell på endringen i Tf-sat fra 0-prøven til prøve 2 ($p=0,429$) (figur 18). Dette viser at menn ligger høyere enn kvinner både på Hb, ferritin, og Tf-sat, men at opptaket ikke er forskjellig. Hb og ferritin er det velkjente forskjeller, noe som vi ser igjen på et lavere referanseområdet for kvinner (tabell 2). Men at Tf-sat er høyere må antagelig ha med at menn har et høyere gjennomsnitt av s-ferritin og s-jern, men her er referanseområdet likt for begge kjønn.

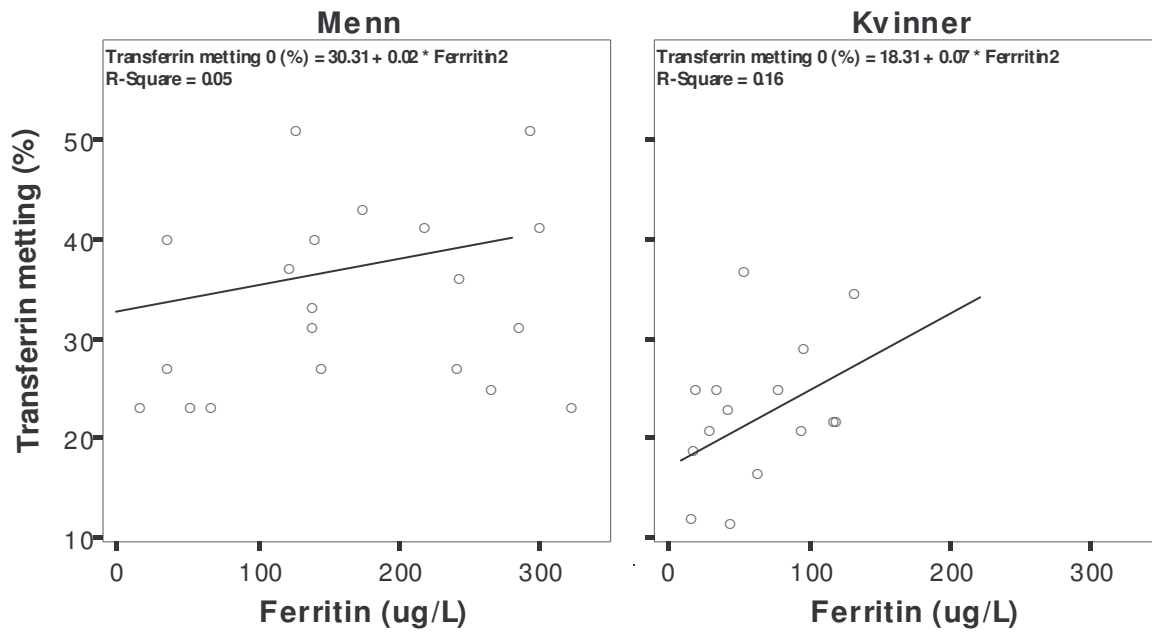
Dataene våre viser også at det er en liten negativ korrelasjon mellom endring i Tf-sat mellom 0-prøven og prøve 2 både hos kvinner med henholdsvis $r^2 = 0,23$ for menn og $r^2 = 0,29$ for kvinner. Dette viser en liten sammenheng mellom økende ferritin gir lavere opptak, men tallene spriker en god del (figur 18).

Figur 15: Sammenheng mellom alder og serum ferritin hos kontrollgruppen.



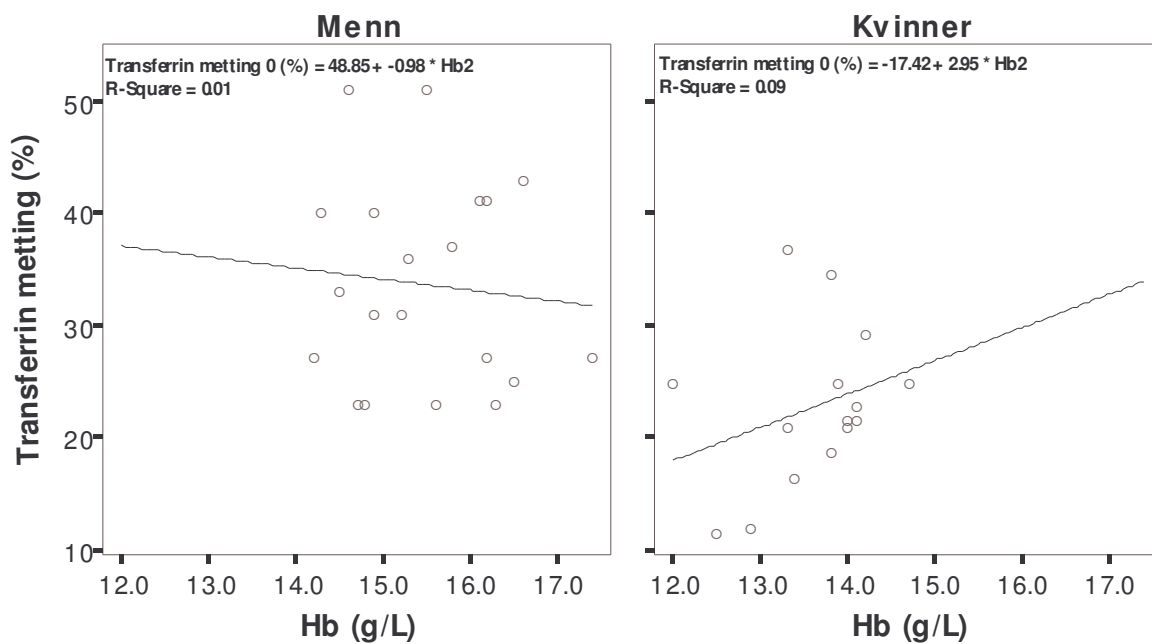
n =20 for menn, n =15 for kvinner

Figur 16: Sammenheng mellom transferrinmetning og serum ferritin hos kontrollgruppen.



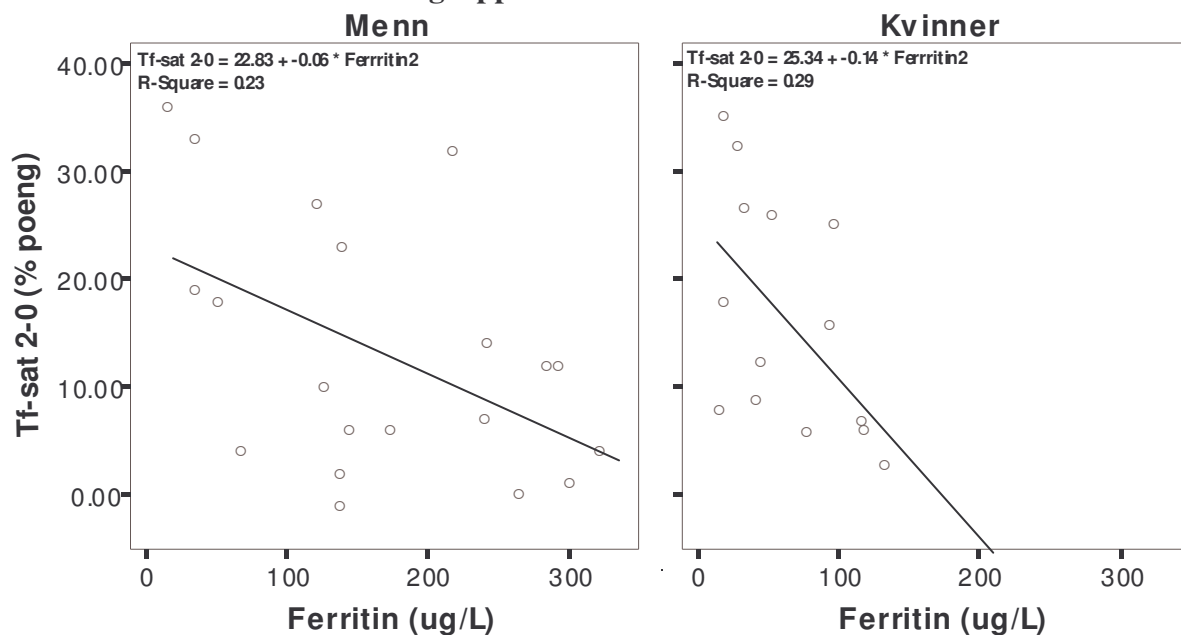
n =20 for menn, n =15 for kvinner

Figur 17: Sammenheng mellom transferrinmetning og Hb hos kontrollgruppen.



n =20 for menn, n =15 for kvinner Hb = hemoglobin

Figur 18: Sammenheng mellom endringen i transferrinmetningen fra 0-prøven til prøve 2 mot serum ferritin hos kontrollgruppen.



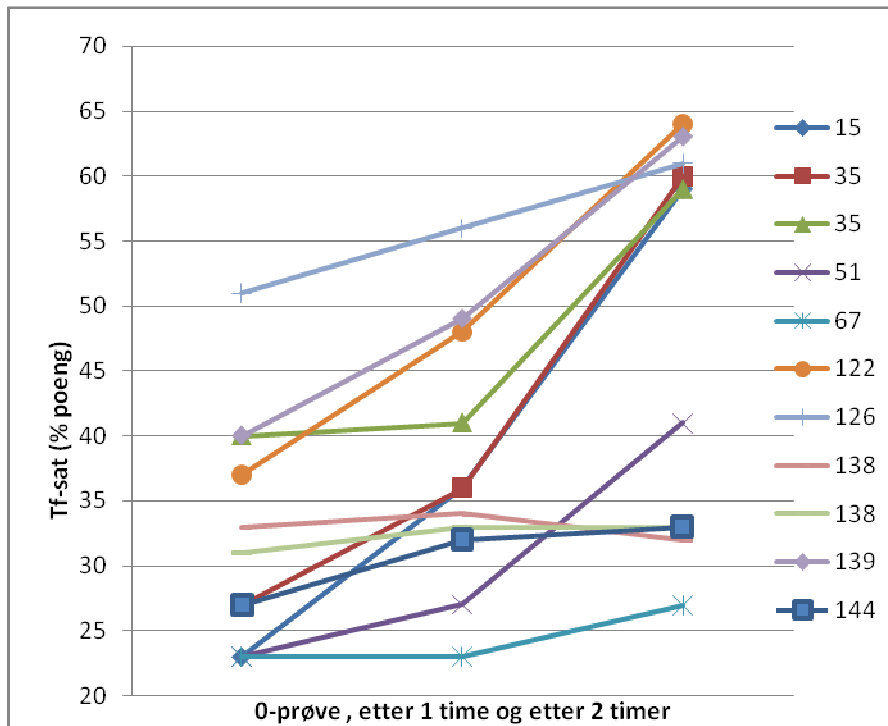
n =20 for menn, n= 14 for kvinner. En kvinne måtte avbryte forsøket, fordi hun ble dårlig.
 Tf-sat = transferrinmetning

Det som kanskje er mest interessant å se på er hvordan Tf-sat har forandret seg mellom 0-prøven, prøve 1 og 2 (tabell 3A, 4A, figur 19A, 19B, 20A og 20B). Det er tydelig at mange av de personene som hadde lav ferritin på <50 µg/L tok opp mye jern og det ses ved at kurven går bratt oppover. Noen personer med ferritin >150 µg/L, hadde også stort opptak. Grunnene til dette kan være mangt, en svak HH, målt ferritin viser ikke reelt jernlager, andre sykdommer som øker ferritin og ikke minst den høye dosen jern de fikk. Ved ferritinverdier >130 µg/L flater kurvene mer ut og de personene hadde dermed et generelt lavere opptak. Enkelte personer hadde tilnærmet ingen opptak. Det var en person som hadde mindre Tf-sat etter 2 timer. Dette kan skyldes feil i målingen eller instrumentene som er brukt, eller så har kroppen til denne personen klart å regulere ned Tf på den tiden.

Det at opptaket syker ved stigende ferritin, stemmer bra med teorien om at jernopptaket styres av det totale jernlagret [61], dette viser også gamle teorier fra 70-tallet om denne sammenhengen [99].

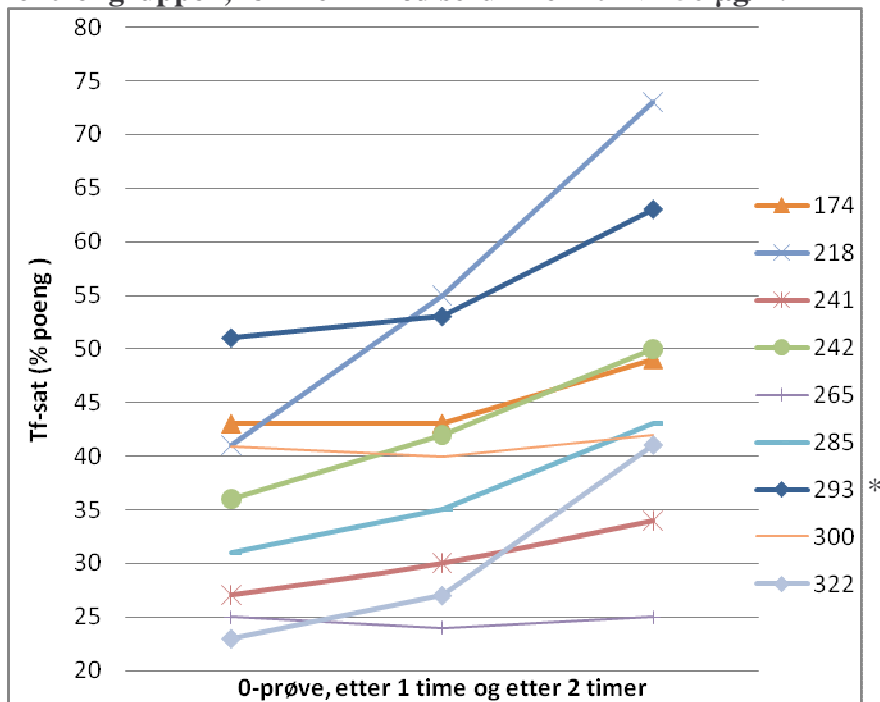
Vi ser at spredningen på endringen av Tf-sat fra 0-prøven til prøve 2 er ganske stor, fra negative verdier hos en mann til 36 % poeng hos en av mann. Vi ser også at det gjennomsnittet både for kvinner og menn ligger til venstre for midten av spredningen, noe som tyder på at det er enkeltpersoner som drar spredningen opp (figur 21).

Figur 19A: Oversikt over endring i transferrinmetningen fra 0-prøve til prøve 1 og 2 i kontrollgruppen, for menn med serum ferritin <150 µg/L.



Tallene på høyre side presenterer ferritin verdien til hvert enkel person
n = 11 menn Tf-sat = transferrinmetning

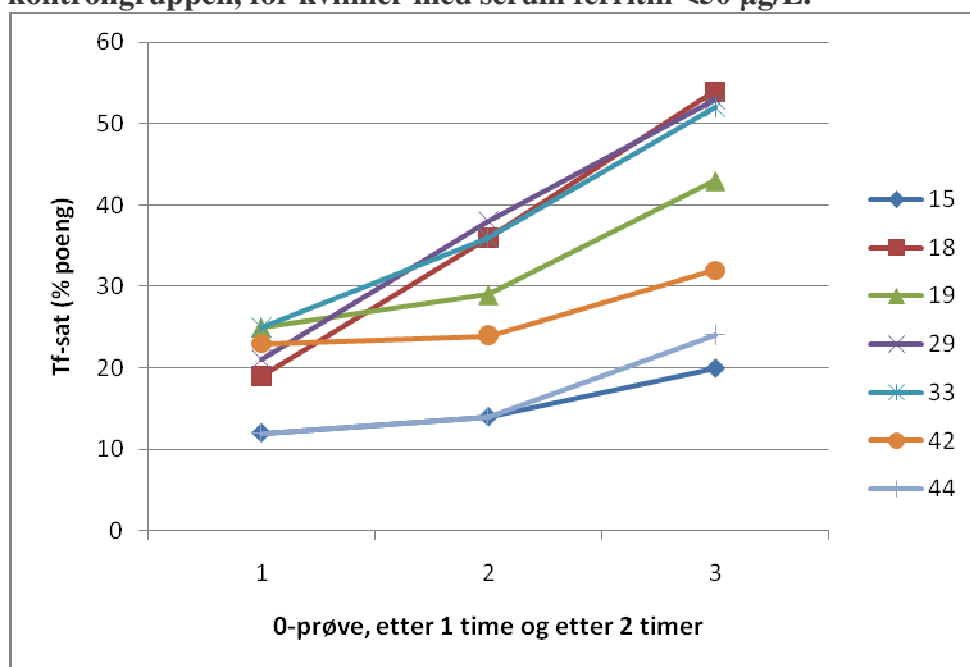
Figur 19B: Oversikt over endring transferrinmetningen fra 0-prøve til prøve 1 og 2 i kontrollgruppen, for menn med serum ferritin >150 µg/L.



Tallene på høyre side presenterer ferritin verdien til hvert enkel person
n = 9 menn Tf-sat = transferrinmetning

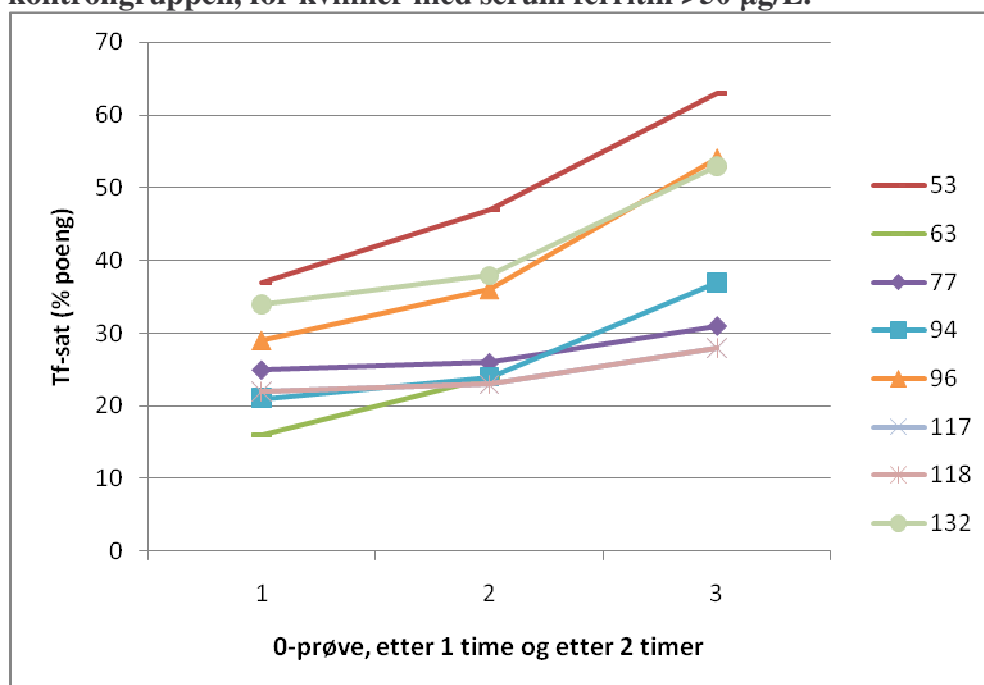
* Personen hadde en mikrobiologiskinfeksjon 3 måneder før prøvetakningen, slik at personen har antagelig forhøyet ferritinkonsentrasjon i forhold til det som er reelt.

Figur 20A: Oversikt over endring i transferrinmetningen fra 0-prøve til prøve 1 og 2 i kontrollgruppen, for kvinner med serum ferritin <50 µg/L.



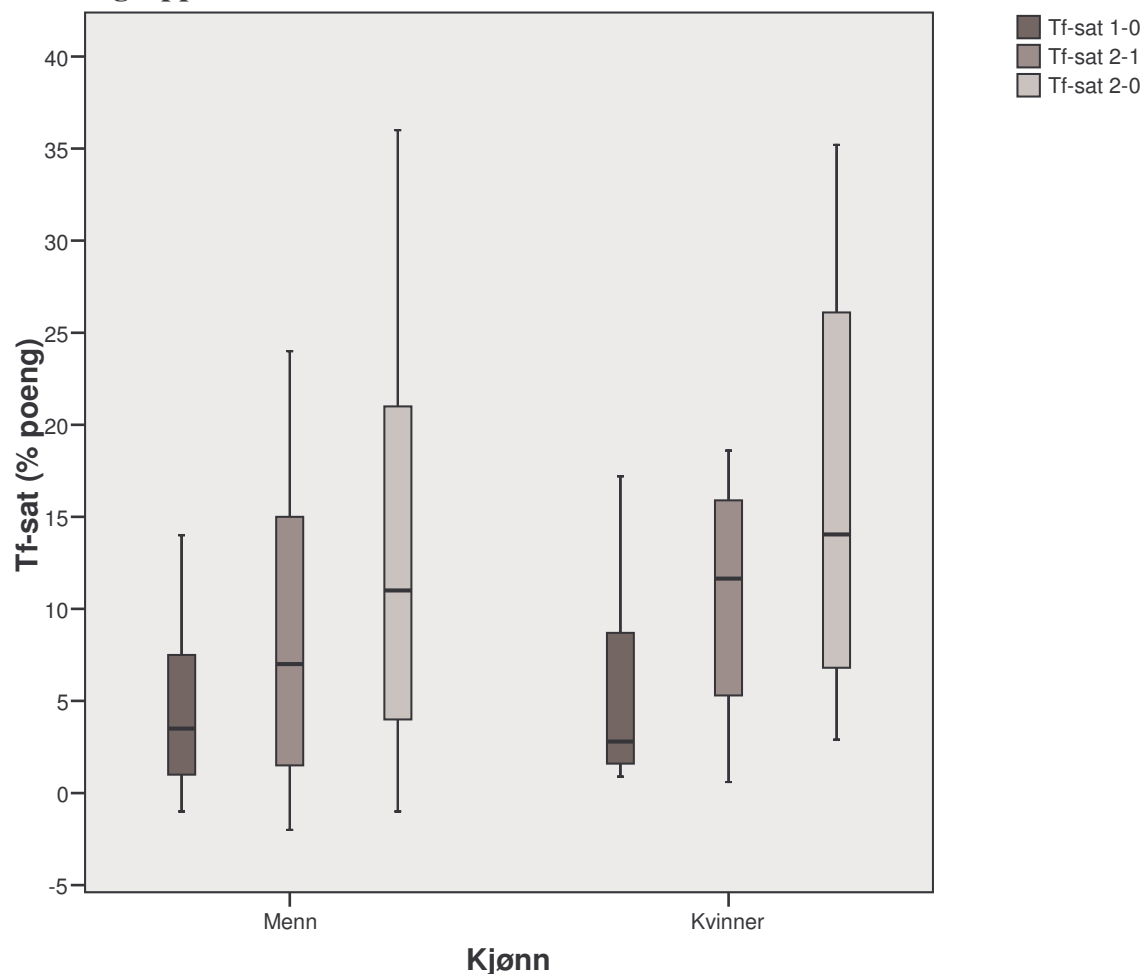
Tallene på høyre side presenterer ferritin verdien til hvert enkel person
n = 7 kvinner Tf-sat = transferrinmetning

Figur 20B: Oversikt over endring i transferrinmetningen fra 0-prøve til prøve 1 og 2 i kontrollgruppen, for kvinner med serum ferritin >50 µg/L.



Tallene på høyre side presenterer ferritin verdien til hvert enkel person
Grønn linje mangler siste prøven, pga av hun ble dårlig og måtte gå etter prøve 1.
n = 8 kvinner Tf-sat = transferrinmetning

Figur 21: Boksblott over endringen i transferrinmetningen ved de ulike prøvene hos kontrollgruppen.



n =20 for menn, n =15 for kvinner Tf-sat = transferrinmetning

I dette boksblottet representerer streken medianen i fordelingen, boksen representerer 50 % av verdiene, mens øvre og nedre strek representerer størst og minste verdi.

7.2 Homokromatosepasienter

På grunn av at det bare ble 2 kvinner og 8 menn i denne gruppen har vi ikke skilt disse på kjønn. Gjennomsnittsalder (range) for pasientene var 40.0 år (25-63). Gjennomsnitt s-ferritin (range) er 592 µg/L (73-1117) (tabell 6A, 6B).

Vi har i denne gruppen en pasient som allerede har startet på årelating, og vi ser at denne pasienten ligger mye lavere i s-ferritin (73 µg/L) enn resten. Det var også to pasienter som viste høye levermarkører med en på GT 159 og ALAT 93, mens den andre hadde GT 322. Disse er tatt med i forsøket på lik linje det de andre pasientene. Alle andre prøver som er tatt av disse pasientene ligger innenfor de normale referanseområdene. Det kan vise seg å være instrumentell eller målingsfeil på jernbindingskapasitetsanalysen i 0-prøven hos id 55, siden denne går opp fra 29 til 35 µmol/L på prøve 1 og prøve 2. Dette resulter i at pasienten får nokså høy Tf-sat på 0-prøven i forhold til prøve 1 og prøve 2. Vi ser også at denne pasienten får da en stor negativ endring i Tf-sat. Derfor bruker vi 35 µmol/L som mål også på 0-prøven og får da en Tf-sat 49 %, som da samsvarer mye bedre med den nedgangen pasienten har hatt i s-jern under jernbelastningstesten.

Vi ser at det er stor variasjon i hvor høy Tf-sat er hos disse pasientene, tross høy ferritin. Noen har knapt 20 %, mens en annen har helt oppe i 59 % på 0-prøven. Vi ser at det er pasienten som er homozygot for C282Y som lå høyest i Tf-sat, så kommer pasienten som er ”compound heterozygot”, noe som kan tyde på at det er en sammenheng (figur 22). Men med bare 2 pasienter med disse genfeilene blir det bare spekulasjoner.

Hos hemokromatose pasientene ser vi egentlig mye av de samme tendensene som i kontrollgruppen med ferritin >150 µg/L. Det er noen pasienter som ikke tar opp lite jern, mens andre tar opp nok jern til å få en Tf-sat stigning på mellom 20-30 % poeng (figur 23).

Vi ser tydelig at det er 3 pasienter som har en endring på rundt 25 % poeng, deriblant begge kvinnene og en wt/wt. Om dette er en tilfeldighet eller en realitet at kvinner har såpass høyt opptak selv med høy ferritin må undersøkes nærmere. Det er mulig den siste personen som har høy endring i Tf-sat, er normal på C282Y og H63D, men at han har en av de andre genfeilene. Resten av pasientene ligger jevnt fordelt under 10 % poengs endring, noe som sier at de tok opp litt jern, men at opptaket er redusert.

Hvis vi ser på endringen i Tf-sat fra 0-prøven til prøve 2 samlet mellom hemokromatosepasienter og kontrollgruppen, ser vi at det er stor spredningen i begge

gruppene. Noe som gjenspeiles med at det ikke er noen signifikant forskjell mellom gruppen ($p=0,25$). Spredningen er større i kontrollgruppen, enn hos hemokromatosepasientene, noe som stemmer med teorien. Vi ser også at begge kvinnene har høyt opptak, om dette er tilfeldigheter eller realitet, må undersøkes nærmere. Vi ser også at det er en liten negativ korrelasjon mellom opptak og jernlager $r^2 = 0,07$, men den er for liten til å konkludere at det er en noen sammenheng.

Tabell 6A: Jernbelastningstest hos hemokromatose pasienter

Id	Kjønn	Genfeil	Alder (år)	Hb (g/dl)	Ferritin (µg/L)	Tf-sat 0-p. (%)	Tf-sat 1-p. (%)	Tf-sat 2-p. (%)	Tf-sat 1-Tf-sat 0 (% poeng)	Tf-sat 2-Tf-sat 0 (% poeng)	Annet
50	m	H63D/H63D	38	15.8	402	26	27	34	1	8	
51	m	H63D/wt	25	13.6	73	21	24	23	3	2	*1
52	m	C282Y/wt	32	15.7	571	34	36	34	2	0	
53	k	C282Y/H63D	32	15.6	453	52	65	77	13	25	*2
54	m	C282Y/C282Y	42	13.4	1117	59	58	60	-1	1	
55	m	wt/wt	37	15.9	646	49	47	47	-2	-2	*3
56	k	C282Y/wt	56	14.8	511	34	59	62	25	28	
57	m	wt/wt	36	15.2	969	38	44	64	6	26	
58	m	wt/wt	63	14.2	585	30	32	38	2	8	
59	m	wt/wt	39	13.5	982	20	20	22	0	2	

Gjennomsnitt	40	14.8	631	36	41	46	5	10	
95 % konfidens int. for mean	30.8-48.3	14.0-15.5	406.0-855.8	28.8-45.8	29.9-52.6	32.6-59.6	-1.0-10.8	1.3-18.3	
Range	25-63	13.4-15.9	73-1117	20-59	20-65	22-77	-2-25	-2-28	
Std.Avvik	11.5	1.0	314.4	13.3	15.9	18.8	8.3	11.9	
Varians	132.0	1.0	98830.1	175.8	251.7	355.0	68.1	140.6	
Std. Error	3.6	0.3	99.4	4.2	5.0	6.0	2.6	3.7	

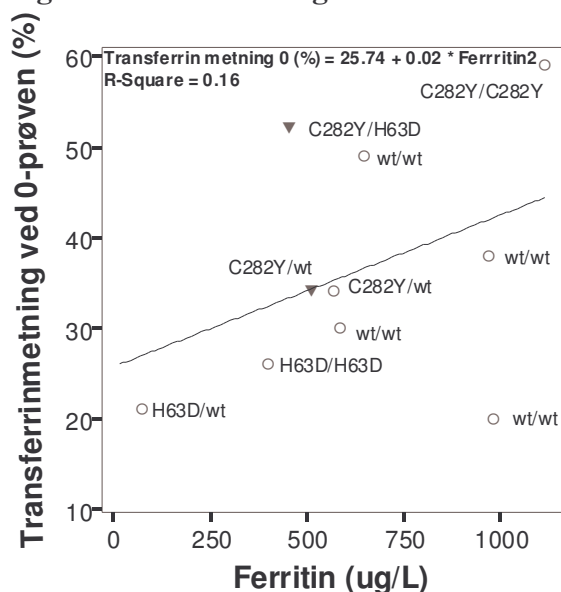
*1 Er i gang med årelating *2 GT 159 ALAT 93 *3 GT 322 Det kan være feil på 0 prøve her, siden jernbindingskapasiteten går opp fra 29 til 35 µmol/L på prøve 1 og 2, og personen får nokså høy Tf-sat på 0 prøven i forhold til prøve 1 og 2. Bruker vi 35 µmol/L som mål også på den 0 prøven får vi en Tf-sat 49 %, som da samsvarer det mye bedre med den nedgangen personen har hatt i s-jern. Tallet i parentes er det målte tallet.

Tabell 6B: Andre relevante prøver hos hemokromatose pasienter

Id	MCV (fL)	s-jern 0-p. (µmol/L)	s-jern 1-p. (µmol/L)	s-jern 2-p. (µmol/L)	TIBC (µmol/L)
50	98	18.1	19.1	24.5	70
51	95	13.4	14.8	15.3	64
52	89	18.7	19.8	19.2	55
53	97	29.7	36.2	43.9	52
54	95	26.5	26.3	27.1	45
55	87	17.0	16.3	16.3	29
56	94	19.7	25.8	37.3	58
57	88	19.6	24.1	37.4	51
58	94	17.8	18	22.1	59
59	97	13.3	13.9	14.8	65

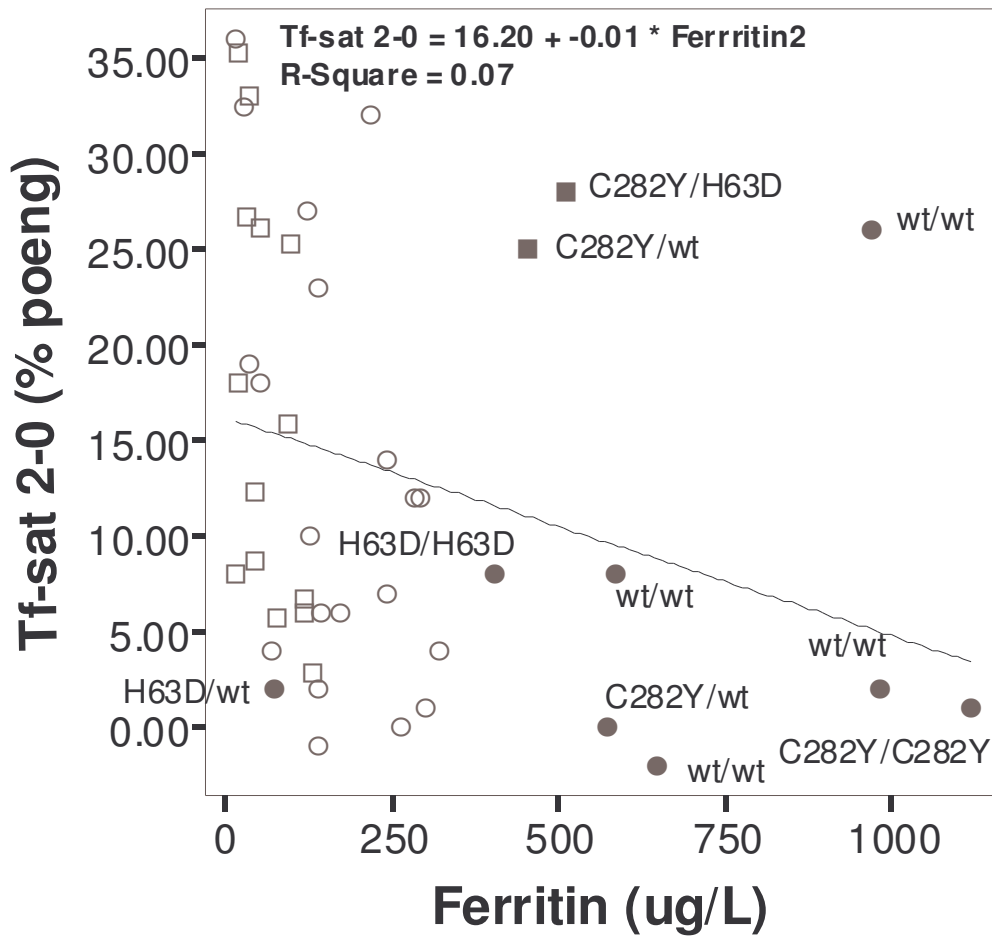
Gjen.snitt	93.4	19.4	21.4	25.8	54.8
95 % konfid. int. for mean	90.4-96.3	15.7-23.1	16.5-26.3	18.4-33.2	46.6-63.2
Range	87.0-98	13.3-29.7	13.9-36.2	14.8-43.9	29.0-70.0
Std.Avvik	4.0	5.2	6.8	10.4	11.7
Varians	15.8	26.7	46.1	108.5	136.8
Std. Error	1.3	1.6	2.1	3.3	3.7

Figur 22: Sammenheng mellom transferrinmetning og serum ferritin ved 0-prøven.



Sirkel representerer n = 8 menn, trekant representerer n = 2 kvinner
Genstatus for pasienten er markert ved hvert punkt. wt = normalt gen

Figur 23: Sammenheng mellom endring i transferrinmetning fra 0-prøven til prøve 2 og ferritin hos hemokromatosepasientene sammen med kontrollgruppen, begge kjønn.



Åpen sirkel representerer n = 20 menn fra kontrollgruppen og fylte sirkler representerer n = 8 mannlige hemokromatosepasienter. Åpen firkant representerer n = 14 kvinner fra kontrollgruppen og fylte firkanter representerer n = 2 kvinnelig hemokromatosepasientene. Hemokromatosepasientene er også merket med genstatus. Tf-sat = Transferrinmetning wt = normalt gen

7.3 Kasusstikk på et forholdet mellom en infeksjon, ferritin, s-jern og Tf-sat

Ferritin har av Waalen et al [89] blitt foreslått som et bedre parameter for å bruke for screening av hemokromatose enn Tf-sat, noe Åsberg et al [100] ikke her helt enig. En av grunnene er at ferritin er et akutfaseprotein som vil øke ved inflammasjon og infeksjon, som beskrevet under molekylær regulering av jernopptaket. Dette kan vi tydelig se i kasuset i tabell 7 og figur 24. Med høy ferritin og lav s-jern og Tf-sat i den akutt kliniske fasen. Når infeksjonen har gitt seg synker ferritin verdien sakte nedover, mens s-jern og Tf-sat stiger rask og stabiliserer seg.

Beskrivelse av kasus:

Mann 25 år, fikk begynnende symptomer på halsbetennelse 05.10.07, og febertopper ca. hver 8 time. De ble brukt paracetamol 500mg 1-2 tabletter x 1-3 daglig og ibuprofen 400 mg 1 tabletter 1-3 x daglig for å lette feberen. 10.10.07 oppsøkte pasienten lege. Blodprøver og mikrobiologiske prøver ble tatt. 11.10.07 fikk han utskrevet Ery-max 250 mg, 2 morgen og 2 kveld i en uke. Det ble ved første prøve bare påvist antistoff mot parainfluenza virus, men prøven tatt 13.11.07 ble det påvist antistoff mot mycoplasma pneumoniae, som antagelig var årsaken til infeksjonen.

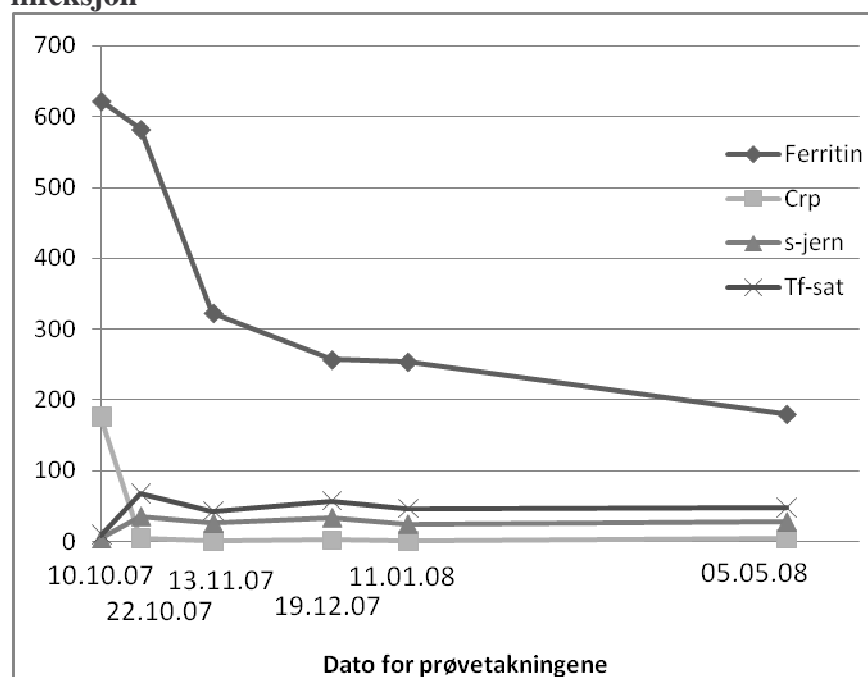
Pasient bedret seg raskt etter start med antibiotikabehandling.

Siden ferritin var så høy ble det også sendt prøve for å sjekke genstatus opp mot hemokromatose. Genotypen var normal for C282Y og H63D.

Tabell 7: Et kasus om hvordan ulike parametere oppføres seg ved en mikrobaktriell infeksjon

Tidspunkt	10.10.2007	22.10.2007	13.11.2007	19.12.2007	11.01.2008	05.05.2008
Ferritin (µg/L)	622	582	322	256	253	179
Crp (mg/L)	177	5	1	2	1	4
s-jern (µmol/L)	3.8	35.3	25.6	33.5	24.2	27.6
Tf-sat (%)	9	68	43	58	47	48
Hb (g/dl)	14.6	14.9	16.3	15.8	14.6	15.4

Figur 24: Et kasus om hvordan ulike parametere oppføres seg ved en mikrobaktriell infeksjon



Grafisk fremstilling av tallene fra tabell 7.

Cpr = Serum-C reaktivt protein Tf-sat = transferrinmetningen s-jern = serum jern

8.0 Diskusjon

Formålet med denne pilot-/casekontrollstudien var å se på sammenhengen mellom jernstatus og jernabsorpsjon og om det er noen forskjell mellom opptak av jern hos friske og pasienter som lider av sykdommen hemokromatose (vedlegg prosjektprotokoll). Jernstatus ble primært angitt som s-ferritin som et mål på størrelsen på jernlageret. Det var også ønskelig å se om ferritinnivået har noe å si på opptaket. Det viste seg å være vanskeligere enn vi hadde trodd å få rekruttert ønskelig antall pasienter på den tiden som var tildelt oppgaven. Derfor fikk vi bare 10 pasienter. Grunn til at det var vanskeligere å rekruttere pasienter enn antatt var at en del av de spurte pasientene vegret seg for å ta en jerntablett når de allerede hadde høy s-ferritin. Dette til tross for at det ble informert om at det ikke var knyttet noen spesielle fare eller bivirkninger til dette forsøket, og at de snarlig skulle begynne årelating. En annen mulig årsak var antagelig at noen ikke ville ta seg den tid som medgikk på Haukeland Universitetssykehus (gode 2 timer).

Vi har derfor mest sett på kontrollgruppen og pasientgruppen hver for seg, for å se om det er noen sammenhenger mellom absorpsjon og jernlager, og for å få et inntrykk av hvordan en standardisert jernbelastningstest virker hos pasienter med hemokromatose. Siden datamaterialet er så lite, er det vanskelig å si noe konkret for våre funn, men vi kan se tendenser og spekulere i sammenhenger mellom ulike parametere.

Prosjektprotokollen viste seg å bli for ambisiøs med hensyn til HH pasienter, i forhold til det som ble mulig å gjøre i praksis.

8.1 Kontrollgruppen

Kontrollgruppen vår består hovedsakelig av personer fra to bedrifter, der de fleste av mennene var ingeniører eller konsulenter, mens de fleste kvinnene var telefonoperatører, det vil si personer med mye stillesittende arbeid. Om dette har noe innvirkning i forhold til en representativ kontrollgruppe er uvisst.

Vi ser at det er flere forskjeller på kvinner og menn i denne gruppen. Denne ene er at s-ferritin er lavere hos kvinner. Grunnen til dette skyldes nok i stor grad menstruasjon og graviditet, som da er antagelig nok til å holde jernlagrene nede. Menn spiser også mer mat enn kvinner og da følgelig få i seg mer jern igjennom kosten. Et annet aspekt hvorfor ferritin spriker så mye hos mennene kan være ulikt opptak i tarmen, men ikke minst ulik diett. Muligens kan noen av disse personene nylig ha gjennomgått en infeksjon, slik som i kasus (tabell 7), og har følgelig en høy s-ferritin av den grunn. Det er en person som har hatt påvist en mikrobaktriell

infeksjon 3 måneder før prøvetakning (id 20, tabell 3A), han hadde unormalt høy s-fettitin i forhold til alder.

Kontrollgruppen ble ikke gentestet, så derfor kan det være at en eller to av disse personene har en eller flere av de genfeilene vi testet for i pasientgruppen, men at den/disse personen(e) ikke har utviklet noen sykdom ennå. I HUNT-undersøkelsen, fant man en prevalens på genotypisk hemokromatose på 0,43 % [74], det vil si ca. 1 pr 200. Mens man i realiteten ofte ikke finner mer enn kanskje 0,15 % i vanlig helsetjeneste, slik som de fant i en studie gjort to legesentre på Sørlandet [4] og i andre utenlandske studier [91, 92]. Slik at muligheten for at en person har en genfeil er til stede, men ganske liten.

Vi hadde også noen personer som hadde spist og drukket kaffe/te før jernbelastningstesten. Man vet at spesielt te og litt kaffe kan påvirke opptaket av jern [11]. Vi ser at de to mennene dette gjaldt har bare tatt hatt en endring på 1 og 6 % poeng og de to kvinnene har hatt en endring på 8 og 9 % poeng. Det vil si at alle disse ligger flere % poeng under gjennomsnittet i sin gruppe. Så det kan være en mulighet at opptaket ble redusert hos disse.

Plottene våre viser at det er store individuelle forskjeller mellom personene i denne gruppen, og det er vanskelig å trekke ut klare sammenhenger, hvis det er være noen. Men vi ser tendenser på ulike sammenhenger. Vi fant den høyeste korrelasjonen på $r^2=0,23$ for menn og $r^2=0,29$ for kvinner, mellom endringen i Tf-sat og s-ferritin (figur 18). Selv om denne korrelasjonen er lav støtter dette opp under teorien om at en av jernreguleringsmekanismene er jernlageret i kroppen, men vi har eksempler på personer som avviker fra dette. Hva dette skyldes er uvisst. På de andre figurene var korrelasjonen tilnærmet $r^2=0$ slik som for alder og s-ferritin (figur 15) og for Tf-sat og Hb (figur 17).

Skal vi prøve og sett opp et referanseområde for Tf-sat for økningen mellom 0-prøven og prøve 2 basert på våre data, får vi ved median og persentiler på 2,5 % og 97,5 % for menn 11 % poeng; -1 - 34 % poeng, og for kvinnene 14 % poeng; 4 - 34 % poeng (tabell 5). Siden fordelingen avviker mye fra en normalfordeling ved at vi har flere høye verdier og får da en stor skjevhet i grafen (vist som boksblott figur 21), derfor bruker vi persentiler som mål for referanseområdet.

Vi ser at hos mennene får vi et negativt tall, dette skyldes at en person faktisk hadde lavere Tf-sat etter 2 timer. Om dette er en realitet eller en målingsfeil er usikkert. Det kan da være

mer naturlig å sette 0 % poeng som nedre referansegrense. Det blir et vidt referanseområde, så det må nok mer data til for å fastsette dette mer konkret.

Figur 19A, 19B, 20A, 20B og tabell 3A og 4A viser at det er større % poeng økning hos de fleste personene mellom prøve 1 og prøve 2 enn mellom 0-prøven og prøve 1. Derfor er det viktig at man venter til man får tatt prøve to. Man kan da heller vurdere å droppe prøve 1, siden den ikke gir så veldig mye tilleggsinformasjon. For den nedgangen i Tf-sat som muligens kan være mellom disse prøvene vil nok antagelig ikke være stor på den korte tiden. Vi hadde bare en person som hadde nedgang (figur 19A), men bare på 1 % poeng.

8.2 Hemokromatose pasienter

Vi ser at over halvparten av pasientene i denne studien har en Tf-sat på <50 % selv etter jernbelastningstesten. Dette viser det samme som har blitt vist i andre studier der man har satt ”cut of” grensen for Tf-sat enten på 50 eller 55 % ved en screeningtest, ser vi at vi ikke vil få med oss alle hemokromatose pasientene [4, 90, 92, 101]. Nesten alle pasientene våre har s-ferritin over 200-500 µg/L, litt forskjellig hvor de ulike studiene setter denne ”cut of” grensen for hva som defineres som sykdom. Vi har brukt det som er vanlig øvre referanseområdet på Haukeland universitetssykehus, 300 µg/L for menn og 240 µg/L for kvinner. Alle våre pasienter ligger godt over dette.

Forskjellen i Tf-sat hos våre pasienter er stor (figur 22). Skulle vi fulgt en ”cut of” grense på Tf-sat 50 % ville vi bare funnet 2 stk eller 20 % av de pasientene som hadde en forhøyet ferritin. De 2 pasientene som hadde en Tf-sat på over 50 % hadde derimot genfeilene C282Y/C282Y og C282Y/H63D. Er man da ute etter å screene pasienter med hensyn på disse genfeilene passer antagelig grensen godt, men du klarer ikke å fange opp alle de som er heterozygote for C282Y eller bare har H63D genfeil. Denne grensen for Tf-sat bør man ikke følge slavisk, siden det også er to i kontrollgruppen som har en Tf-sat på 51 %.

Hvorfor pasienter med genfeil har høyere Tf-sat er litt usikkert. Mekanismene som styrer opptaket av jern styres som nevnt tidligere av flere faktorer, deriblant jernlageret. Vi kan da spekulere i om det blir nedgang i jernopptaket hos personer som har høyt jernlager. Dette vil da føre til et mindre opptak fra tarmen, og følgelig vil Tf-sat gå ned, siden det er mindre jern tilgjengelig for transport. Problemet hos personer som har genfeil på HFE-genet, er at de antagelig ikke klarer å bremse utstrømningen av jern fra enterocytter og fra makrofagene. Derfor vil det bli mer tilgjengelig jern for transport og Tf-sat vil stige. Siden disse allerede har

masse jern i kroppen og de fleste cellene har det jernet de trenger, og har da nedregulert TfR1 og TfR2. Siden disse reseptorene er nedregulert fører det til at det blir tatt opp for lite jern via denne veien, noe som resulterer i at Tf-sat går opp. Siden det er mye jern i serum vil antallet tomme apo- Tf går ned på grunn av økt antall deferric Tf. Minsket antall apo-Tf fører til at jernet som blir tatt opp fra tarmen eller utskilt fra makrofagene ikke blir bundet til Tf, men heller danner NTBI. NTBI blir som nevnt tidligere tatt raskt opp fra blodet til hepatocytter og det er antagelig dette jernopptaket som bygger opp jernlagret i kroppen hos disse [28, 102].

Siden en del av pasientene våre har høy s-ferritin og de har testet negative ovenfor de genfeilene vi har testet for, må det antagelig være en annen årsak til at de har høy s-ferritin. Disse pasientene kan enten ha en av de andre genfeilene som er definert i tabell 1 eller så er ferritin også en akutfasereaktant, så høy s-ferritin kan henge igjen i kroppen i lang tid etter en infeksjon eller inflammasjon (kasus figur 24). Dette uten at de har høye jernlager av den grunn. Man har også sett at ulike typer kreft kan føre til overproduksjon av ferritin og ikke minst den sjeldne sykdom hyperferritinaemia. Denne sykdommen fører til at man får en overproduksjon av L-ferritin som avleires i øye slik at man utvikler grønn stær. Ved denne sykdommen er alle andre verdier som regel normale [103]. Disse siste sykdommene vil ikke tåle årelating og de vil da raskt gå inn i en jernmangelanemi. Gullstandarden for å sjekke om en person har jernoverskudd eller ikke, er å sjekke om personen har mobiliserbart jern. Det vil si at pasienten har et overskudd av jern i kroppen som pasienten kan brukes til å danne nye blodceller. Klarer pasienten ikke å danne nok nye blodceller etter noen årelatinger, kan dette tyde på at det er en annen årsak til høy ferritin enn jernoverskudd.

8.3 Sammenligning av de to gruppene

Siden dette skulle være en casekontrollstudie der gruppene skulle være så like som mulig, så ser vi at gjennomsnittsalder er veldig lik og rangen er nokså lik. Så ut ifra alder er gruppene sammenlignbare. Ser man ut ifra samfunnslag har så og si alle i kontrollgruppen samme bakgrunn. For hemokromatosepasientene er det mer usikkert og noe vi heller ikke har tatt utgangspunkt i å skille på. Ved å bare rekruttere pasienter som nylig har blitt oppdaget med hemokromatose, er ikke en helt ideell måte å rekruttere på, men siden dette bare var en liten casekontrollstudie så var dette tilstrekkelig. Så oppfulgte pasienten inklusjonskriteriene fikk de tilbudet om å være med i studien.

Siden det var problemer med å rekruttere nok pasienter har vi bare satt opp en figur som viser kontrollgruppen og hemokromatosepasienter i samme figur (figur 23). Her ser vi menn med sirkler og kvinner med firkanter, de som hadde hemokromatose er har fylte symboler. Det er

ikke en signifikant forskjell mellom kontrollgruppen og hemokromatosepasienter, når man ser på gjennomsnittet av endringen i Tf-sat mellom 0-prøven og prøve 2, for menn ($p=0,11$), for kvinner ($p=0,22$) og samlet ($p=0,25$). Vi ser at opptaket hos hemokromatosepasientene ligger midt mellom opptaket hos kontrollgruppen, noe som tyder på at det er vanskelig å skille hemokromatosepasienter ved hjelp av Tf-sat og jernbelastningstest ut ifra våre tall. Dette viser at det er stor individuelle forskjell på jernopptak uavhengig av ferritin status, både for kontrollgruppen og hemokromatosepasienter.

8.4 Screening for hemokromatose?

Det har vært diskutert om det skulle vært innført en screeningtest for hemokromatose ved fødsel eller senere i livet [5], slik som beskrevet under 4.2 behandling. Dette fordi dette er en sykdom som kommer snikende og mange kan leve med problemer i mange år før sykdommen blir oppdaget og behandlet.

Det er ulik oppfatning hvordan og hvilken test man bør bruke ved en slik screening. Noen mener at s-ferritin er den beste screening metoden for å måle om en person har hemokromatose eller ikke [89], mens andre mener dette ikke er riktig og heller mer til Tf-sat som er billigere å bruke [5, 100]. Det som diskuteres spesielt av Waalen et al [89] og andre [101], er at det ikke er før man kommer opp i s-ferritin $>1000 \mu\text{g/L}$ at cirrhose utvikles og at jernoverskudd blir et problem. Men Åsberg et al [74] viste at de hadde flere eksempler på cirrhose på personer som hadde s-ferritin verdier mellom $311-626 \mu\text{g/L}$ i sin store undersøkelse. Hos våre pasienter er det tre personer som har s-ferritin på rundt $1000 \mu\text{g/L}$, en på $1117 \mu\text{g/L}$, en på $982 \mu\text{g/L}$ og en på $969 \mu\text{g/L}$, mens resten ligger mellom $402-646 \mu\text{g/L}$, utenom en person på $73 \mu\text{g/L}$ som allerede er midt i tapperegime (tabell 6A). I studier viser det seg at det ofte ikke er mer enn ca. 5 % av de som i primærhelsetjenesten oppdages med HH som får påvist cirrhose [101] og i HUNT undersøkelsen hadde 3,7 % av menn det [74].

Problemet til mange av våre pasienter var antagelig ikke leverskader, siden nesten alle hadde normale levermarkører, utenom to pasienter med forhøyet GT og ALAT. Leverbiopsi er ikke blitt tatt på noen av våre pasienter. Det som gikk igjen hos våre pasienter var mer symptomer på slapphet og trøtthet som hadde fått disse pasientene til å oppsøke lege eller at det ved vanlig rutinesjekk ble påvist høy ferritin, og deretter blitt henvist til Haukeland sykehus. Det er også noen som er blitt oppdaget ved rutinesjekk av nær familie, etter at en hadde blitt oppdaget med genfeil.

Det er vanskelig å regne ut kostnytte verdien av en slik screening, siden prevalensen er så lav og at man ikke vet helt sikkert hvor mange som vil utvikle sykdom. Som vi også har sett ut ifra vår lille studie, er at det er stor variasjon i Tf-sat både hos kontrollgruppen og pasienter med hemokromatose. I tillegg så ser vi at det er personer som har relativt høy s-ferritin, men allikevel lav Tf-sat. Disse ville da ikke bli oppdaget ved en ren Tf-sat screening, men med en ferritin screening. Vi ser også i likhet med at s-ferritin stiger, så synker Tf-sat ved en akuttfasereaksjon som vist i kasus (figur 24) og hos Åsberg [74]. Derfor kan det være noen av våre pasienter egentlig har høyere Tf-sat enn det vi finner på grunn av akuttfasereaksjoner, men som vi ser ut fra kasus så stabilisere Tf-sat seg ganske fort etter sykdommen. Man ville da antagelig også hatt en forhøyet CRP hvis dette var tilfelle. Ingen av våre pasienter hadde forhøyet CRP, så derfor kan vi utgangspunktet utelukke dette. Men det er dette som også er svakheten med disse to screeningtestene. De gjenspeiler ikke alltid reelt jernlager. Derfor kan en jernbelastningstest være nytting, siden denne viser hvor stort opptak pasienten har, for å se om dette kan være årsaken til høy s-ferritin.

8.5 Formålet med en jernabsorpsjonstest.

Det viser seg at det er store individuelle forskjeller på hvor raskt hemokromatose pasienter opparbeider seg et jernoverskudd. Man kan bruke en jernbelastningstest til å finne ut hvor mye jern en pasient tar opp fastende i løpet av to timer. Dette for å finne ut mer om prognosen til pasienten og for å kunne stille en bedre diagnose.

Det er i flere år brukt en jernabsorpsjonstest, der man har sett på s-jern som et mål på absorpsjonen av jern fra tarmen. Det er gjort flere små og halv store studier litt tilsvarende vårt for å se om jernabsorpsjonstesten er brukbar. I en studie av Crosby et al [104], der de har årelatt enkelt forsøkpasienter ned i anemi og noen bare til lave jernlagre, har de sammenlignet opptaket hos disse gruppene med normale. I denne studien var det anemi som var i fokus ikke hemokromatose som i vårt forsøk. Derfor er det noen forskjeller i forhold til vår studie, som at de har testet pasientene over 8 timer. De har brukt 5-250 mg doser, mot vår 100 mg kapsel og så har de brukt s-jern $\mu\text{g/dL}$ som mål, mens vi har brukt s-jern $\mu\text{mol/L}$. Man ser tydelig at de av personer i kontrollgruppen vår som ligger lavt i s-ferritin både hos menn og kvinner har en bratt kurve (figur 19A og B og 20A og B), som også ses i deres data ved lav s-ferritin. Dette kan tyde på at noen av kontrollpersonene våre ligger i grenseland ned mot lave jernlagre eller kanskje mild anemi, noe som kan ha påvirket våre resultater.

En studie som det kanskje er litt mer interessant å sammenligne med er Jensens et al [105], der de har utført så å si tilsvarende studie som oss, bare de har brukt lavdose jern (10 mg doser) og i tillegg tatt en ekstra prøve etter 3 timer. De har brukt C_{\max} for s-jern ($\mu\text{mol/L}$) og ikke bare verdien etter 2 timer som vi har i våre data.

Tabell 8: Forskjeller mellom våre data sammenlignet med Jensens et al studie [105].

	Deres data			Våre data		
	Median ($\mu\text{mol/L}$)	1st og 3de kvartil ($\mu\text{mol/L}$)	Range ($\mu\text{mol/L}$)	Median ($\mu\text{mol/L}$)	1st og 3de kvartil ($\mu\text{mol/L}$)	Range ($\mu\text{mol/L}$)
Menn	3	1 og 5	0-13	6	3 og 13	0-34
Kvinner	5	3 og 7	0-34	10	5 og 17	2-30

I deres data er verdiene for s-jern C_{\max} , mens våre data viser s-jern ved prøve 2.

I begge studiene har kvinnene høyere gjennomsnittsoptak enn mennene. Et spørsmålet er hvor langt våre kontrollpersoner er fra C_{\max} ved vår dosering. For er de ikke langt fra denne verdien vil det da antagelig ikke være behov for å gi så stor dose som 100 mg, siden opptaket ikke er så mye større. At forskjellen ikke er større kan henge sammen med at de har gitt jernet som 48,8 mg jernsulfat pulver som tilsvarer 10 mg Fe^{2+} , mens vi har gitt det som kapsel med ferroglysinulfatkomplekspentahydrat tilsvarende 100 mg Fe^{2+} . Det at de har gitt jernet som pulver kan antagelig øke opptaket mer enn vi som har gitt det som granuler i en kapsel på grunn av pulverets økte biotilgjengelighet, selv om biotilgjengeligheten for våre granuler skal være 95 % [54]. Granulatene våre vil heller ikke løses opp før de kommer ned i duodenum, altså vil det ta litt tid før opptaket starter. Dette må undersøkes nærmere for å gi konkrete svar. En annen faktor på hvorfor opptaket ikke er større, kan ha med at det ikke er stor nok transportkapasitet til å ta opp alt jernet i enterocytene. Dette er jo en av måtene kroppen regulerer jernopptaket på. Vi ser at med vår dose øker "range" spesielt hos menn, men lite hos kvinner, der den faktisk er mindre. Grunnene til dette kan være flere faktorer, men antagelig er forklaringen at de hadde kvinner som var nede i anemi og som dermed tok opp mer jern enn våre, selv med mindre dose.

Jensen et al [105] har valgt å bruke s-jern som direkte mål på absorpsjon, mens vi har valgt Tf-sat. Grunnen til at vi har valgt Tf-sat er at den gir et bedre % vis bilde over hvor stor økningen ved en slik absorpsjonstest er, siden du får økningen i % poeng, som er et forholdstall og ikke en mengde. Man vil i tillegg se økningen i forhold til jernbindingskapasiteten (TIBC) man har i kroppen, som på denne tiden forsøket pågår burde være noen lunde konstant. Men vi ser i våre data at den i noen tilfelle variere med opptil 5

$\mu\text{mol/L}$ fra 0-prøven til prøve 2, som igjen kan påvirke Tf-sat flere % poeng. Ligger denne usikkerhet i analysemetoden eller klarer kroppen å øke jernbindingskapasiteten på den tiden på grunn av økt jerntilgang, er usikkert.

En jernbelastningstest er mer resurskrevende enn både s-ferritin og Tf-sat. Dette fordi man tar begge disse prøvene i tillegg må ta en ny prøve etter 1 og etter 2 timer. Så denne testen fører til at pasienten må vente lengre og at man må ta flere prøver. Å bruke denne testen i screening sammenheng ville blitt dyrt og vanskelig. Ut fra det som viser i våre data kan det være fornuftig og ta både Tf-sat og s-ferritin for å få et bra bilde av pasienten. For så å utføre en jernbelastningstest der man følte det var behov for bedre diagnostikk.

8.6 Svakheter i denne studien og dens utviklingspotensial.

Svakheter med denne studien er at friske kontrollpersoner bare er rekruttert fra to bedrifter der de fleste er fra samme samfunnslag. Det var også litt for få kontrollpersoner og hemokromatose pasienter med i studien, men det var det som var mulig å få gjennomført innen tidsrammen vi hadde for masteroppgaven min.

Det som må ses på videre for dette prosjektet ville vært utvidet kontrollgruppen og få flere hemokromatose pasienter. Man burde vurdert om man skulle dra ut og fått gentestet kontrollgruppen vi allerede har. Det er også en mulighet til å trekke inn analyse av hepcidin fra blodet eller urin i studien. Dette ved bruk av en metode som allerede er utviklet eller finne en ny. Kemna et al [55] har sett på bruk av både antistoffer og massespektrometri til dette arbeidet. Der det er massespektrometri som er blitt mest bruk og har gitt best resultater [106]. Det hadde vært interessant og sett om det er en sammenheng mellom hepcidin, s-ferritin og Tf-sat. Siden man har funnet ut at hepcidin har så mye å si for reguleringen av jern. Dette kan på sikt kanskje føre til at man kan bruke dette som et tilleggsparemetri i undersøkelse av hemokromatosepasienter. Dette vil bare bli aktuelt hvis man finner en brukbar analyse og at prisen kan forsvares. Klarer man å utnytte hepcidin så kan det kanskje være aktuelt å se på muligheten for bruke det som legemiddel i kombinasjon med Desferal, for de pasientene med jernoverskudd, som ikke tolerer årelating. Hepcidin vil jo minske opptaket av jern inn i kroppen.

Til slutt hadde det vært interessant og sett på resultater av å gjennomføre jernbelastningstest flere dager på rad eller 1 gang i uka over 3-4 uker på samme person. Dette for å se om opptaket forandrer seg over tid, men slike forsøk kan være vanskelig å få gjennomført i praksis.

9.0 Konklusjon

Det er ingen forskjell i absorpsjon av jern bestemt ved jernbelastningstest, hos individer med mutasjon i HFE-genet og med ulike stadier av jernoverskudd (vedlegg protokoll). Dette var utgangspunktet for vår nullhypotese og utgangspunktet for vår studie. Det er vanskelig å konkludere med noe spesielt på grunn av for få pasienter, men ved å bruke det materialet vi har, men vi kan klare å finne noen tendenser. Vi finner da ingen signifikant forskjell på transferrinmetningen mellom 0-prøven og prøve 2 mellom kontrollgruppen og hemokromatosepasienter for mennene ($p=0,11$) og for kvinnene ($p=0,224$). Ut fra dette så kan vi ikke forkaste nullhypotesen. Men som vi har sett, er det både pasienter med hemokromatose som har tatt opp en del jern og personer uten hemokromatose som nesten ikke har tatt opp noen ting. Derfor er det ønskelig å få flere pasienter og flere kontrollpasienter slik at usikkerheten går ned. Vi kan konkludere med at denne testen er en god test i noen tilfeller, men at det er store individuelle forskjeller på opptaket mellom ulike personer. Ser vi på hvordan jern blir regulert, så er jo ”bremsene” antagelig gjennom hepcidin som er helt eller delvis ødelagt gjennom genfeil på HFE-proteinet. Pasientene med hemokromatose vil da ha et opptak av jern selv om de allerede har for mye jern i kroppen, det er antagelig derfor de har bygget opp et jernoverskudd.

En jernbelastningstest er mer ressurskrevende test en både s-ferritin og Tf-sat. Dette fordi man må ta begge disse prøvene og i tillegg må ta en ny prøve etter 1 og etter 2 timer. Så denne testen fører til at pasienten må vente lengre og at man må ta flere prøver. Å bruke denne testen i screening sammenheng vil bli dyrt og vanskelig. Ut fra det som vises i våre data er det fornuftig og ta både Tf-sat og s-ferritin for å få et bedre bilde av pasienten, og bruke jernbelastning som en tilleggsanalyse for bedre diagnostisering av pasienten.

Våre data viser også at prøve 1 ikke gir så mye mer tilleggsinformasjon, og at den største stigningen hos de fleste personene var mellom prøve 1 og 2, derfor er det mulig å kutte ut denne prøven. Ved å kutte ut prøve 1 vil man spare både resurser og penger.

Det kan også se ut til at man heller ikke trenger å gi så høy dose som 100 mg jern, men at det antagelig holder med å gi en laver dose kanskje 20-50 mg, men dette må undersøkes nærmere. Det å drive forskning på mennesker kan være vanskelig, både på grunn av etiske, tidsmessige og stor individuelle forskjeller.

10.0 Referanser:

1. Hall, G., *Textbook of Medical Physiology* 10. ed. 2000: Saunders.
2. Maurice E. Shils, M.S., A. Catharine Ross, Benjamin Caballero, Robert J. Cousins, *Modern Nutrition in health and disease*. 10 ed. 2006: Lippincott Williams & Wilkins. p.248-269.
3. Gunn-Elin Aa. Bjørneboe, C.A.D., *Mat og Medisin*. 4. ed. 2005: Høyskoleforlaget. p.336-352.
4. Rygh, G.M.B.B.M.-B.H.H.P.A.J.L.H.R.E., *Forhøyet serum-ferritinnivå og hemokromatose i allmennpraksis*. Tidsskr Nor Lægeforen, 2005(125:): p. 20-2.
5. Åsberg, A., *Screening for arvelig hemokromatose?* Tidsskr Nor Lægeforen, 2005(125:): p. 15.
6. Håvar Knutsen, J.H., *Handlingsprogram for hemokromatose*. Norsk selskap for Hematologi, 2003.
7. Hemokromatoseforbund, N. *Hemokromatose*. 2008 [cited 23.01.08]; Available from: <http://www.hemokromatose.no/>.
8. Olav Sand, Ø.V.S., Egil Haug, *Menneskets fysiologi*. 1. ed. 2001, Oslo: Gyldedal Norsk Forlag as. p.416-463.
9. Mackenzie, B.B. and M.D.M.D. Garrick, *Iron Imports. II. Iron uptake at the apical membrane in the intestine*. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology, 2005. **289**(6): p. 6.
10. K. J. H. Wienk, J.J.M.M., A. C. Beynen *The concept of iron bioavailability and its assessment*. European Journal of Nutrition, 1999. **38**(2): p. 51-75.
11. Hallberg, L.L. and L.L. Rossander, *Effect of different drinks on the absorption of non-heme iron from composite meals*. Human nutrition. Applied nutrition, 1982. **36**(2): p. 116-23.
12. Hutchinson, C., et al., *Proton pump inhibitors suppress absorption of dietary non-haem iron in hereditary haemochromatosis*. Gut, 2007. **56**(9): p. 1291-5.
13. Mackenzie, B., et al., *Divalent metal-ion transporter DMT1 mediates both H⁺ - coupled Fe²⁺ transport and uncoupled fluxes*. Pflugers Arch, 2006. **451**(4): p. 544-58.
14. Gitlin, D. and A. Cruchoaud, *On the kinetics of iron absorption in mice*. J Clin Invest, 1962. **41**: p. 344-50.
15. Monsen, E.R., *Iron nutrition and absorption: Dietary factors which impact iron bioavailability*. Journal of the American dietetic association, 1988. **88**(7): p. 786-790.
16. Roe, M.A., et al., *Iron absorption in male C282Y heterozygotes*. Am J Clin Nutr, 2005. **81**(4): p. 814-21.
17. Anderson, G.J., et al., *Mechanisms of haem and non-haem iron absorption: lessons from inherited disorders of iron metabolism*. Biometals, 2005. **18**(4): p. 339-48.
18. Worthington, M.T., et al., *Characterization of a human plasma membrane heme transporter in intestinal and hepatocyte cell lines*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **280**(6): p. G1172-7.
19. Galbraith, R.A., S. Sassa, and A. Kappas, *Heme binding to murine erythroleukemia cells. Evidence for a heme receptor*. J Biol Chem, 1985. **260**(22): p. 12198-202.
20. Shayeghi, M.M., et al., *Identification of an intestinal heme transporter*. Cell, 2005. **122**(5): p. 789-801.
21. Raffin, S.B., et al., *Intestinal absorption of hemoglobin iron-heme cleavage by mucosal heme oxygenase*. J Clin Invest, 1974. **54**(6): p. 1344-52.
22. Lynch, S.R., B.S. Skikne, and J.D. Cook, *Food iron absorption in idiopathic hemochromatosis*. Blood, 1989. **74**(6): p. 2187-93.

23. Ohgami, R.S., et al., *The Steap proteins are metalloreductases*. Blood, 2006. **108**(4): p. 1388-94.
24. Gunshin, H., et al., *Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter*. Nature, 1997. **388**(6641): p. 482-8.
25. Garrick, M.D., et al., *DMT1: which metals does it transport?* Biol Res, 2006. **39**(1): p. 79-85.
26. Ma, Y.Y., et al., *Iron Imports. V. Transport of iron through the intestinal epithelium*. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology, 2006. **290**(3): p. 22.
27. Department, P.S.B. *Intracellular Compartments: Exocytosis, Endocytosis, and the Lysosome*. 2008 [cited 07.04.2008]; Available from: http://courses.bio.psu.edu/fall2005/biol230weve/tutorials/tutorial6_files/031.gif.
28. Chua, A.C., et al., *The regulation of cellular iron metabolism*. Crit Rev Clin Lab Sci, 2007. **44**(5-6): p. 413-59.
29. McKie, A.T., et al., *A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation*. Mol Cell, 2000. **5**(2): p. 299-309.
30. Abboud, S. and D.J. Haile, *A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism*. J Biol Chem, 2000. **275**(26): p. 19906-12.
31. Beutler, E.E., *Hemochromatosis: genetics and pathophysiology*. Annual review of medicine, 2006. **57**: p. 331-47.
32. Wessling-Resnick, M.M., *Iron imports. III. Transfer of iron from the mucosa into circulation*. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology, 2006. **290**(1): p. 6.
33. Nittis, T. and J.D. Gitlin, *Role of copper in the proteasome-mediated degradation of the multicopper oxidase hephaestin*. J Biol Chem, 2004. **279**(24): p. 25696-702.
34. Deicher, R.R. and W.W.H. Hörl, *New insights into the regulation of iron homeostasis*. European journal of clinical investigation, 2006. **36**(5): p. 301-9.
35. Vulpe, C.D., et al., *Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse*. Nat Genet, 1999. **21**(2): p. 195-9.
36. Petrak, J. and D. Vyoral, *Hephaestin--a ferroxidase of cellular iron export*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(6): p. 1173-8.
37. Donovan, A.A., C.N.C.N. Roy, and N.C.N.C. Andrews, *The ins and outs of iron homeostasis*. Physiology, 2006. **21**: p. 115-23.
38. Thomas, C. and P.S. Oates, *Copper deficiency increases iron absorption in the rat*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003. **285**(5): p. G789-95.
39. Reeves, P.G. and L.C. DeMars, *Copper deficiency reduces iron absorption and biological half-life in male rats*. J Nutr, 2004. **134**(8): p. 1953-7.
40. Chen, H., et al., *Systemic regulation of Hephaestin and Ireg1 revealed in studies of genetic and nutritional iron deficiency*. Blood, 2003. **102**(5): p. 1893-9.
41. Atanasiu, V.V., B.B. Manolescu, and I.I. Stoian, *Hepcidin--central regulator of iron metabolism*. European journal of haematology, 2007. **78**(1): p. 1-10.
42. Aisen, P., A. Leibman, and J. Zweier, *Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin*. J Biol Chem, 1978. **253**(6): p. 1930-7.
43. Knutson, M. and M. Wessling-Resnick, *Iron Metabolism in the Reticuloendothelial System*. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 2003. **38**(1): p. 61 - 88.
44. Swinkels, D.W.D.W., et al., *Hereditary hemochromatosis: genetic complexity and new diagnostic approaches*. Clinical chemistry, 2006. **52**(6): p. 950-68.
45. Dunn, L.L.L.L., Y.S.Y.S. Rahmanto, and D.R.D.R. Richardson, *Iron uptake and metabolism in the new millennium*. Trends in cell biology, 2007. **17**(2): p. 93-100.

46. Maxwell M. Winterobe, G.R.L., Dane R. Boggs, Thomas C. Bithell ++, *Clinical Hemoatology*, ed. ed. 1981. p.119-120, 181.
47. Graham, R.M., et al., *Liver iron transport*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(35): p. 4725-36.
48. Siah, C.W., D. Trinder, and J.K. Olynyk, *Iron overload*. Clin Chim Acta, 2005. **358**(1-2): p. 24-36.
49. Goswami, T. and N.C. Andrews, *Hereditary hemochromatosis protein, HFE, interaction with transferrin receptor 2 suggests a molecular mechanism for mammalian iron sensing*. J Biol Chem, 2006. **281**(39): p. 28494-8.
50. Schmidt, P.J., et al., *The transferrin receptor modulates Hfe-dependent regulation of hepcidin expression*. Cell Metab, 2008. **7**(3): p. 205-14.
51. Fleming, R.E.R.E. and R.S.R.S. Britton, *Iron Imports. VI. HFE and regulation of intestinal iron absorption*. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology, 2006. **290**(4): p. 4.
52. Chua, A.C., et al., *The role of Hfe in transferrin-bound iron uptake by hepatocytes*. Hepatology, 2007.
53. Siah, C.W., et al., *Normal iron metabolism and the pathophysiology of iron overload disorders*. Clin Biochem Rev, 2006. **27**(1): p. 5-16.
54. Holger Moe Tørisen, E.M.H., Kristin Lundqvist, Astrid Velure, *Felleskatalogen 49*. utganve ed. 2008, Oslo: Fagbokforlaget. p.377-380.
55. Kemna, E.H., et al., *Hepcidin: from discovery to differential diagnosis*. Haematologica, 2008. **93**(1): p. 90-7.
56. Ganz, T.T. and E.E. Nemeth, *Iron imports. IV. Hepcidin and regulation of body iron metabolism*. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology, 2006. **290**(2): p. 203.
57. Frazer, D.M.D.M. and G.J.G.J. Anderson, *Iron imports. I. Intestinal iron absorption and its regulation*. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology, 2005. **289**(4): p. 5.
58. Yamaji, S., et al., *Inhibition of iron transport across human intestinal epithelial cells by hepcidin*. Blood, 2004. **104**(7): p. 2178-80.
59. Mena, N.P., et al., *Hepcidin Inhibits Apical Iron Uptake in Intestinal Cells*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008. **294**(1): p. G192-8.
60. Frazer, D.M., et al., *Delayed hepcidin response explains the lag period in iron absorption following a stimulus to increase erythropoiesis*. Gut, 2004. **53**(10): p. 1509-15.
61. Chaston, T., et al., *Evidence For Differential Effects Of Hepcidin In Macrophages And Intestinal Epithelial Cells*. Gut, 2008. **57**(3): p. 374-82.
62. Oates, P.S., *The relevance of the intestinal crypt and enterocyte in regulating iron absorption*. Pflugers Arch, 2007. **455**(2): p. 201-13.
63. Frazer, D.M.D.M. and G.J.G.J. Anderson, *The orchestration of body iron intake: how and where do enterocytes receive their cues?* Blood cells, molecules & diseases, 2003. **30**(3): p. 288-97.
64. Pietrangelo, A., *Hereditary hemochromatosis--a new look at an old disease*. N Engl J Med, 2004. **350**(23): p. 2383-97.
65. Anderson, G.J., et al., *Regulation of systemic iron homeostasis: how the body responds to changes in iron demand*. Biometals, 2007.
66. Drake, S.F., et al., *Iron absorption and hepatic iron uptake are increased in a transferrin receptor 2 (Y245X) mutant mouse model of hemochromatosis type 3*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **292**(1): p. G323-8.

67. Fleming, R.E., et al., *Targeted mutagenesis of the murine transferrin receptor-2 gene produces hemochromatosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(16): p. 10653-8.
68. Griffiths, W.J., *Review article: the genetic basis of haemochromatosis*. Aliment Pharmacol Ther, 2007. **26**(3): p. 331-42.
69. Chung, J., J.R. Prohaska, and M. Wessling-Resnick, *Ferroportin-1 is not upregulated in copper-deficient mice*. J Nutr, 2004. **134**(3): p. 517-21.
70. Davies, P.S., et al., *Evidence for the interaction of the hereditary haemochromatosis protein, HFE, with the transferrin receptor in endocytic compartments*. Biochem J, 2003. **373**(Pt 1): p. 145-53.
71. Vujic Spasic, M., et al., *Physiologic systemic iron metabolism in mice deficient for duodenal Hfe*. Blood, 2007. **109**(10): p. 4511-7.
72. Vujic Spasic, M., et al., *Hfe acts in hepatocytes to prevent hemochromatosis*. Cell Metab, 2008. **7**(2): p. 173-8.
73. Nemeth, E., et al., *Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization*. Science, 2004. **306**(5704): p. 2090-3.
74. Åsberg, A., et al., *Screening for Hemochromatosis: High Prevalence and Low Morbidity in an Unselected Population of 65,238 Persons*. Scandinavian Journal of Gastroenterology, 2001. **36** (10): p. 1108 - 1115.
75. Asberg, A., et al., *Penetrance of the C28Y/C282Y genotype of the HFE gene*. Scand J Gastroenterol, 2007. **42**(9): p. 1073-7.
76. Hanson, E.H., G. Imperatore, and W. Burke, *HFE gene and hereditary hemochromatosis: a HuGE review*. Human Genome Epidemiology. Am J Epidemiol, 2001. **154**(3): p. 193-206.
77. Hauge, B.B.-I.A., *Bør jernpreparater reseptbelegges?* Tidsskr Nor Lægeforen, 2001. **121**(460-2 utga).
78. Ulvik, R.J., *Jernoverskudd- Hemokromatose og hemosiderose*. 1987: Farmakoterapi.
79. Franchini, M.M., *Hereditary iron overload: update on pathophysiology, diagnosis, and treatment*. American journal of hematology, 2006. **81**(3): p. 202-9.
80. hemokromatose, N.k.f. *Hemokromatose*. 2007 [cited 23.01.08]; Available from: <http://home.no/hemokromatose/>.
81. Le Gac, G. and C. Ferec, *The molecular genetics of haemochromatosis*. Eur J Hum Genet, 2005. **13**(11): p. 1172-85.
82. Simon, M., et al., [*Letter: Idiopathic hemochromatosis associated with HL-A 3 tissular antigen*]. Nouv Presse Med, 1975. **4**(19): p. 1432.
83. Feder, J.N., et al., *A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis*. Nat Genet, 1996. **13**(4): p. 399-408.
84. Ajioka, R.S., et al., *Haplotype analysis of hemochromatosis: evaluation of different linkage-disequilibrium approaches and evolution of disease chromosomes*. Am J Hum Genet, 1997. **60**(6): p. 1439-47.
85. Distante, S., et al., *The origin and spread of the HFE-C282Y haemochromatosis mutation*. Hum Genet, 2004. **115**(4): p. 269-79.
86. Distante, S., *Genetic predisposition to iron overload: prevalence and phenotypic expression of hemochromatosis-associated HFE-C282Y gene mutation*. Scand J Clin Lab Invest, 2006. **66**(2): p. 83-100.
87. Thompson, K., et al., *Belgrade rats display liver iron loading*. J Nutr, 2006. **136**(12): p. 3010-4.
88. Helseinformatikk, N. *Norsk helsebibliotek på nett (hemokromatose)*. 2008 [cited 23.01.08]; Available from: <http://www.legehandboka.no.proxy.helsebiblioteket.no/>.
89. Waalen, J., et al., *Screening for hemochromatosis by measuring ferritin levels: a more effective approach*. Blood, 2008. **111**(7): p. 3373-6.

90. Bhavnani, M., et al., *Targeted screening for genetic haemochromatosis: a combined phenotype/genotype approach*. J Clin Pathol, 2006. **59**(5): p. 501-4.
91. Powell, L.W., et al., *Screening for hemochromatosis in asymptomatic subjects with or without a family history*. Arch Intern Med, 2006. **166**(3): p. 294-301.
92. Adams, P.C., et al., *Hemochromatosis and iron-overload screening in a racially diverse population*. N Engl J Med, 2005. **352**(17): p. 1769-78.
93. Asberg, A., et al., *Benefit of population-based screening for phenotypic hemochromatosis in young men*. Scand J Gastroenterol, 2002. **37**(10): p. 1212-9.
94. Cobas, *Informasjonsbrosjyre om reagenser og maskin for testing av transferrin*. 2006-07: Roche Diagnostics.
95. Lande, K., *Transferrin målt med immunologiske metoder og indirekte som TIBC ved metting av blodet med jern*. 1995: Sentrallaboratoriet, Det Norske Radiumhospitalet. 1.
96. Roche, *Informasjonsbrosjyre om reagenser og maskin for testing av Serum jern*. 2004: Roche Diagnostic.
97. Cobas, *Informasjonsbrosjyre om reagenser og maskin for testing av ferritin*. 2006: Roche Diagnostics.
98. *Instuksjonsmanual til CELL-DYN 4000*. 1999.
99. Bothwell, T.H., et al., *Iron Metabolism in man*. 1979, London: Blackwell Scientific Publication. 279.
100. Asberg, A., et al., *Screening for hemochromatosis*. Blood, 2008. **111**(7): p. 3896; author reply 3897.
101. Schmitt, B., R.M. Golub, and R. Green, *Screening primary care patients for hereditary hemochromatosis with transferrin saturation and serum ferritin level: systematic review for the American College of Physicians*. Ann Intern Med, 2005. **143**(7): p. 522-36.
102. Chua, A.C., et al., *The role of Hfe in transferrin-bound iron uptake by hepatocytes*. Hepatology, 2008. **47**(5): p. 1737-44.
103. Arnold, J.D., et al., *Hyperferritinaemia in the absence of iron overload*. Gut, 1997. **41**(3): p. 408-10.
104. Crosby, W.H. and M.A. O'Neil-Cutting, *A small-dose iron tolerance test as an indicator of mild iron deficiency*. Jama, 1984. **251**(15): p. 1986-7.
105. Jensen, N.M., et al., *Low-dose oral iron absorption test: establishment of a reference interval*. Scand J Clin Lab Invest, 1998. **58**(6): p. 511-9.
106. Bozzini, C., et al., *Measurement of urinary hepcidin levels by SELDI-TOF-MS in HFE-hemochromatosis*. Blood Cells Mol Dis, 2007.
107. Øyri, A., *Norsk medisinsk ordbok*. 7. utgave ed. 2003, Oslo: Det Norske Samlaget. 1421.

11.0 Vedlegg:

11.1 Prosjektprotokoll

Jernabsorpsjon ved hemokromatose

Prosjektleder: Overlege, prof.dr.med. Rune J. Ulvik, Inst. for indremedisin og Lab. for klinisk biokjemi, Haukeland Universitetssjukehus

Prosjektmedarbeidere: Stud.pharm. Eirik Svandal Bø. Masterstudent som bruker prosjektet som masteroppgave med Ulvik som veileder.

Førsteamanuensis, overlege, dr.med. Bjørn J. Bolann Inst. for indremedisin og Lab. for klinisk biokjemi, Haukeland Universitetssjukehus

Kort om jernstoffskiftet hos mennesket

Jern er et sentralt element i mange livsviktige biokjemiske funksjoner i organismen. Normalt har en voksen person 3,5 – 4 g jern hvorav ca. 75 % er bundet til hemoglobin, 5-10 % finnes i jernlageret i lever, benmarg og milt, og resten inngår i mange ulike funksjoner i cellene, først og fremst i enzymatiske reaksjoner som utnytter jernatomets evne til å skifte redox status mellom Fe(II) og Fe(III) (for eksempel elektrontransport i mitokondrienes respirasjonskjede med dannelse av energi i form av ATP). Alle celler er i mindre eller større grad avhengige av en regelmessig tilførsel av jern til ulike biokjemiske reaksjoner.

Den menneskelige organismen har en meget stor evne til å holde på jern etter at det er absorbert fra tarmen. Tapet er utelukkende passivt og skjer ved naturlig tap av celler med sitt jerninnhold, først og fremst den daglige avstøtning av celler fra hud og tarmslimhinne. På denne måte tapes ca. 1 mg jern / døgn hos begge kjønn. Røde blodceller er rike på jern og blødning er derfor den mest effektive form for jern tap. Kvinner i fertil alder med menstruasjonsblødninger taper derfor gjennomsnittlig 0,5 – 1 mg mer jern enn menn, totalt 1,5 – 2 mg/ døgn. Normal jernstatus avhenger av at det daglige jern tapet kompenseres av absorpsjon av en tilsvarende mengde jern fra tarmen.

Transport av jern til celler og vev foregår i blodplasma hvor jern er bundet til proteinet transferrin. Det meste av transportjernet leveres til rød beinmarg som trenger 25-30 mg jern /dag for å opprettholde normal produksjon av blod. Dette jernet stammer hovedsakelig fra nedbrytning av hemoglobin i gamle blodceller mens absorbert jern (1-1,5 mg/dag) utgjør kun 3-4 % av den totale mengde transportjern.

I mangel av en aktiv fysiologisk mekanisme for utskillelse av jern, må til gjengjeld absorpsjon av jern fra tarmen reguleres meget nøye og avstemmes optimalt mot kroppens behov til

enhver tid. Jern absorberes fra øvre del av tynntarmen (duodenum, jejunum). Tilstrekkelig tilførsel av jern i kosten og de fysiologiske og biokjemiske faktorer som regulerer jernabsorpsjonen i tarmcellene, er av avgjørende betydning for å opprettholde en normal jernstatus. Inntil for vel 10 år siden var vår kunnskap om regulering av jernabsorpsjon begrenset til betydningen av de to ”ytterpunktene”: kostens sammensetning og kroppens innhold av jern med henblikk på hhv jernmangel og jernoverskudd. Hva som skjedde i tarmcellene var nesten fullstendig ukjent. Moderne genteknologi og oppdagelse av mutasjonen for den arvelige sykdommen hemokromatose i 1996, var starten på et vitenskapelig gjennombrudd som senere har ført til oppdagelse av nye proteiner i tarmens mucosa-celler og en detaljert innsikt i molekylære mekanismer for opptak, intracellulær transport og levering av jern til transferrin i plasma. Den økte innsikten i tarmcellenes rolle i reguleringen av jernstoffsiftet, har videre ført til en større forståelse av sykdommer som påvirker jernstoffsiftet med jernmangel, anemi og patologisk jernoverskudd som de klinisk viktigste uttrykksformene.

I dette prosjektet vil vi undersøke absorpsjon av jern hos pasienter med genetisk disposisjon for hemokromatose. Risiko for sykdom ved denne tilstand er koplet til dannelse av et jernoverskudd som til slutt blir så stort at det oppstår organskade, først og fremst i lever, men også andre organer som hjerte, bukspyttkjertel, endokrine organer og ledd kan bli rammet (detaljert beskrivelse nedenfor)

Klinisk betydning av forstyrrelser i jernstoffsiftet

Klinisk sett er jernmangel, jernmangelanemi, anemi ved kronisk inflammatorisk sykdom og patologisk jernoverskudd forårsaket av den arvelige sykdommen hemokromatose, de viktigste formene for ubalanse i jernstoffsiftet. Diagnostiske blodprøver er vist i Tabell 1.

Tabell 1

Vanligste blodprøver ved undersøkelse av jernstoffsiftet med henblikk på om det foreligger jernmangel, anemi eller jernoverskudd

Blodprøve	Referanseintervall	Blodprøven viser
Transferrinmetning	20-45 %	Hvor mye jern som transporteres i plasma i % av maksimal transportkapasitet
S-Ferritin	20-300 µg/L	Størrelsen på jernlageret
S-Transferrinreceptor	1,9-5,0 mg/L	Øker ved nedsatt tilførsel av jern til cellene pga. jernmangel
Hemoglobin	ca.12-17 g/dL	Nedsatt ved jernmangelanemi
S-ALAT	10-70 U/L	Øker ved celledskade i lever forårsaket av jernoverskudd

Hemokromatose og jernoverskudd

Arvelig hemokromatose er den viktigste årsak til patologisk overskudd av jern. Sykdommen skyldes en punktmutasjon C282Y i hemokromatosegenet (HFE-genet). Mutasjonen fører til en endring i HFE-proteinet på den basolaterale siden av tarmcellene. Den molekylære reguleringen av jernopptak fra tarmen svikter og det tas opp 0,5 – 1 mg mer jern pr dag enn det er behov for. Dette medfører at det over år langsomt bygges opp et jernoverskudd med avleiring av jern først og fremst i leverparenkymet, men etter hvert også i leddkapsler, endokrine organer, hud og hjerte. Over et visst nivå vil jernoverskuddet gi organskade og forskjellige sykdommer, avhengig av hvilket organ som rammes. Det vanligste er leversykdom, leddsykdom, diabetes mellitus, ulike former for hormonsykdommer og hos noen også alvorlig hjertesykdom (myokardiopati). Innledende symptomer er ofte øket tretthet, slapphet (asteni), leddsymptomer og tegn på begynnende hepatittlignende leversykdom med lett til moderat øket ALAT-verdi. Den største risiko er fare for utvikling av leverfibrose, cirrhose og kreft i lever. Ubehandlet er risikoen for å få leverkreft øket med ca. 200 ganger. Sykdom forårsaket av patologisk jernoverskudd har ingen spesifikke symptomer eller kliniske tegn, og derfor kan den egentlige årsaken lett bli oversett hvilket fører til at pasienten ikke blir adekvat behandlet. Behandlingen består i å fjerne jernoverskudd ved hjelp av årelating. Hos enkelte kan det være behov for regelmessig årelating over lang tid. Hemokromatose kan påvises i preklinisk stadium lenge før det oppstår kliniske symptomer, ved hjelp av følgende blodprøver som er varig endret: S-Ferritin > 300 µg/L (hos unge mennesker er grensen lavere og avhenger av alder) og Transferrinmetning > 50 – 55 %. Påvisning av homozygot for C282Y- HFE-mutasjonen støtter preklinisk diagnose. Mutasjonen er imidlertid ikke noe absolutt krav for å få hemokromatose, idet 12-15 % av de med jernoverskudd har normal genstatus.

Kliniske symptomer er i begynnelsen diffuse og blir markerte først når S-Ferritin overstiger 500 – 600 µg/L.

I tillegg til C282Y-mutasjonen er også H63D-mutasjonen av en viss betydning, særlig når det forekommer samtidig med C282Y, såkalt ”combined heterozygot” C282Y/H63D.

Prevalens av homozygot C282Y-mutasjon i Norge er 0,5-0,6 %, mens heterozygote forekommer hos 12-15 %. Tilstanden er derfor utbredt og er den hyppigst forekommende genetiske stoffskifteforstyrrelse i Norge og andre land med befolkning som stammer fra Nord-Europa.

Absorpsjon av jern ved hemokromatose er øket, men mye tyder på at genetisk penetrans varierer betydelig fra individ til individ. Jernabsorpsjonen er øket både ved homozygot og

heterozygot mutasjon i HFE-genet, men klinisk erfaring viser at det er dårlig samsvar mellom mutasjon og størrelsen på jernoverskuddet selv hos individer over 60 år hvor en ville forvente at det etter så mange leveår ville ha dannet seg et større jernoverskudd. Det mangler således fortsatt mye kunnskap for å forstå de pathofysiologiske mekanismene bak jernoverskuddet ved hemokromatose

Prosjekt

Hensikten er å studere absorpsjon av jern hos individer med hemokromatose og med ulik størrelse på jernoverskuddet, samt med ulik genstatus: normal, homozygot, heterozygot og ”combined heterozygot” for C282Y- og H63D-mutasjon i HFE-genet. Til dette formål anvendes en rutinemessig jernbelastningstest (se nedenfor)

Vi vet at øket absorpsjon av jern er den fundamentale årsak til at individer med HFE-mutasjonen risikerer å få et jernoverskudd, men vi vet praktisk talt ingenting om hvorfor denne risikoen synes å variere betydelig fra individ til individ.

En nærliggende hypotese er at opptak av jern fra tarm varierer avhengig av genetisk status og størrelsen på jernoverskuddet i den forstand at absorpsjonen svekkes ved stort jernoverskudd. Disse klinisk betydningsfulle forhold har vært lite undersøkt og vi kjenner ikke til at det har vært gjort systematiske studier av jernabsorpsjon hos individer i ulike stadier av genetisk hemokromatose mht. genetisk status og jernstatus.

Kunnskap om jernabsorpsjonen hos individer som utredes for hemokromatose, kan føre til en mer målrettet diagnostikk og behandling. Gjeldende praksis er en relativt liberal holdning til å iverksette årelating for å fjerne overskuddsjern ut fra en betraktning av at behandlingen er fri for bivirkninger og formålet med behandlingen virker fornuftig. Det foreligger imidlertid ingen vitenskapelige holdbare data som viser om det er skadelig å unnlate og fjerne et lett til moderat jernoverskudd, hvilket er den hyppigste uttrykksform i vår befolkning. Bedre kjennskap til sammenhengen mellom jernabsorpsjon, genstatus og jernstatus kan bidra til en bedre faglig vurdering av pasientens tilstand, og eventuelt føre til bedre, evidensbasert indikasjon for å iverksette behandling med årelating. Unødvendig årelating bør unngås da det er en tids- og kostnadmessig belastning både for individ og hospital.

Nullhypotese

Det er ingen forskjell i absorpsjon av jern bestemt ved jernbelastningstest, hos individer med mutasjon i HFE-genet og med ulike stadier av jernoverskudd.

Jernbelastningstest

Gjeldende rutinetest vil bli anvendt med den forskjell at det taes to prøver etter inntak av jerntablett, etter 1 og 2 timer, istedenfor kun etter 2 timer. Pasienten møter fastende. Det taes

først en blodprøve ("nullprøven") for å kartlegge individets jernstatus samt kontroll av leverprøver. Deretter inntas en jerntablett, Niforex som inneholder 100 mg jern. Ny blodprøve tas etter 1 og 2 timer. Økning i transferrinmetning vil avhenge av grad av jernabsorpsjon. Jo større absorpsjon, jo høyere blir transferrinmetningen.

Tabell 2

Blodprøver og analyser som vil bli tatt i forbindelse med jernbelastningstest

Tidspunkt	Analyse
Nullprøve	Hb, MCV, Ferritin, Transferrinmetning, Transferrinreseptor, ALAT, ASAT,GT,ALP,CRP, spormetaller
1-time prøve	Transferrinmetning
2-timers prøve	Transferrinmetning, Transferrinreseptor, spormetaller

Design

Prosjektet er en masteroppgave for stud.pharm. Eirik Svandal Bø, og må gjennomføres innen en begrenset tidsperiode høst 2007 – vinter 2008. Denne rammen begrenser omfanget av studien som derfor har karakter av en pilot-tverrsnittsstudie med åpen design når det gjelder kjennskap til pasientenes gen- og jernstatus samt ingen inndeling i test- og placebogruppe. Resultatene vil imidlertid danne grunnlag for en større og utvidet studie senere.

Det anvendes en case-control design, ved at resultatene fra enkeltpasienter sammenlignes med resultatet fra en frisk person med samme kjønn og alder og uten hemokromatose eller jernoverskudd av annen årsak.

Deltagerne må besvare et spørreskjema for å kartlegge alkoholvaner, røking, sykdomshistorie, kosthold og bruk av andre mineraler og vitaminer. Deltagelse baseres på informert samtykke.

Tabell 3

Undersøkelseskategorier

Genststatus						
Jernoverskudd S-Ferritin (ug/L)	C282Y +/+	C282Y +/-	C282Y/H63D	H63D +/ +	H63D +/-	C282/ H63*
50 - 200	X	X	X	X	X	X
300 - 500	X	X	X	X ?		
> 700	X					

* C282 / H63 = normal HFE-genstatus

Det taes sikte på å rekruttere 10-15 deltagere i gruppene med C282Y-mutasjon og med normal genstatus. I gruppene med H63D-mutasjon er tilgang på pasienter mye lavere, og en tar sikte på å rekruttere de som oppdages med denne mutasjonen.

Inklusjons- og eksklusjonskriterier

Pasientene rekrutteres delvis prospektivt fra Hemokromatosepoliklinikken, Hematologisk seksjon, Med. avd., og delvis retrospektivt fra behandlingsgruppen for årelating ved Blodbanken. Selv om denne måten å rekruttere på ikke er ideell, ansees den som tilfredsstillende for en pilotstudie. Ensidig prospektiv rekruttering vil dessuten ikke skaffe nok deltagere innen den tid som er avsatt til studien.

Inklusjonskriterier: Kvinner og menn over 18 år med hemokromatose med ulike stadier av jernoverskudd slik at de kan plasseres i de kategorier som er vist i Tabell 3. Kvinner og menn over 18 år som er friske og med normal genstatus og normalt jernstoffskifte.

Hb: 11,5 -17,5 g/dL og CRP < 5 mg/L hos alle som inkluderes.

Eksklusjonskriterier: Klinisk sykdom som utelukker deltagelse.

Anonymisering og oppbevaring av data

Alle data vil bli aidentifisert og anonymisert. Prosjektleder vil oppbevare en liste over deltagerne med prøvesvar i opp til 5 år etter avsluttet prosjekt. Deretter destrueres alle data fra prosjektet.

Etikk

Studien innebærer ingen kjente etiske betenkeligheter. Jernbelastningstesten og inntak av en lav dose jern (100 mg), har ingen kjente bivirkninger.

Bekjentgjørelse

Prosjektet blir kjentgjort i masteroppgaven for Eirik Svandal Bø, og vil deretter bli bearbeidet for publikasjon i internasjonalt medisinsk tidsskrift.

11.2 Informasjonsbrev

Bedriftshelsetjenesten

Frank Mohn AS

v/ dr. Knut Walther og bedr.sykepleier Ingjerd Aam Leversen

PO Boks 98 Slåtthaug

5851 Bergen

17.9.2007

Forskningsprosjekt

Jeg har fått godkjent et forskningsprosjekt hvor jeg skal undersøke opptak av jern hos pasienter med hemokromatose.

Jeg trenger en sammenligningsgruppe av friske kvinner og menn som vil gjennomføre samme forsøk som pasientene, nemlig innta en jerntablett og deretter få målt jerninnhold i blod etter 1 og 2 timer.

Jeg har snakket med dr. Knut Walther om prosjektet og muligheten for å rekruttere friske kontrollpersoner fra deres bedriftshelsetjeneste i Heldal og / eller Sandsli. Han ba meg sende et brev om opplegget.

Opplegget er altså:

Finne 20 friske kvinner og menn i alder 20 – 65 år som på forespørsel kan være med i prosjektet. Prosjektet er godkjent av Etisk Komité og de som blir forespurt vil få detaljert informasjon og må gi informert samtykke (dvs. undertegne forespørsel).

For å finne 20 individer av hvert kjønn som kan bli forespurt, må vi først screene et visst antall, kanskje 30 – 35 personer fordelt på ulike aldersgrupper, idet noen antagelig ikke vil kunne gå videre i prosjektet.

Screeningen består i at det blir tatt en enkelt blodprøve som blir analysert her på Lab. for klinisk biokjemi, Haukeland Sykehus. Av de som blir screenet og som kan inkluderes, velger jeg ut 20 kvinner og menn som vil bli spurt om å gå videre og delta i selve forsøket. Det vil innebære at de møter opp fastende om morgenen på avtalt sted, det tas en blodprøve (nullprøve), så svelges en jerntablett (100 mg) og deretter må det tas en ny blodprøve etter 1 og 2 timer. I denne tiden kan de drikke vann, men ikke spise. Etter at blodprøve nr. 2 er tatt, er forsøket slutt.

Jeg kan stille opp med alt utstyr og bioingeniør til å ta prøvene – dersom dette er ønskelig fra deres side. Prøvetaking og gjennomføring av forsøket kan skje på deres legekantor på passende dager. Dermed skulle belastningen på deres kontor og bruke av deres ressurser bli

nærmest null, bortsett fra arbeidet med å innkalle de personer som skal screenes. En slik innkalling kan skje ved tilfeldig utvelgelse av ansatte som man vet er friske, innen ulike aldersgrupper. Dette kommer jeg tilbake til.

Prosjektet inngår som del av en masteroppgave for student i farmasi Eirik Svandal Bø, som sammen med en bioingeniør vil være med og kan bistå i det praktiske opplegget.

Prosjektet er viktig for å få øket kunnskap om sykdomsmekanismen bak hemokromatose og oppbygging av jernoverskudd. Jeg viser til Etisk Komite (vedlagt) som uttaler at de anser ... ” dette som en svært solid studie”.

Jeg håper at Bedriftshelsetjenesten kan bidra til prosjektet, da vi er helt avhengige av å ha en kontrollgruppe av friske personer.

Dersom det er ønskelig, kan jeg mer enn gjerne møte opp på deres kontor og redegjøre nærmere for studien og det praktiske opplegget.

Fint om dere kan gi tilbakemelding så snart som mulig.

Vennlig hilsen

11.3 Forespørsmål om å delta i forskningstudie:

Undersøkelse av jernabsorpsjon ved arvelig disposisjon for sykdommen hemokromatose

Denne forespørselen går til et utvalg friske kontrollpersoner.

Vi vil undersøke absorpsjon av jern hos personer med arvelig disposisjon (genmutasjon) for sykdommen hemokromatose og sammenligne disse med friske kontrollpersoner. Til dette formålet brukes en enkelt jernabsorpsjonstest hvor vi måler innhold av jern i blod etter inntak av en jerntablett (detaljer nedenfor). Undersøkelsen har ingen negativ helserisiko verken for pasienter med påvist jernoverskudd eller friske. Grunnen er det lave innhold av jern, 100 mg, i jerntabletten.

Hemokromatose er den mest utbredte arvelige stoffskiftesykdom i vårt samfunn. Årsaken er en arvelig disposisjon for øket absorpsjon av jern fra kosten. Dette fører langsomt til dannelse av jernoverskudd og etter hvert organskade og sykdom. Prosessen varierer betydelig fra person til person og vi kjenner lite til hvor stor jernabsorpsjonen er i de ulike stadier. Dette er viktig å kartlegge for å kunne bedømme den enkeltes risiko for å få et jernoverskudd, hvor raskt det går og dermed kunne gi bedre behandling.

Deltakelse i studien betyr at De må møte fastende på arbeidsplassen eller annet avtalt sted og få utført en jernbelastningstest. Dette vil ta totalt ca. 2,5 timer. Det tages 3 blodprøver, ved ankomst og 1 og 2 timer etter inntak av en jerntablett. Ventetiden kan brukes fritt etter eget ønske bortsett fra at De kun drikke vann og spise 2 brødsiver hvitost. De vil bli bedt om å utfylle et enkelt spørreskjema om kosthold, kosttilskudd, røke- og alkoholvaner.

Blodprøvene vil bli analysert for med henblikk på jernstatus, lever-, nyre- og skjoldbruskkjertelens funksjon. Ved uventet resultat kan også andre analyser bli utført.

Alle opplysninger vil bli aidentifisert slik at de bare spores tilbake til den enkelte deltaker ved hjelp av kodennummer. Bare prosjektleder har tilgang til deltakernes identitet, og har taushetsplikt. Prosjektleder står ansvarlig for behandling av persondata. Datamaterialet anonymiseres ved prosjektslutt, senest innen utgangen av 2008. For øvrig har deltakelse ingen praktisk følger for Dem. Prosjektet antas å vare i 1 år. Innsamlet materiale og opplysninger kan bli lagret i 5-10 år.

Det er frivillig å delta. De trenger ikke bestemme deg nå. Dersom De velger å ikke delta, trenger De ikke oppi noen grunn for dette. De kan også til enhver tid trekke samtykket tilbake,

kreve det biologiske materialet destruert og kreve at innsamlede helse- og personopplysninger blir sletter eller utlevert, med mindre opplysningene allerede er inngått i vitenskaplige arbeider.

Del vil ikke påvirke eventuell senere behandling ved sykehuset om De deltar eller ikke.

Prosjektet er finansiert av Universitetet i Bergen og Haukeland Universitetssykehus. Det vil bli søkt om støtte fra Norske Hemokromatoseforbund og Helse & Rehabilitering. Det er meldt til Personvernombudet for forskning, Norsk samfunnsvitenskaplige datatjeneste AS.

Dersom noe er uklart, kan De kontakte prosjektleder.

Vennlig hilsen

Overlege, professor dr.med. Rune J. Ulvik (prosjektleder)

Laboratorium for klinisk biokjemi og Institutt for indremedisin, Haukeland

Universitetssykehus

Tlf. 55973149 / 55973100

SAMTYKKEERKLÆRING

Jeg har mottatt muntlig og skriftlig informasjon om forskningsstudien:

”Undersøkelse av jernabsorpsjon ved arvelig disposisjon for sykdommen hemokromatose” og er villig til å delta.

Dato: _____ Underskrift: _____

Blokkbokstaver: _____

11.4 Jernbelastningstest

Helse Bergen Lab for klinisk biokjemi				Dok.id.: D.II/4.2-5
Jernbelastning				Prosedyrebeskrivelse, generell
Utgave: 2.00	Skrevet av: Rune J. Ulvik	Gjelder fra: 14.03.2008	Godkjent av: Bjørn Johan Bolann	Siden: 93 av 97

Indikasjon:

- Mistanke om eller tegn på sviktende absorpsjon av jern
- Terapisvikt ved bruk av jerntabletter
- Behandling med parenteral, i.m. eller i.v. tilførsel av jern, må ikke settes i gang før det er utført en jernbelastningstest som viser sterkt nedsatt eller opphevet peroral absorpsjon av jern.

Utførelse:

- Hvor utføres testen ?
LKB sin poliklinikk. Pasienten møter ca. klokken 0800 om morgenen medbringende rekvisisjonskjema.
- Forberedelse av pasient
 - Seponer jerntabletter 3-4 dager før test. Seponer jernsprøyter 2 uker før test
 - Pasienten møter fastende om morgenen. Kan kun drikke vann før og under test.
 - Eventuelt bruk av tetracyklin seponeres 12 timer før test
- Valg av jerntablett
Niferex kapsel (100 mg) - hurtig absorberbart jern (ferroglysinulfat).
- Utførelse
 - Ta først en blodprøve kalt "0-prøve" til analyse av S-Transferrinmetning og S-Ferritin
 - Pasienten svelger en kapsel Niferex (100 mg) mg med et glass vann
 - Prøve I taes en time etter inntak av jerntablett til analyse av S-Transferrinmetning
 - Prøve II taes to timer etter inntak av jerntablett til analyse av S-Transferrinmetning
 - Prøveglassene merkes "0-prøve", "prøve I", "prøve II"
 - Pasienten kan kun drikke vann inntil blodprøve II er tatt
- Rekvisisjon og svarrapport

- Testen rekvireres ved å skrive ”jernbelastning” i åpent felt på rekvisisjonsskjema. Det skal ikke krysses av for de enkelte analyser !
- Andre analyser skal rekvireres på eget skjema !
- Analyseresvar rapporteres særskilt for ”0-prøve”, ”prøve I” og ”prøve II”, med oppgitt klokkeslett for når tid prøvene ble tatt.
- Registreres i Netlab som FEBEL.

Tolkning

Transferrinmetningen (Tfsat) bør normalt stige signifikant fra 0-prøven til verdier > 40 – 50 % i prøve I og / eller prøve II.

Jernabsorpsjon viser normalt store individuelle variasjoner og derfor vil enhver stigning i Tfsat være uttrykk for et visst jernopptak. Selv ved en liten stigning i Tfsat, vil det ofte likevel være den beste løsningen for pasienten å ta jerntabletter istedenfor å starte med parenteral behandling.

11.5 Oversikt over noen av de viktigste proteinene som er med i jernabsorpsjonen og jernmetabolsimen.

Tabell 10: Oversikt over noen av de viktigste proteinene som er med i jernabsorpsjonen og jernmetabolsimen. [2, 28, 34, 43, 47, 107]

Protein	Plassering, struktur og funksjon
Proteiner involvert i transport av jern	
Duodenal cytochrome b (Dcytb)	En membran ferric reductase, som finnes på den apikale overflaten av enterocytten. Reduserer Fe^{3+} til Fe^{2+} .
Divalent metal transporter 1 (DMT1)	Enkelkanalet membranbundet glykoprotein, som virker som en membran metalltransportør, som finnes på den apikale overflaten av enterocytten, makrofager og erythrocytter. Transporterer jern og diverse andre metaller over cellemembranen og inn i cellen.
Ferropotin 1 (FPN1) (SLC40A1, Ireg1, MTP-1)	Membran jerneksportere, transportere jern fra innsiden av cellen og ut i blodbanen. Finnes i den basolaterale siden av enterocytten, samt makrofager, galle, beinmarg, Hepatocytter og Kupffer celler i leveren.
Hephaestin (HEPH)	Transmembranbundet Ceruloplasmin lik ferroxidase, oksiderer Fe^{2+} til Fe^{3+} i det den har blitt fraktet over cellemembranen av FPN1. Finnes hovedsakelig i enterocytterne.
Hemojuvelin (HJV)	Protein som finnes lever, skjelett muskler, hjerte i tillegg til at det finnes i en løselig form i plasma, er en stekt regulator for hepcidin.
Transferrin (Tf)	Transportprotein som er et 80 kDa glykoprotein bestående av en singel polypeptidkjede og to N-linkede glycan kjede komplekser, finnes i plasma og ekstracellulær væske og kan binde to jernatomer.
Transferrin reseptor 1 (TfR1)	Membranreseptor dimer som består av to 90 kDa deler og er med i reseptor mediert endocytose av diferric Tf i erythrocytter, makrofager og hepatocytter. Binder også til seg membranprotein HFE.
Transferrin reseptor 2 (TfR2)	Membranreseptor som er involvert i endocytose av diferric Tf i lever and i tarmens cryptceller, kan også ha med regulering av hepcidin.
Zrt-Irt-like protein (ZIP14)	Transmembran protein med 8 helikser, finnes mest i lever. Hovedfunksjonen er å transportere sink, men også NTBI.
Lactoferrin	Jernbundet protein som skilles ut i melk, i tillegg til at det finnes i nøytofil granulocyt der det har positiv antibakteriell aktivitet
Proteiner som er involvert i jernlagring	
Ferritin	Kuleformet intracellulært jernlagringsprotein, som består av 24 L- and H-ferritin subenheter. Ferritin i lever, galle og plasenta inneholder mer L kjedede subenheter, mens i RBC og monocytter er det i hovedsak H-ferritin subenheter [28]. Kan binde opptil 4500 jernmolekyler, finnes i blod og alle andre celler som har med jernmetabolsimen og gjøre.
Hemosiderin	Vannløselig ufullstendig og delvis nedbrutt biprodukt av ferritin som finnes i størst omfang spesielt i lysosomer i galle, Kupffer celler og beinmarg særlig ved jernoverskudd. Tilgangen til jernet for å få danne frie radikaler går ned ved lagring i hemosiderin i forhold til ferritin, og ses derfor på som en fordel ved jernoverskudd.
Proteiner som er involvert i reguleringen av jern.	

HFE	Et membranbundet protein som interagerer med TfR 1 og regulerer affiniteten til reseptoren, som igjen påvirker produksjonen av hepcidin. Binder til seg β -microglobulin for å få den rette konformasjonen.
Iron regulatory protein (IRP)	Cytosolisk RNA-bindings protein (IRP-1 og IRP-2) som koordinerer avlesnings regulering av transferrin reseptor, ferritin og andre jern ansvarlige elementer som inneholder IRE på mRNA.
Iron regulatory element (IRE)	IRP binder seg til IRE som sitter på mRNA til diverse proteiner som DMT1, der det er med å regulere translasjonen av mRNAet.
Ceruloplasmin (CP)	Et plasma kobberavhengig ferroxidase, oksidere Fe^{2+} til Fe^{3+} , som finnes hovedsakelig i blodet.
Hepcidin	Et leverprodusert peptid som er med og styrer opptaket av jern. Reduserer og nedregulerer FPN1 og HEPH, slik at utskillelsen jern fra cellene blir redusert.
HAMP	Genet som regulerer transkriberingen av hepcidin i leveren.
Deferoksamin	Et molekyl som kan binde treverdige jern, brukt som legemiddel ved jernforgiftning, HH, maria ++.
Proteiner som er involvert i mitokondriell jern metabolisme	
Haptoglobin (Hp)	Protein i plasma som binder Hemoglobin fra sprukne RBC
CD163	En Hemoglobin (Hb)/Haptoglobin kompleks (Hp) membranreseptor som bare finnes i monocytter og makrofager
Hemoksidase (HMOX1)	Heme oksygenase, et enzym som spalter heme til biliverdin, CO og frigjør jernet, finnes i makrofager og enterocytene.
Fratxin (FRDA)	Mitokondriell jernhomeostase, fordeler jernet til ulike reaksjoner i mitokondriene.
ATP-bindin casse 7 transporter (ABC7)	Transporter som er involvert i mitokondriell jernhomeostase og væsning av jernsvovel proteinkomplekser.
Ferrochelataze	Et enzym som er ansvarlig for å inkorporere jern inn i hemkomplekset.
Mitoferrin	Mitokondriell jern importer som finnes på mitokondrie membranen og frakter jern inn i mitokondrien.

11.6 Oversikt over noen av de viktigste enzymene og proteinene som inneholder jern.

Tabell 11: Oversikt over noen av de viktigste enzymene og proteinene som inneholder jern.[2]

Enzym	Struktur og funksjon
Heme	Finnes i hemoglobin i erytrocyttene og myoglobin i musklene og har som hovedoppgave å frakte oksygen rundt i kroppen Medhjelper i andre enzymkomplekser og virker på det aktive sete på cytochrome, som trengs i elektrontransport kjeden.
Peroxidase enzymer	Inneholder også heme og er viktig for cellens forsvar mot oxidative skader ved å redusere peroxider til vann.
Myeloperoxidase	Et hemeinnholdende peroxidase enzym som er unik for nøyttil granulocyt og monocytter som binder til superoxidative anion radikaler og hydrogen peroksider og kan forme et utall av oksidative produkter.
Jernsvovel komplekser	Viktige enzymer i trikarboksylsyresyntesen, viktig for cellulær energi produksjon via oksidative fosforeringsreaksjoner ved bruk av karbohydrater og fett.
Mirtokondreill aconitase	Katalyserer overføringen av citrat til isocitrat i trikarboksylsyre syntesen.
Metalloenzymer	Viktige enzymer for omdanning til ulike substanser i kroppen, da spesielt i produksjonen av signalmolekyler.
Aromatic amino acid hydroxylases	Dette er en monooxygenase som innfører et ekstra oksygen til substratet som blir hydroksylert. Disse enzymene trenger tetrahydrobiopterin som kofaktor og er involvert i syntesen av tyroksin, DOPA (forløper til dopamin), 5-hydroxy-tryptophan (forløper til serotonin).
5-lipoxygenase	Dette er en dioxygenase som tilfører to oksygenatomer til substratet og har en viktig rolle i biosyntesen av proinflammatorisk leukotriener.