

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. D. Häussinger

Klinische Evaluierung von Patienten mit Morbus

Wilson

- Bedeutung von Eisenparametern und
transienter Elastographie -

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Kristin Giese-Westerkamp

2018

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Andreas Erhardt

Zweitgutachter: Prof. Dr. Gerald Antoch

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Erhardt A, Westerkamp K, Häussinger D, Hefter H. HFE gene mutations and iron metabolism in Wilson's disease. Poster anlässlich des Kongresses der American Association for the Study of Liver Diseases 2008 in San Francisco.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AFP	Alpha-Fetoprotein	GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
ALT	Alanin-Aminotransferase	HBV	Hepatitis B-Virus
AP	alkalische Phosphatase	HCC	hepatozelluläres Karzinom
APRI	<i>aspartate aminotransferase to platelet ratio index</i>	HCP1	<i>Heme carrier protein 1</i>
AST	Aspartat-Aminotransferase	HCV	Hepatitis C-Virus
ATP7B	<i>ATPase, Cu⁺⁺ transporting, beta polypeptide</i>	HFE-Gen	<i>High Fe-(Eisen) Gen</i>
AUC	<i>area under the curve</i>	HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
AUROC	<i>area under the receiver operator curve</i>	IL	Interleukin
BMI	<i>Body-Mass-Index</i>	Ireg1	<i>iron regulated-transporter-1</i>
BMP	<i>bone morphogenic protein</i>	IRP	<i>iron response proteine</i>
Cu24h	Kupfer im Urin (mg/l)	kPa	Kilopascal
CuUrin	Kupferausscheidung im 24-Stunden-Sammelurin (mg/d)	MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
CytB	Cytochrom B-Reduktase	MHz	Megahertz
DMT1	<i>divalent metal transporter 1</i>	mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>	MT-2	Metriptase-2
Gamma-GT	Gamma-Glutamyl-Transferase	MW	Morbus Wilson
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase	NPV	<i>negative predictive value</i>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

PBC	primär biliäre Zirrhose	TfR	Transferrinrezeptor
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>	TFS	Transferrinsättigung
PPV	<i>positive predicitive value</i>	TGFβ1	<i>transforming growth factor beta 1</i>
PSC	primär sklerosierende Cholangitis	TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor α
STAT-3	<i>signal transducers and activators of transcription</i>		

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Epidemiologie des Morbus Wilson	1
1.2	Pathogenese des Morbus Wilson	1
1.3	Klinik des Morbus Wilson	2
1.4	Diagnostik	3
1.4.1	Diagnostik des Morbus Wilson.....	3
1.4.2	Fibrosediagnostik.....	5
1.4.2.1	Invasive Fibrosediagnostik	5
1.4.2.2	Nicht-invasive Fibrosediagnostik	6
1.5	Eisenstoffwechsel	12
1.5.1	Bedeutung des Hepcidins bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen.....	14
1.5.2	HFE-Gen und Assoziation zum Eisenstoffwechsel und Interaktionen zwischen Eisen- und Kupferstoffwechsel	20
1.6	Zielsetzung der Arbeit	24
2	PATIENTEN UND METHODEN	26
2.1	Patienten.....	26
2.2	Methoden.....	28
2.2.1	Fibroscan®	28
2.2.1.1	Durchführung der Messung	30
2.2.2	Nachweis von HFE-Genmutationen.....	30
2.2.3	Bestimmung der Eisenparameter	31
2.2.4	Histologie	31
2.3	Statistische Verfahren.....	31
3	ERGEBNISSE	33
3.1	Ergebnisse des Fibroscans®	33
3.2	Ergebnisse des Fibroscans® bei den Folgeuntersuchungen.....	34

3.3	Unterschiede des Alters, des BMI und der Laborparameter bei Patienten mit und ohne Leberzirrhose (Ermittlung der Zirrhose durch transiente Elastographie)	38
3.4	Korrelation zwischen Alter, BMI und Laborparametern und Ergebnis der Fibroscan®-Untersuchung	42
3.5	Korrelationen zwischen Alter, BMI und den Laborparametern untereinander	44
3.6	Unterschiede zwischen Wilson-Patienten mit histologisch gesicherter Leberzirrhose und solchen ohne Leberzirrhose bezogen auf Laborparameter und Lebersteifigkeit.....	47
3.7	Ergebnisse der HFE-Genmutationsanalyse	50
3.8	Vergleich von Eisenparametern, HFE-Genmutationen und Coeruloplasmin	51
4	DISKUSSION	55
4.1	Vergleich der Ergebnisse der Messung der Lebersteifigkeit mittels transienter Elastographie bei Patienten mit Morbus Wilson mit den Ergebnissen gesunder Probanden.....	55
4.1.1	Sensitivität und Spezifität der transienten Elastographie	55
4.1.2	Mögliche Fehlerquellen bei der Messung	56
4.2	Folgeuntersuchungen mittels Fibroscan®.....	58
4.3	Unterschiede der Blutparameter bei Wilson-Patienten mit mittels transienter Elastographie ermittelter Leberzirrhose.....	60
4.4	Beeinflussung der transienten Elastographie durch andere Parameter	62
4.5	Assoziation von histologisch gesicherter Leberzirrhose mit Leberwerten, Eisenparametern und Lebersteifigkeit	64
4.6	Assoziation von Eisenparametern mit HFE-Genmutationen und Coeruloplasmin	68
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	73
6	LITERATUR UND QUELLENVERZEICHNIS	75

1 EINLEITUNG

1.1 Epidemiologie des Morbus Wilson

Der Morbus Wilson ist eine seltene autosomal-rezessiv vererbte Krankheit. Die Prävalenz liegt bei ca. 1:30.000, woraus sich eine Genfrequenz in der Normalbevölkerung von 1:90 ergibt. Es wird aber auch über ein geringeres Vorkommen (1:40.000-1:75.000) berichtet (Huster D et al., 2005).

1.2 Pathogenese des Morbus Wilson

Grund für die Krankheit ist die Kupferakkumulation und -toxizität, die durch die Fehlfunktion des hepatischen Kupfertransportproteins ATP7B (syn. *Wilson disease protein*) entsteht. Ursache für die Fehlfunktion sind Mutationen im ATP7B-Gen. Das Wilson-Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 13 lokalisiert. Die genaue Lokalisation ist das Band 13q14-q21 des Chromosoms 13. Beim Vorliegen von Morbus Wilson wurden mehr als 250 verschiedene Genmutationen beschrieben (Huster D, 2006). Das große Transmembranprotein ATP7B, das eine P₁-Typ-ATPase ist, vermittelt zum einen die Bindung von Kupfer an Coeruloplasmin und zum anderen seine biliäre Ausscheidung, wenn der Kupfergehalt zu hoch ansteigt. Die Fehlfunktion des Kupfertransportproteins ATP7B führt zu einer Anreicherung von Kupfer in der Leber, die schließlich zur Leberschädigung unterschiedlichen klinischen Ausmaßes sowie zu schweren neurologischen und psychiatrischen Problemen führt (Huster D et al., 2005). Die Toxizität des Kupfers ist darauf zurückzuführen, dass es als starkes Oxidationsmittel fungiert (Brewer GJ, 2006). Der Pathomechanismus der neurologischen und psychiatrischen Beschwerdesymptomatik ist noch nicht vollständig geklärt, eine Kupferfreisetzung ins Blut mit nachfolgender Ablagerung in neuronale Gewebe ist jedoch denkbar (Huster D et al., 2005).

Aus dem oben beschriebenen Defekt der Bindung von Kupfer an Transportproteine resultiert ein bei insgesamt vermindertem Serumkupfer erhöhter Serumspiegel des freien, nicht gebundenen Kupfers. Das Coeruloplasmin ist bei 95% aller Wilson-Patienten vermindert.

Wird die Krankheit nicht behandelt, führt sie zum Tode, bei unzureichender Therapie ist mit schweren Defekten zu rechnen (Freitag C, 2003).

1.3 Klinik des Morbus Wilson

Die klinischen Symptome lassen sich beim Morbus Wilson grob in neurologische Symptome und sonstige Symptome unterteilen (Meyerrose KW, 1989), wobei die häufigsten Symptome Leberkrankheiten und neuropsychiatrische Störungen sind. Der Morbus Wilson beginnt in der Regel mit einer präsymptomatischen Phase, während der die Kupferablagerung in der Leber eine subklinische Hepatitis verursacht. Im Verlauf kann es zu Leberzirrhose und neuropsychiatrischen Symptomen kommen. Morbus Wilson kann sich auch als fulminantes Leberversagen mit einer assoziierten Coombs-negativen hämolytischen Anämie und akutem Nierenversagen präsentieren (Merle U et al., 2007).

Die Erstsymptomatik tritt im Durchschnitt in einem Lebensalter von 15,5 Jahren auf (Meyerrose KW, 1989). In anderen Studien wird das mittlere Alter, mit dem die ersten Symptome auftreten, mit 17,4 Jahren angegeben. Dazu ist anzumerken, dass Patienten mit führender hepatischer Manifestation insgesamt früher klinische Symptome zeigen als solche, die vorwiegend neurologische Symptome vorweisen (15,5 vs. 20,2 Jahre) (Merle U et al., 2007).

Als führende klinische Symptome bei Diagnosestellung findet man den Kayser-Fleischer'schen Kornealring, der bei 67% der Patienten zu finden ist, eine Hepatomegalie bei knapp 50% der Patienten und eine Splenomegalie, ebenfalls in knapp 50% der Fälle. Eine Hepatosplenomegalie findet man bei 37% der Patienten. Unter abdominellen Schmerzen leiden 41% der Patienten bei Diagnosestellung.

Sprachstörungen, die bei etwa 50% der Patienten bei Diagnosestellung zu finden sind, Tremor, der bei etwa 47% der Patienten zu beobachten ist, Schreibstörungen, die bei 35% der Patienten vorkommen und Dysdiadochokinese, die bei 31% zu verzeichnen ist, sind die wesentlichen neurologischen Symptome.

Weitere neurologische Symptome sind Gangunsicherheit, Leistungsabfall, Hyper-salivation, psychische Auffälligkeiten, Kopfschmerzen, Schluckstörungen, Konzentrationsschwäche, Nervosität, Hypo- bzw. Amimie, Schwindel, Sehstörungen und Krampfanfälle.

Sonstige Symptome bei der Diagnosestellung des Morbus Wilson sind, außer den bereits erwähnten, Thrombopenie, Aszites, ikterische Schübe, Hämolyse, Hochwuchs, Gynäkomastie, Ösophagusvarizen, Anämie, Leukopenie, Arthralgien, Durchfall, bläuliche Lunulae, Erbrechen, Knochendeformitäten, Hyperpigmentierung der Beine, atypische Keratitis, Ödeme, Fieber und Leukozytose (Meyerrose KW, 1989).

1.4 Diagnostik

1.4.1 Diagnostik des Morbus Wilson

Ein hepatischer Kupfergehalt von über 250µg/g Trockengewicht ohne das Vorliegen einer Cholestase wird bisher als der sicherste diagnostische Test angesehen, aber auch ein Wert unter 250µg/g schließt die Diagnose Morbus Wilson nicht sicher aus. Die Diagnose beruht vielmehr auf einer Kombination aus klinischen und biochemischen Tests (Ferenci P et al., 2005).

Klinisch findet man bei 67% der Wilson-Patienten einen Kayser-Fleischer-Korneal-Ring. Er wird bei Patienten mit neurologischen Symptomen öfters gesehen als bei solchen mit ausschließlich hepatischer Manifestation (85,5% v. 52,1%).

Verminderte Serumcoeruloplasminspiegel (<200mg/l) werden bei 85,5% der Patienten bei Diagnosestellung festgestellt. Serumcoeruloplasminspiegel <50mg/l werden bei 29,5% der Patienten gefunden (Merle U et al., 2007). Ein Wert unter

50mg/l ist ein recht deutlicher Hinweis auf das Vorliegen eines Morbus Wilson. Träger haben meist Werte zwischen 100 und 200mg/l. Deshalb dient ein niedriger Coeruloplasminspiegel lediglich zur Bekräftigung eines Verdachts auf einen Morbus Wilson (Brewer GJ, 2006).

Bei 86,6% der Patienten ist das nicht Coeruloplasmin gebundene Kupfer im Serum erhöht (Merle U et al., 2007).

Die 24-Stunden-Kupferausscheidung im Urin ist bei 87,1% der Patienten erhöht (Merle U et al., 2007). Während die normale 24-Stunden-Kupferausscheidung 20-50µg beträgt, scheidet ein symptomatischer Wilson-Patient über 100µg aus. Falsch hohe Werte können bei Gallenwegsobstruktionen entstehen. Präsymptomatische Patienten haben in 25% der Fälle eine nur leicht erhöhte 24-Stunden-Kupferausscheidung von 65-100µg, was dann nicht als Beweis für die Krankheit genutzt werden kann, da auch Träger erhöhte Werte bis zu 85µg haben. Die Mutationsanalyse der ATP7B-Gens bringt das Problem mit sich, dass es eine Vielzahl verschiedener Mutationen gibt, die einen Morbus Wilson hervorrufen können (Brewer GJ, 2006). So werden bei 15% der Wilson-Patienten keine Mutationen gefunden (Merle U et al., 2007). Die Mutationsanalyse ist der Diagnosestellung eines Morbus Wilson derzeit folglich nicht dienlich (Brewer GJ, 2006).

Durch eine Leberbiopsie kann nicht nur der bereits erwähnte erhöhte hepatische Kupfergehalt nachgewiesen werden, sondern es zeigen sich auch früh morphologische Eigenschaften wie eine Steatose, glykogenierte Nuclei in den periportalen Hepatozyten und fokale Leberzellnekrosen. Im Verlauf können sich dann Fibrose und Zirrhose entwickeln (Cope-Yokoyama S et al., 2010).

Im Schädel-MRT zeigen sich bei einigen Patienten Schädigungen vor allem im Bereich der Basalganglien und des infratentoriellen Hirnparenchyms mit randständig betonten T2-Erhöhungen im Putamen, Pallidum, Kaudatuskopf und entlang der Pyramidenbahn (Hahn U et al., 2008).

1.4.2 Fibrosediagnostik

1.4.2.1 Invasive Fibrosediagnostik

Als Goldstandard zur Diagnostik der Leberzirrhose gilt die Leberpunktion. Kombiniert man Leberhistologie mit der makroskopischen Leberbeurteilung mittels Laparoskopie können Sensitivität und Spezifität weiter gesteigert werden. Es treten Inkongruenzen dadurch auf, dass ein vermeintlich kontinuierlicher Prozess, wie die Leberfibrose, in ein ordinalskaliertes Punktesystem überführt wird. Hinzu kommt, dass auch bei der Gewinnung des Leberstanzzyllinders Fehler auftreten können, da der fibrotische Umbau der Leber häufig nicht homogen verläuft (Lörke J et al., 2007). Die Leberbiopsie repräsentiert nur ca. 1/50000 des Lebervolumens (Cosgrove D et al., 2013).

Die Leberbiopsie hat mit dem Risiko von unerwünschten Zwischenfällen, dem „*sampling error*“ und der Variabilität innerhalb eines Pathologen und zwischen verschiedenen Pathologen drei Hauptlimitationen. Eine Übersichtsarbeit fasste die Risiken der Leberbiopsie zusammen als Schmerz (ca. 30%), ernsthafte Zwischenfälle (3 von 1000) und Tod (3 von 10000). Was den „*sampling error*“ angeht, konnte man in einer Studie, die Patienten mit Hepatitis C einschloss, und in der nur Biopsien von guter Qualität Berücksichtigung fanden, einen Unterschied zwischen rechtem und linkem Leberlappen von zumindest einem Stadium feststellen (Poynard T et al., 2004). Zur Variabilität innerhalb eines Pathologen und zwischen verschiedenen Pathologen lässt sich sagen, dass selbst bei erfahrenen Pathologen die Variabilität der Beurteilung bei bis zu 20% liegt (Lörke J et al., 2007).

Um die Fibrose mit semiquantitativen Scores genau beurteilen zu können, ist eine Biopsielänge von zumindest 25 mm notwendig (Bedossa P et al., 2003). Problem ist jedoch, dass selbst in erfahrenen Zentren die Biopsielänge nur in 14% mehr als 25 mm beträgt und in nur 31% die von Regev et al. empfohlenen Qualitätskriterien erreicht wurden (Poynard T et al., 2004).

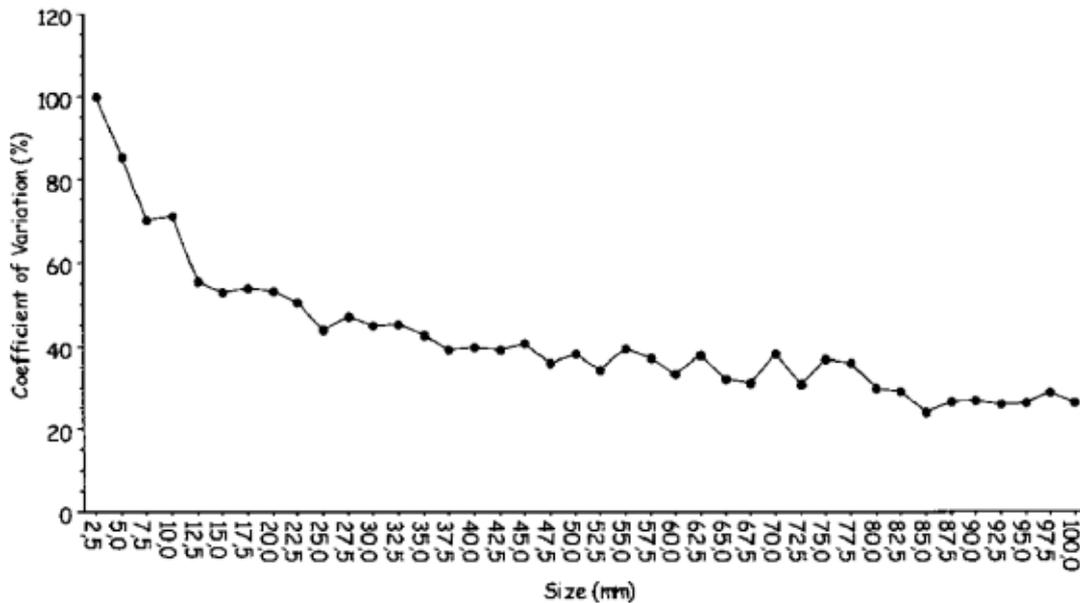


Abb. 1: Koeffizient der Variation von Fibrosemessungen mit Bildanalyse entsprechend der Länge der Biopsieproben (Nachgedruckt aus Hepatology 2003, 38: 1449-1457, Bedossa P, Dargère D, Paradis V, „Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C“, mit Genehmigung von John Wiley and Sons)

1.4.2.2 Nicht-invasive Fibrosediagnostik

Um den fibrotischen Umbau der Leber nicht-invasiv einschätzen zu können, suchte man nach serologischen Fibrosemarkern. Der bekannteste unter den serologischen Fibrosetests ist der Fibrotest. Er beruht auf einem Algorithmus unter Einbeziehung verschiedener Serumparameter:

Fibrotest:

$$f = 4,467 \times \text{Log} [\alpha 2\text{-Makroglobulin (g/l)}] - 1,357 \times \text{Log} [\text{Haptoglobin (g/l)}] + 1,017 \times \text{Log} [\text{GGT (IU/l)}] + 0,0281 \times [\text{Alter (Jahre)}] + 1,737 \times \text{Log} [\text{Bilirubin } (\mu\text{mol/l)}] - 1,184 \times [\text{Apolipoprotein A1 (g/l)}] + 0,301 \times \text{Geschlecht (weiblich= 0, männlich= 1)} - 5,540$$

Beurteilung:

Fortgeschrittene Fibrose (F2, F3, F4 nach Metavir): Score 0,60 bis 1,00

Ausschluss einer fortgeschrittenen Fibrose: Score 0 bis 0,10 (Lörke J et al., 2007).

Ein weiterer Fibrosescore ist der APRI-Index:

APRI-Index:

Der APRI-Index wird anhand des GOT-Wertes und der Thrombozytenzahl berechnet. Er ist allerdings nur für Patienten mit Virushepatitis evaluiert.

Verhältnis von gemessener GOT [U/l] zu Referenzwert [U/l] geteilt durch Thrombozyten [$10^9/l$] x 100

Beurteilung:

Fortgeschrittene Fibrose (Ishak > 3): Score > 1,5

Ausschluss einer fortgeschrittenen Fibrose (Ishak < 3): Score < 0,5 (Lörke J et al., 2007).

Andere Fibrosescores sind der Pohl-Score (Pohl A et al., 2001) und Forns-Index (Forns X et al., 2002).

Ein Problem der nicht invasiven Marker und Scores ist, dass sie an dem Ergebnis der Leberpunktion evaluiert werden, also einem relativ variablen und störanfälligen Goldstandard. Als Einzelwert wird häufig die Thrombozytenzahl als grober Anhaltspunkt für das Leberfibrosestadium herangezogen, denn bei fortgeschrittenem Leberparenchymschaden oder Zirrhose fallen die Thrombozytenzahlen häufig ab. Mit 0,46 bis 0,50 sind die Korrelationskoeffizienten zum histologisch bestimmten Fibrosegrad eher mäßig.

Auch das Prokollagen-III-Peptid hat einen gewissen Wert in der Routinediagnostik. Weitere Einzelwerte in der Bestimmung des Leberfibrosestadiums sind Kollagen Typ IV, Hyaluronsäure, Thrombopoetin, TGF β 1 und Laminin (Lörke J et al., 2007).

Für die nicht-invasive Zirrhosedagnostik hat sich der Ultraschall gut etabliert. Durch zusätzlichen Einsatz des Dopplers können Spezifität und Sensitivität des Ultraschalls erhöht werden. Kontrastverstärkter Ultraschall kann ebenso für die genaue Detektion einer Zirrhose verwendet werden. Insgesamt hat der Ultraschall eine moderate Sensitivität und eine moderat-hohe Spezifität, welche aber durch zusätzliche Technologien erhöht werden können.

Im Computertomogramm kann das gesamte Abdomen dargestellt werden und kleinste Varizen in verschiedenen typischen Lokalisationen können leicht identifiziert werden, wodurch eine Sensitivität von 77,1% bei einer Spezifität von 67,6% erreicht wird.

Durch diffusionsgewichtete MRT und kontrastverstärktes MRT kann eine Fibrose quantifiziert werden. Das diffusionsgewichtete MRT kann auch dazu verwendet werden das Stadium der Zirrhose mit einer Sensitivität von 89% und einer Spezifität von 80% zu identifizieren (Sharma S et al., 2014).

Die transiente Elastographie (Fibroscan®) ist ein neues, nicht-invasives Testverfahren zur Identifikation einer Leberzirrhose.

Bisher konnte das Vorliegen einer Leberzirrhose, wie oben beschrieben, nicht-invasiv z.B. mittels Ultraschall in 82-88% der Fälle richtig beurteilt werden, wobei die Wertigkeit des Ultraschalls durch den Untersucher, die Güte des Gerätes und das Vorliegen einer portalen Hypertension beeinflusst wird. Die transiente Elastographie (Fibroscan®) ermöglicht nun die Erfassung einer Leberfibrose durch Bestimmung der Steifigkeit des Gewebes (Erhardt et al., 2006). Im Folgenden wird die diagnostische Wertigkeit der eben beschriebenen nicht-invasiven Verfahren zur Leberfibrosebestimmung tabellarisch dargestellt.

Nicht invasive Verfahren zur Leberfibrosebestimmung	AUROC-Werte zur Erkennung einer Zirrhose	Sensitivität zur Erkennung einer Zirrhose	Spezifität zur Erkennung einer Zirrhose
Thrombozyten	0,89	77%	88%
APRI-Score	0,90-0,94	38-57%	87-93%
Fibrotest	0,87	50%	93%
Forns-Index	keine Angaben	30%	95%
Pohl-Score	keine Angaben	18-41%	98-99%
Transiente Elastographie	0,91-0,97	77-100%	82-97%

Tabelle 1: Gegenüberstellung der diagnostischen Wertigkeit nicht invasiver Verfahren zur Leberfibrosebestimmung (Nachgedruckt mit Genehmigung des Deutschen Ärzteverlages, aus „Nicht invasive Diagnostik der Leberzirrhose“, Lörke J, Erhardt A, Vogt C, Häussinger D, Deutsches Ärzteblatt 2007, 24: 1752-1757)

Das Messgerät besteht bei der transienten Elastographie aus einer Messsonde, die einen niederfrequenten Vibrationssender sowie eine 5-MHz-Ultraschallsonde enthält, und einer EDV-gestützten Kontrolleinheit. Die gemessene Steifigkeit korreliert mit dem Fibroestadium, wobei die Lebersteifigkeit mit zunehmendem Fibroestadium steigt. Die quantitative Einheit der Steifigkeit ist kPa, wobei Werte bis 75 kPa möglich sind. Eine einzelne Messung dauert nicht länger als 15 Sekunden. Als Endergebnis wird der Median aus zehn Untersuchungen angegeben, so dass Ausreißer nach oben und unten kaum Berücksichtigung finden.

Vorteile der transienten Elastographie sind die ambulante Durchführbarkeit, die fehlende Invasivität und die Schmerzfreiheit. Die Fibroscan®-Untersuchung ist durch ein fehlendes Risiko für den Patienten beliebig oft wiederholbar.

In ersten größeren Studien werden für die Diagnose Leberzirrhose Sensitivitäten von 77 bis 87% und Spezifitäten von 91 bis 97% bei Schwellenwerten zwischen 12,5 und 14,4 kPa beschrieben.

Die transiente Elastographie eignet sich nicht nur für Patienten mit Virushepatitis. Bei einem Schwellenwert von 13 kPa für eine Leberzirrhose ergab sich bei 380 Patienten mit chronischem Alkoholabusus ein positiver prädiktiver Wert von 97%. Bei 150 Patienten mit primär biliärer Zirrhose wurde für eine fortgeschrittene Fibrose ein AUROC-Wert von 0,93 beschrieben. Unter dem AUROC-Wert versteht man die „*area under the receiver operator curve*“ (AUROC=graphische Gegenüberstellung von Sensitivität und Spezifität). Je größer die Fläche unter der Kurve, desto besser ist der diagnostische Test. Einem optimalen Testverfahren mit einer Sensitivität und Spezifität von 100 % entspricht die Fläche 1,0. Mit einem Wert von 0,97 war der AUROC auch bei HIV-/HCV-koinfizierten Patienten hoch. Hier wurden Untersuchungen an 72 Patienten durchgeführt (Lörke J et al., 2007). Folgende Tabelle zeigt die Wertigkeit der transienten Elastographie für die Diagnose einer Leberzirrhose bei Patienten mit unterschiedlichen Krankheitsbildern.

Autor	Anzahl der Patienten	Erkrankung	Grenzwert für F=4	Ergebnisse
Ziol et al.	327	HCV	14,6 kPa	Sensitivität 0,86 Spezifität 0,96
Foucher et al.	354	Versch. Ätiologien	17,6 kPa	Sensitivität 77% Spezifität 97%
Castera et al.	183	HCV	12,5 kPa	Sensitivität 87% Spezifität 91%
Melin et al.	380	Alkoholabusus	13 kPa	PPV: 97%

Pares et al.	150	PBC	14,45 kPa	AUROC für F>3: 0,93
De Ledinghen et al.	72	HIV-HCV-Koinfektionen	11,8 kPa	AUROC für F=4: 0,97
Corpechot et al.	101	PBC, PSC	17,3 kPa	AUROC für F=4: 0,96
Erhardt et al.	147	Versch. Ätiologien	13 kPa	Sensitivität 90% Spezifität 82% PPV: 71% NPV: 95% AUROC: 0,92
Carrion et al.	124	HCV	12,5 kPa	Sensitivität 100% Spezifität 87% PPV: 50% NPV: 100% AUROC: 0,98
Gomez-Dominguez et al.	103	Versch. Ätiologien	16 kPa	Sensitivität 89% Spezifität 96% PPV: 80% NPV: 98%

Tabelle 2: Wertigkeit der transienten Elastographie für die Diagnose einer Leberzirrhose – Literaturüberblick zu Untersuchungen mit Leberbiopsie als Referenz (Nachgedruckt mit Genehmigung des Deutschen Ärzteverbandes, aus „Nicht-invasive Diagnostik der Leberzirrhose“, Lörke J, Erhardt A, Vogt C, Häussinger D, Deutsches Ärzteblatt 2007, 24: 1752-1757)

Durch Kombination einzelner Methoden lässt sich vermutlich die Sensitivität und Spezifität nicht-invasiver Verfahren der Leberfibrosebestimmung verbessern. Bei Leberzirrhosepatienten stimmte die ausschließliche Anwendung des Fibrosetests in 80% der Fälle mit dem histologischen Befund überein, bei alleiniger Anwendung der transienten Elastographie waren es 90%. Wurden beide Methoden miteinander kombiniert, so konnte die Übereinstimmung mit dem histologischen Ergebnis auf 94% gesteigert werden. Folglich kann also unter Hinzunahme weiterer nicht-

invasiver Parameter und einer Verfeinerung mathematischer Methoden die nicht-invasive Diagnostik der Leberzirrhose verlässlich möglich sein und eine Leberpunktion mit all ihren Risiken eventuell entbehrlich werden (Lörke J et al., 2007).

1.5 Eisenstoffwechsel

Der Gesamteisengehalt des menschlichen Körpers beträgt 3-4 g. Jeder Erwachsene verliert täglich 1-2 mg Eisen, welches alimentär zugeführt werden muss. Das meiste Eisen im Körper befindet sich im Hämoglobin der Erythrozyten, welche über 1 mg Eisen pro ml Erythrozyten, bzw. 2-3 g des Gesamteisens, enthalten. Im Gegensatz dazu enthält Blutplasma lediglich 2-3 mg Eisen, welches an Transferrin gebunden ist. Die Lebensdauer der Erythrozyten beträgt 120 Tage. Jeden Tag wird 1/120 der Erythrozyten von Makrophagen abgebaut und deren Eisen wird wieder dem Plasmatransferrin zugeführt. Durch das Recycling der Erythrozyten werden jeden Tag 20-25 mg Eisen zurückgewonnen. Das meiste Eisen aus Transferrin ist für die Erythrozytenproduktion im Knochenmark vorgesehen. Eisen geht verloren über die Desquamation von Epithelzellen des Darms und der Haut, Mikroblutungen und bei Frauen über die Menstruationsblutung (Ganz T und Nemeth E, 2012).

Die Eisenaufnahme aus der Nahrung erfolgt aus dem Darm, wobei die duodenale Cytochrom B-Reduktase (DcytB) zunächst Fe^{3+} zu Fe^{2+} reduziert. Anschließend wird Fe^{2+} über den Transporter DMT1 (Nramp2) in den Enterozyten befördert (Ganz T, 2003). Auch Häm, welches in Fleisch vorkommt, ist neben Nicht-Hämeisen, welches sich in Gemüse und Getreide findet, eine wichtige Eisenquelle. Hämeisen wird durch das Membranprotein HCP 1 (*Heme carrier protein 1*) in den Enterozyten aufgenommen (Shayeghi M, 2005). Das Eisen wird innerhalb der Zelle aus der Hämgruppe gelöst und dann wie die resorbierten zweiwertigen Eisenionen weitertransportiert (Böhm M et al., 2011). Im Enterozyten kann Eisen entweder in Ferritin gespeichert werden oder zur basolateralen Membran wandern, wo es durch Ferroportin (Ireg1) aus dem Enterozyten heraus transportiert wird. Anschließend wird Fe^{2+} durch Hephaestin reoxidiert zu Fe^{3+} und dann von Transferrin aufgenommen, welches das Eisen an die Gewebe verteilt (Ganz T und Ne-

meth E, 2012). In Mäusen mit homozygoten Mutationen der Ferroportin-Gene konnte gezeigt werden, dass nur ein sehr geringer oder kein Eisentransfer von Enterozyten ins Plasma stattfindet trotz massiver Eisenakkumulation im Enterozyten (Ganz T, 2007).

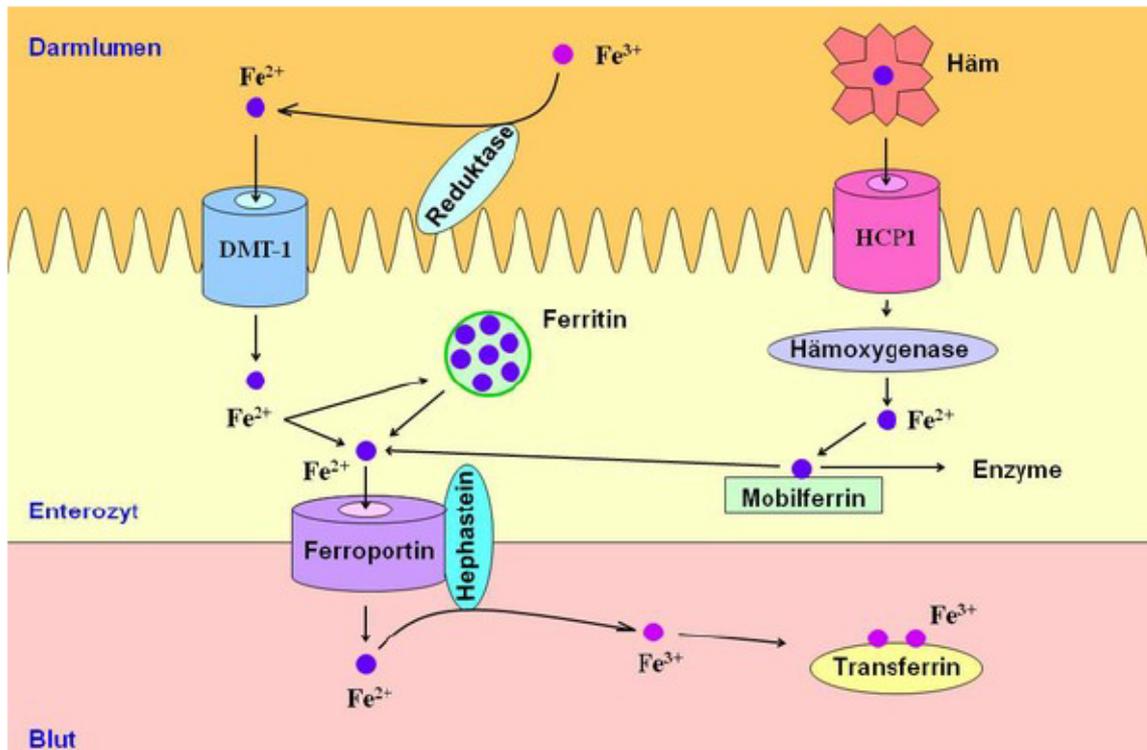


Abb. 2: **Eisenresorption** (Nachgedruckt mit Genehmigung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V., aus der DGHO-Leitlinie „Eisenmangel und Eisenmangelanämie“, Hastka J, Heimpel H, Metzgeroth G, <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/eisenmangel-und-eisenmangelanaemie/@@view/html/index.html#ID0EIH>)

Der Hauptteil des Speichereisens befindet sich intrazellulär gebunden an Ferritin in den Makrophagen des retikuloendothelialen Systems von Leber (ca. 60%) und Milz (ca. 40%) (Böhm M et al., 2011). Das Eisen in Hepatozyten und Makrophagen wird in zytoplasmatischem Ferritin gespeichert und in Zeiten von erhöhtem Eisenbedarf mobilisiert (Ganz T und Nemeth E, 2012). Makrophagen phagozytieren die Erythrozyten. In den Makrophagen wird Eisen aus Häm durch die Aktivität der Häm-Oxygenase zurückgewonnen (Ganz T, 2007). Eisen verlässt die Makrophagen wieder über Ferroportin mit Hilfe der Ferrooxidase Coeruloplasmin. Patienten, die eine heterozygote Ferroportin-Mutation haben, entwickeln eine Form der Hämochromatose mit Eisenüberladung von Kupfferzellen und Milz-

makrophagen. (Ganz T, 2003). Die Patienten haben ein stark erhöhtes Serumferritin und oft eine normale oder sogar geringe Transferrinsättigung (Ganz T und Nemeth E, 2012). Bei Patienten, die einen Mangel an Coeruloplasmin haben, ist die Mobilisation von Eisen aus Makrophagen etwas beeinträchtigt, so dass hieraus eine milde Anämie und graduelle Eisenretention in Makrophagen resultiert.

Die Hepatozyten sind der Hauptort der Eisenspeicherung. Sie exprimieren eine relativ geringe Anzahl des Eisen-Exporters Ferroportin auf ihrer Oberfläche. Bei genetisch bedingter oder erworbener Eisenüberladung sind die Hepatozyten der Hauptort der Eisenablagerung, da deren Eisenaufnahme die Kapazität der Eisenausschleusung übersteigt (Ganz T, 2007).

1.5.1 Bedeutung des Hepsidins bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen

Hepsidin ist ein Peptidhormon aus 25 Aminosäuren, welches den Eiseneintritt ins Plasmakompartiment aus den drei Eisenhauptquellen inhibiert: diätetische Eisenabsorption im Duodenum, Abgabe von recyceltem Eisen aus Makrophagen und Abgabe von gespeichertem Eisen aus Hepatozyten (Ganz T und Nemeth E, 2012). Erniedrigtes Hepsidin führt zu Gewebe-Eisenüberladung, Hepsidin-Überproduktion führt zu Eisenmangel und Entzündungsanämie (Nemeth et al., 2004).

Die erste Verbindung zwischen Hepsidin und Eisenstoffwechsel kam in der Studie von Pigeon et al. auf, welche neue hochregulierte Gene während einer Eisenüberladung suchte. Hepsidin wurde durch eine Genexpressionsanalyse isoliert, welche bei Lebern von Carbonyleisen-überladenen und Kontroll-Mäusen durchgeführt wurde. Erhöhte Hepsidin mRNA-Level wurden in den Lebern der experimentell (Carbonyleisen) und spontan (β 2-Mikroglobulin Knockout-Mäusen) Eisenüberladenen Mäusen gefunden. Die Anzahl der mRNA war direkt assoziiert mit der Eisenkonzentration der Leber. Dies wird bewiesen durch die Dosisabhängigkeit der mRNA-Induktion in den Carbonyleisen-behandelten Mäusen und die reduzierte Hepsidin-Expression, wenn die β 2-Mikroglobulin Knockout-Mäuse einer eisenarmen Diät unterzogen wurden. Demzufolge erhöht sich die Hepsidin-

Expression bei Eisenüberladung und nimmt ab bei Eisendepletion (Leong WI und Lönnerdal B, 2004). Die Injektion von synthetischem Heparin führt bei Mäusen innerhalb von einer Stunde zu schwerem Eisenmangel (Ganz T, 2007).

Hepatozyten haben sich herausgestellt als die Hauptproduzenten des Eisen-Regulator-Proteins Heparin. Die Produktion von Heparin wird von Eisen reguliert, so dass mehr Heparin von den Hepatozyten produziert wird, wenn Eisen im Überfluss vorhanden ist, um so eine weitere Eisenabsorption und Freisetzung aus Speichern zu verhindern. Wenn ein Eisenmangel vorliegt, produzieren die Hepatozyten weniger oder kein Heparin mehr, was einen vermehrten Eintritt von Eisen ins Plasma zulässt. Sowohl Eisen in Plasma-Transferrin als auch Eisen, welches in Hepatozyten gespeichert ist, kann die Heparin-Synthese stimulieren.

Die Heparin-Synthese spielt eine zentrale Rolle in der Eisen-Homöostase. Intra- und extrazelluläre Eisenkonzentrationen erhöhen die Heparin-Transkription ebenso wie Inflammation, wohingegen eine erhöhte erythropoietische Aktivität die Heparin-Produktion supprimiert (Ganz T und Nemeth E, 2012).

Die Effekte der akuten Inflammation sind zum Teil IL-6-vermittelt durch die Induktion und Bindung von STAT-3 an den Heparin-Promotor.

Heparin wird, wie oben genannt, auch durch Anämie reguliert, wobei die Effekte der Anämie hauptsächlich durch einen unbekanntem Faktor, der während der Erythropoese produziert wird, vermittelt wird. Dementsprechend ist Heparin supprimiert in Mäusen, die durch Phlebotomie oder Hämolyse anämisch gemacht wurden, aber diese Suppression wird rückgängig gemacht, wenn die reaktive Erythropoese durch zytotoxische Agentien, Strahlung oder Erythropoetin-neutralisierende Antikörper verhindert wird. Der Heparin-suppressive Effekt von Erythropoetin wird also inhibiert von zytotoxischen Agentien ist somit von der erythropoietischen Aktivität abhängig (Ganz T, 2007).

Heparin reguliert die Plasma-Eisenkonzentration durch die Kontrolle der Ferroportin-Konzentrationen auf Eisen-exportierenden Zellen, wie duodenalen Enterozyten, recycelnden Makrophagen der Milz und Leber und Hepatozyten (Ganz T

und Nemeth E, 2012). In Zellen, die Ferroportin exprimieren, hat Hepcidin einen konzentrationsabhängigen inhibitorischen Effekt auf den Eisenexport. Ferroportin ist ein Hepcidin-regulierter Eisenabfluss-Kanal und der Hepcidin-Rezeptor (Ganz T, 2007).

Der Effekt von Hepcidin auf Ferroportin wird durch die folgende Abbildung veranschaulicht:

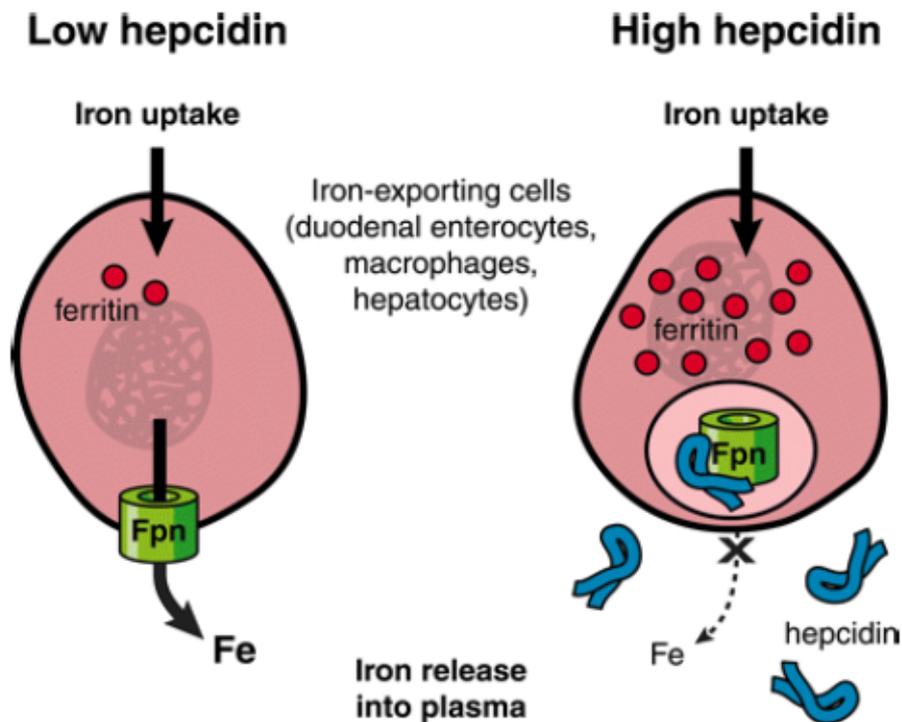


Abb. 3: **Hepcidin reguliert Ferroportin** (Neu veröffentlicht mit der Genehmigung der American Society of Nephrology, aus „Molecular control of iron transport“, Ganz T, J Am Soc Nephrol 2007, 18: 394-400; Genehmigung übertragen durch Copyright Clearance Center, Inc.)

Bereits oben wurde beschrieben, dass die Injektion von Hepcidin in Mäuse einen schweren Eisenmangel innerhalb von einer Stunde verursacht. Erst nach 48 Stunden normalisiert sich das Serumeisen passend zur Re-Synthese von Ferroportin, welches in Lysosomen unter dem Einfluss von Hepcidin abgebaut wurde (Ganz T, 2007).

Die zentrale Rolle des Hepcidins im Eisenstoffwechsel soll durch die nachfolgende Darstellung veranschaulicht werden:

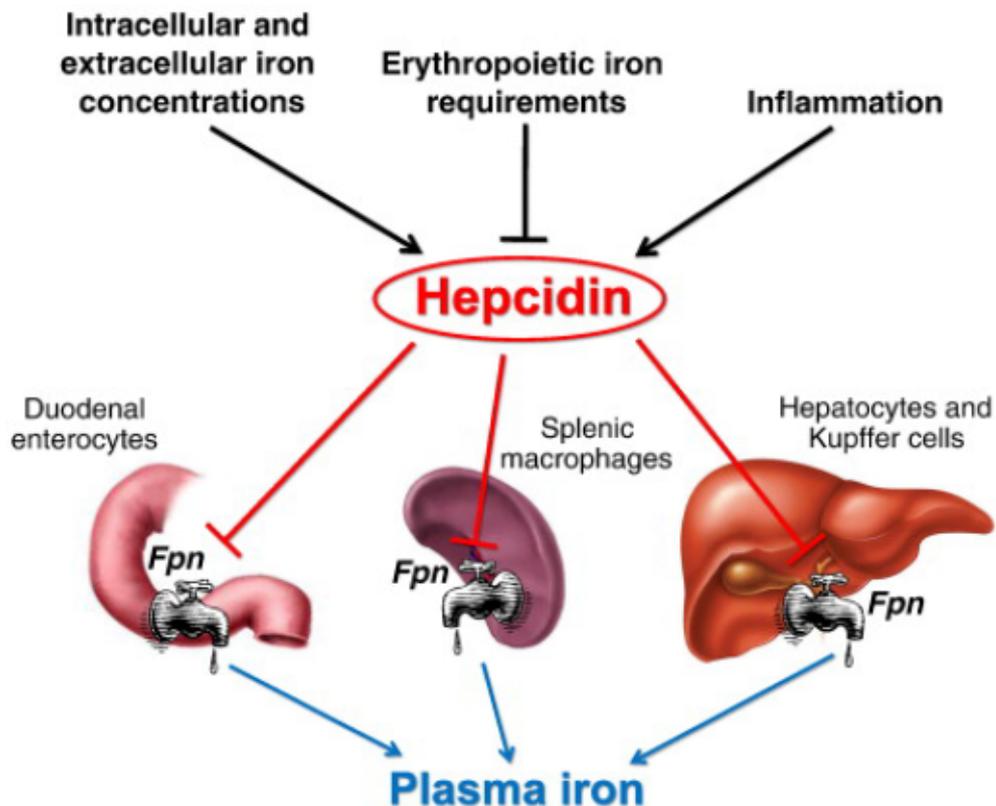


Abb. 4: **Hepcidin und Eisenhomöostase** (Nachgedruckt aus *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research* 2012, 1823: 1434-1443, Ganz T, Nemeth E, „Hepcidin and iron homeostasis“, mit Genehmigung von Elsevier)

Außer in Hepatozyten, welche die Hauptproduzenten des Hepcidins sind, wird Hepcidin-mRNA auch noch von Makrophagen und Adipozyten exprimiert, jedoch auf einem deutlich niedrigeren Level. Die Bedeutung der extrahepatischen Hepcidin-Produktion ist noch nicht geklärt (Ganz T und Nemeth E, 2012).

Wie bereits erwähnt, wird Hepcidin auch induziert durch Infektionen und Inflammation. Shike et al. zeigten, dass eine Infektion mit dem für Fische pathogenen *Streptococcus iniae* die Hepcidin-mRNA-Expression in Lebern von Weißbarschen um das 4500-Fache ansteigen ließ. Nicolas et al. zeigten, dass die Injektion von Terpentin, einem Standard-Inflammationsstimulus, in Mäuse die Hepcidin-mRNA 4-fach ansteigen ließ und zu einem 2-fachen Abfall des Serumeisens führte (Ganz T, 2003). Auch Weissenstein et al. berichteten, dass Terpentin-Injektionen bei Mäusen zu Anämie, einer reduzierten Erythrozytenmasse, reduziertem Hämoglobin und Serumeisen führen, was von erhöhter Leber-Hepcidin-Expression beglei-

tet wird. Dieser Eisen-erniedrigende Effekt von Terpentin wurde stark abgeschwächt bei Hepsidin-defizienten Mäusen. Hepsidin fungiert als positives Akute-Phase-Peptid und spielt eine entscheidende Rolle in der Dysregulation der Eisenhomöostase bei Inflammation. Inflammation und Infektion sind assoziiert mit chronischer Entzündungsanämie, welche charakterisiert ist durch verkürzte Überlebenszeit der Erythrozyten, Verminderung des Eisenabflusses aus Makrophagen und Enterozyten und geringem Ansprechen von erythropoietischen Vorläuferzellen auf Erythropoetin (Leong WI und Lönnerdal B, 2004). Nemeth et al. untersuchten Urin-Hepsidin-Peptide bei Patienten mit Entzündungsanämie aufgrund einer chronischen Infektion oder ernsten entzündlichen Erkrankung und beobachteten eine 100-fach erhöhte Hepsidin-Ausscheidung. Kleinere Anstiege wurden beobachtet bei Patienten, die weniger schwere entzündliche Erkrankungen hatten. Urin-Hepsidin war auch 100-fach erhöht bei Patienten mit Sichelzellanämie oder Myelodysplasie. Die Hepsidin-Ausscheidung korrelierte mit dem Serumferritin, welches auch bei Inflammation erhöht ist. Studien haben gezeigt, dass Hepsidin-mRNA durch Liposaccharide und Monokine aus Monozyten, die Lipopolysacchariden ausgesetzt sind, induziert wird. Unter diesen Zytokinen induzierte Interleukin-6 (IL-6), aber nicht IL-1 α oder Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α), die Hepsidin-mRNA. Infektionen, speziell Pathogen-spezifische Makromoleküle, wie Lipopolysaccharide, bewirken auf Makrophagen, einschließlich hepatischen Kupfferzellen, wahrscheinlich, dass die Produktion von IL-6 induziert wird, und das Zytokin wiederum induziert die Produktion von Hepsidin-mRNA in den Hepatozyten (Ganz T, 2003).

Anämie und Hypoxie beeinflussen auch den Eisenstoffwechsel. Mäuse mit Anämie, die durch Mutationen hervorgerufen wurde, die die Aufnahme von Eisen im Dünndarm verhindern, zeigten deutlich reduzierte hepatische Hepsidin-mRNA (Ganz T, 2003).

Früher wurde die Anämie bei chronischer Niereninsuffizienz alleine auf die reduzierte Erythropoetinproduktion zurückgeführt. Inzwischen hat sich aber gezeigt, dass die Erythropoetinlevel bei den meisten Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz sogar erhöht sind, dass diese Erhöhung aber nicht adäquat ist für die Schwere der Anämie. Viele Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz erhalten

hohe Dosen von Erythropoese-stimulierenden Faktoren, um eine akzeptable Hämoglobinkonzentration zu erhalten. Neuere Studien zeigen jetzt, dass Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz hohe zirkulierende Heparin-Level haben, welche zurückzuführen sind auf eine reduzierte renale *Clearance* von Peptiden und die Heparin-Induktion durch Entzündung, welche in Zusammenhang steht mit dem der zugrunde liegenden Erkrankung oder der Hämodialyse (Ganz T und Nemeth E, 2012).

Anämien werden auch beobachtet bei einigen Malignomen zum Zeitpunkt der Diagnose, nehmen im Krankheitsverlauf bedingt durch Chemo- und Strahlentherapie aber oft zu. Blutverlust, Malnutrition, Infiltration des erythropoietischen Knochenmarks durch den Tumor oder Zerstörung der erythropoietischen Vorläuferzellen durch Zytostatika können zusätzlich zur Anämie beitragen. Die Anämie einiger Tumoren, u.a. Morbus Hodgkin und multiples Myelom ähnelt sehr der chronischen Entzündungsanämie und wird begleitet von erhöhter Heparin-Produktion, welche von inflammatorischen Zytokinen stimuliert wird. Bei anderen Tumoren ist der Beitrag der Inflammation, erhöhtem Heparin und Eisenrestriktion zur Pathogenese der Anämie weniger gut charakterisiert und variiert abhängig vom Typ und von der Größe des Tumors und der inflammatorischen Antwort des Einzelnen auf den malignen Prozess (Ganz T und Nemeth E, 2012).

In einer Studie von Tan et al. konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer chronischen Lebererkrankung signifikant reduzierte Heparin-Level im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe haben. Die niedrigsten Heparin-Level fanden sich bei Patienten mit Leberzirrhose. Das Serum-Heparin korrelierte hierbei mit der hepatischen mRNA-Expression in 91 Biopsien, die für die genetische Analyse zur Verfügung standen. Heparin korrelierte ebenfalls positiv mit der Serum-Ferritinkonzentration, der Transferrinsättigung, ALT, Serumalbumin und Hämoglobin und negativ mit Bilirubin. Das Verhältnis von Heparin zu Ferritin war signifikant niedriger bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen im Vergleich zur Kontrollgruppe und nahm ab mit der Zunahme des Stadiums der Fibrose und der Siderose. Das Verhältnis von Heparin zu Ferritin war assoziiert mit der Progression der Fibrose (Tan et al., 2012).

1.5.2 HFE-Gen und Assoziation zum Eisenstoffwechsel und Interaktionen zwischen Eisen- und Kupferstoffwechsel

Die autosomal-rezessiv vererbten HFE-Genmutationen sind die genetische Ursache für Eisenüberladungen (Hämochromatose) beim Menschen. 85-90% der Patienten, die in Europa an Hämochromatose leiden, sind homozygot für die C282Y Mutation. Zu einer Eisenüberladung kann es auch bei der *Compound* Heterozygotie (C282Y/H63D) kommen. Eine moderate Eisenüberladung wird auch bei heterozygoten Trägern beobachtet, wobei die pathologische Bedeutung noch nicht geklärt ist (Halangk et al., 2005).

Die Hämochromatose ist eine Gruppe von primär genetischen Störungen im Eisenstoffwechsel mit Hyperabsorption von Eisen aus der Nahrung, was zu Eisenüberladung in Geweben, Eisen-vermittelten Schäden und Organdysfunktion führt. Eisen akkumuliert, weil kompensatorische Mechanismen, die die Eisenausscheidung als Reaktion auf eine Eisenüberladung signifikant erhöhen könnten, fehlen. Obwohl die Eisenabsorption im Duodenum stattfindet, haben Mausmodelle gezeigt, dass der Hauptgrund für die meisten Formen der Hämochromatose die insuffiziente Produktion von Hepcidin durch Hepatozyten ist. Daraus resultiert eine ineffektive Regulation der duodenalen Eisenabsorption und exzessive Eisenabgabe an das Plasma. Die Schwere der Hepcidindefizienz legt den Fortschritt der Eisenüberladung und die klinische Bedeutung fest. Es gibt zwei verschiedenen Arten der Hämochromatose: die juvenile und die adulte Form. Die juvenile Form wird verursacht durch Mutationen im Hepcidin-Gen oder im Hämajuvelin-Gen. Hierbei wird kein oder nur sehr wenig Hepcidin im Plasma gefunden. Klinische Probleme, wie Endokrinopathien und Kardiomyopathie entwickeln sich bereits in der Kindheit oder im frühen Erwachsenenalter. Bei der weniger schweren adulten Form reagiert die Hepcidin-Synthese partiell auf akute und besonders auf chronische Eisenüberladungen, wobei die Hepcidin-Konzentrationen inadäquat sind für die Eisenüberladung. Die adulte Form schließt eine seltene Form, die auf einer autosomal-rezessiven Mutation im Transferrinrezeptor 2 beruht, und die häufigste Form, die auf einer autosomal-rezessiven Mutation im HFE-Gen beruht, mit ein. Obwohl Aderlass eine effektive Behandlung darstellt, verschlimmert er gegeben-

enfalls die Hepcidindefizienz, was wiederum zu steigender Eisenabsorption und somit wieder zu häufigeren Aderlässen führt. Wenn in Zukunft die Hepcidindefizienz therapeutisch beeinflusst werden könnte, dann wäre dies eine weitere therapeutische Option für Patienten mit Hämochromatose (Ganz T und Nemeth E, 2012).

Hepcidin ist über das Eisen Feedback-reguliert. Für das Feedback werden Moleküle benötigt, die als intra- und extrazelluläre Eisensensoren fungieren und dann an einen oder mehrere Signalübertragungswege gekoppelt sind, die die Hepcidinsynthese oder -sekretion durch Hepatozyten regulieren. Es gibt Hinweise, dass zwei Transferrinrezeptoren, TfR1 und TfR2, zusammen mit dem Membranprotein HFE, welches mit beiden Rezeptoren interagiert, als Holotransferrinsensoren dienen. HFE ist strukturell verwandt mit MHC-Klasse-I-Molekülen. Seine Bindung an TfR1 wird konkurrierend von Holotransferrin inhibiert. Mit ansteigenden Konzentrationen von Holotransferrin wird HFE vom TfR1 verdrängt, da die Bindungsstellen von HFE sich mit denen von Holotransferrin überlappen. Freies HFE interagiert mit TfR2, welches wiederum von Holotransferrin stabilisiert wird. Der FeTf/HFE/TfR2-Komplex stimuliert wiederum die Hepcidin-Expression durch einen nicht ganz verstandenen Übertragungsweg (Ganz T und Nemeth E, 2012). HFE-*Knockout*-Mäuse zeigen eine abnorme Eisenhomöostase, welche der von Patienten mit hereditärer Hämochromatose ähnelt (Leong WI und Lönnerdal B, 2004).

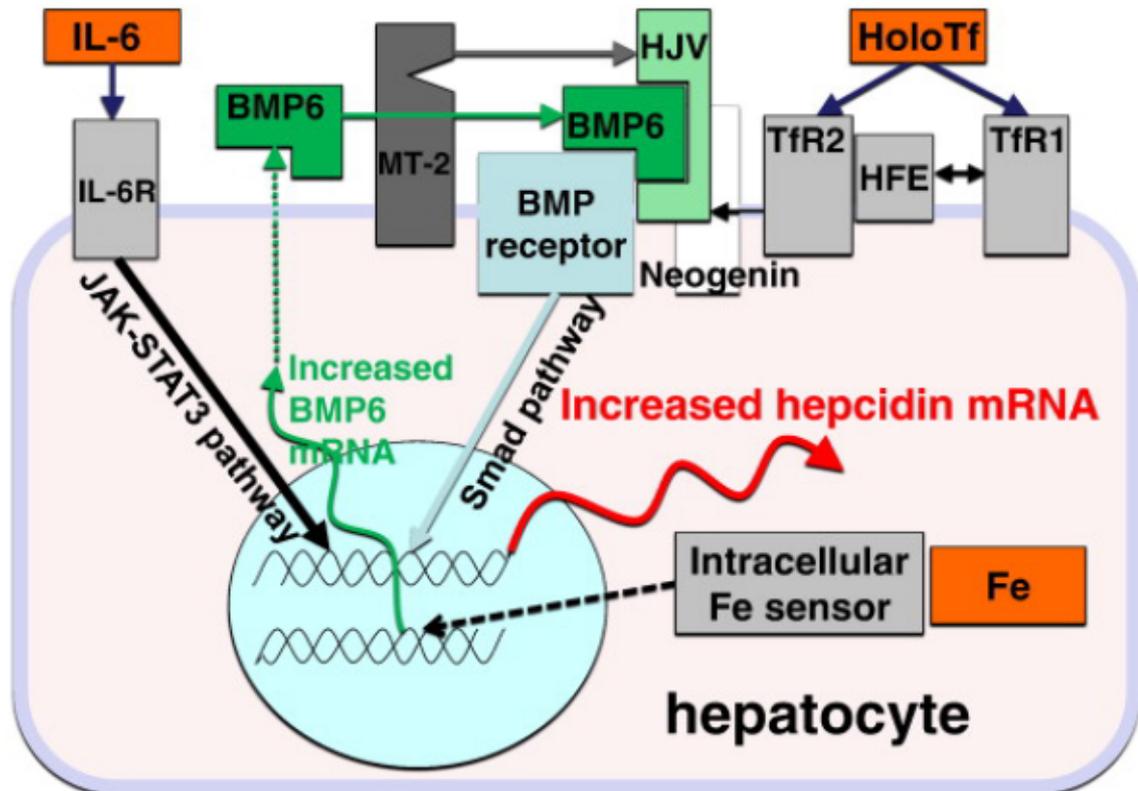


Abb. 5: Der **BMP-Pathway** (Nachgedruckt aus Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research 2012, 1823: 1434-1443, Ganz T, Nemeth E, „Hepcidin and iron homeostasis“, mit Genehmigung von Elsevier)

Der **BMP-Pathway** ist in der Leber für die Eisenregulation zuständig durch eine Kombination von Faktoren, welche den Membran-verankerten Corezeptor Hämajuvelin und bei Mäusen den Eisen-spezifischen Liganden BMP6 mit einschließt. BMP6 und Hämajuvelin sind essentiell für die Eisenhomöostase bei Mäusen und dämpfen die Hämocidin-Antwort auf akute Eisenüberladung und schwächen die Antwort auf chronische Eisenüberladung ab. Bei Menschen führen Hämajuvelin-Mutationen zu schwerer Hämocidin-Defizienz und haben sich so als der Hauptgrund für die Hämochromatose herausgestellt. Es muss geklärt werden, wie BMP-Rezeptoren und Hämajuvelin, welche beide Eisen nicht direkt wahrnehmen können, mit Eisen-wahnehmenden Molekülen interagieren. Zwei andere Membranproteine, der Rezeptor Neogenin und die Serin-Protease Metriptase-2 (MT-2, auch genannt Transmembranprotease Serin 6 oder TMPRSS6), beeinflussen die Hämocidin-Synthese ebenfalls, wahrscheinlich indem die Hämajuvelin-Konzentration auf der Zellmembran angepasst wird. Die MT-2-Konzentration auf Hepatozyten wird durch Eisenmangel direkt gesteigert und die korrespondierende

mRNA langsam induziert durch Eisenüberladung. Es ist noch nicht klar, wie viel diese offensichtlich gegensätzlichen Antworten zur Regulation der Heparidin-Konzentration beitragen. Zusammen mit der Stimulation der Heparidin-Synthese durch Holotransferrin können auch die Hepatozyten die Heparidin-Synthese steigern als Antwort auf gespeichertes intrazelluläres Eisen. Die relevanten intrazellulären Sensoren und Mechanismen sind nicht bekannt, aber Eisen-abhängige Ubiquitin-Ligasen und Prolyl-Hydroxylasen sind Kandidaten aufgrund ihrer Eisen-abhängigkeit und ihrer Assoziation zu Hypoxie-verbundenen regulatorischen Prozessen. Im Gegensatz dazu regulieren die Eisen-regulatorischen Proteine IRP1 und IRP2, welche in die posttranslationale Regulation von vielen Eisen- und Erythrozyten-verbundenen Proteinen mit einbezogen sind, Heparidin nicht direkt. Es wurde gezeigt, dass die nachgeordnete BMP6-mRNA in der Leber von Mäusen, die Eisenbeladung ausgesetzt ist, ansteigt, was suggeriert, dass die BMP6-Konzentrationen die intrazellulären Eisenspiegel der Hepatozyten widerspiegeln können. Dennoch wird ein Heparidin-Anstieg nach chronischer Eisenbeladung bei BMP6-defizienten Mäusen beobachtet, so dass noch andere Signalwege für die Heparidin-Stimulation existieren müssen (Ganz T und Nemeth E, 2012).

Es gibt zahlreiche Interaktionen zwischen dem Eisen- und Kupferstoffwechsel. Der erste Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen Eisen- und Kupferstoffwechsel ergab sich, als man in Schweinen durch Diät ein Kupferdefizit erzeugte und dies zu einer geringeren Aktivität der Multikupfer-Oxidase Coeruloplasmin und zu einer Eisenakkumulation im Gewebe und Anämie führte. Des Weiteren wurde beobachtet, dass Acoeruloplasminämie zu erhöhten Eisenvorräten im Körper führt. Coeruloplasmin, eine Kupfer-abhängige Ferroxidase, ist für die Eisenexkretion der Zellen, insbesondere des Gehirnes, der Leber und des Pankreas ins Plasma essen-tiell. Es konnte in MRT-Aufnahmen gezeigt werden, dass Patienten mit Morbus Wilson hohe Eisenkonzentrationen in den Basalganglien des Gehirns anreichern. Das Coeruloplasmin selbst ist bei Wilson-Patienten funktionell nicht betroffen, obwohl die niedrigen Coeruloplasminspiegel darauf hätten schließen lassen können. Dies lässt sich vermutlich dadurch erklären, dass Kupfer biliär vermindert ausgeschieden wird und dass die Coeruloplasmin-Genexpression geringer ist. Die lebenslange therapeutische Einnahme von Kupferchelatoren könnte außerdem zu

einer geringeren Aktivität der Kupfer-abhängigen Ferroxidase Coeruloplasmin führen.

Hephaestin ist eine weitere Kupfer-abhängige Ferroxidase, die sich an der basolateralen Seite der Enterozyten befindet und in Verbindung mit Ferroportin 1 die Ausschleusung von Eisen aus dem Enterozyten bewirkt. Mutationen von Hephaestin und Ferroportin 1 sind assoziiert mit Anämie und Eisenüberladung (Erhardt A et al., 2002). Wenn der Kupferspiegel niedrig ist, ist der Hephaestinspiegel korrespondierend ebenfalls niedrig. Da die Hephaestinaktivität und –menge wichtig für die Ferroportin-vermittelte basolaterale Eisenausscheidung aus intestinalen Enterozyten und anderen Zellen sind, reguliert Kupfer den Eisenabfluss auf zwei unterschiedlichen Leveln: Aktivität und Proteinstabilität (Kim BE et al., 2008).

Aufgrund all dieser Hinweise kann eine gleichzeitige Störung des Eisenstoffwechsels bei Patienten mit Morbus Wilson erwartet werden. Im Tiermodell für Morbus Wilson wurde über einen Anstieg des Eisens in der Leber und des Ferritins schon berichtet (Erhardt A et al., 2002).

Durch diese Arbeit soll nun herausgefunden werden, wie hoch die Prävalenz von HFE-Genmutationen bei Patienten mit Morbus Wilson ist und wie sich diese Genmutationen auf den Eisenstoffwechsel dieser Patienten auswirken.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Zum einen sollte durch die Arbeit die Zirrhoseprävalenz unter den Patienten mit Morbus Wilson ermittelt werden. Dies geschah einerseits durch Bestimmung der Lebersteifigkeit mittels transienter Elastographie (Fibroscan®) und andererseits durch Auswertung der histologischen Ergebnisse der Leberbiopsien, welche zum Teil vorab bei den Patienten durchgeführt worden waren.

Ein weiterer interessanter Punkt der Promotionsarbeit war es die Fibroseprogression durch wiederholte Fibroscan®-Messungen zu untersuchen.

Außerdem sollte ein Vergleich gezogen werden zwischen den Patienten mit und den Patienten ohne Leberzirrhose. Es wurde herausgestellt inwieweit sich Alter, Albumin, Quick, Bilirubin, Transaminasen, alkalische Phosphatase, Gamma-GT, Thrombozyten, BMI, Eisenparameter, Alpha-Fetoprotein, Coeruloplasmin, Kupfer im 24-Stunden-Urin und Gamma-Globuline unterscheiden bei Patienten mit und Patienten ohne Leberzirrhose, wobei die Zirrhose dabei entweder durch die transiente Elastographie oder histologisch ermittelt wurde.

Des Weiteren sollte die Prävalenz an HFE-Genmutationen bei Patienten mit Morbus Wilson ermittelt werden. In einer 2002 an der Universitätsklinik Düsseldorf durchgeführten Studie, die die Prävalenz und Signifikanz von Mutationen der Allele C282Y und H63D bei 40, nicht miteinander verwandten Patienten, untersuchte, ergab sich, dass sich die Frequenz der Mutationen in den Allelen C282Y (11,3% vs. 6,2%) und H63D (18,8% vs. 16,4%) zwischen Patienten mit Morbus Wilson und der Kontrollgruppe nicht signifikant unterschied (Erhardt A et al., 2002). Damals wurde angeregt ein größeres Patientenkollektiv zu untersuchen, um HFE-Genmutationen als Komorbiditätsfaktor bei Patienten mit Morbus Wilson auszuschließen. Durch die aktuelle Studie, die das Patientenkollektiv auf 73 erweiterte, sollte nun untersucht werden, ob eine Komorbidität zwischen Morbus Wilson und HFE-Genmutationen besteht.

In diesem Zusammenhang sollte auch der Eisenstoffwechsel der Wilson-Patienten untersucht werden. In der eben genannten Studie von 2002 zeigten sich bei den Wilson-Patienten erhöhte Ferritinspiegel. Damals wurde diskutiert, ob diese im Zusammenhang mit niedrigen Coeruloplasminspiegeln stehen können. Ziel der aktuellen Arbeit war es somit zu überprüfen, ob sich dieser Zusammenhang bei einem größeren Patientenkollektiv bestätigt.

2 PATIENTEN UND METHODEN

2.1 Patienten

Insgesamt wurden 76 Patienten, bei denen die Diagnose des Morbus Wilson durch die Standardkriterien gesichert ist, in die Studie mit einbezogen. Es wurden 56 Patienten einer Messung der Lebersteifigkeit mittels transientser Elastographie (Fibroscan®-Untersuchung) unterzogen. Bei 73 Wilson-Patienten wurde eine HFE-Genbestimmung vorgenommen, wobei bei allen 73 Patienten auf C282Y- und H63D-Mutationen, bei 51 Patienten zusätzlich auf S65C- und bei 49 Patienten zusätzlich auf E168X-Mutationen untersucht wurde. Des Weiteren wurden die Eisenparameter Ferritin, Transferrin, Transferrinsättigung (TFS) und die Leberparameter bestimmt.

Es liegt ein Ethikvotum mit der Nummer 2855 vom 20.12.2006 vor.

Die Patienten stellten sich von Dezember 2006 bis August 2008 in der Klinik für Neurologie zur Verlaufskontrolle vor. Zusätzlich wurden fünf Patienten in die Studie einbezogen, die in den Jahren bis 2012 in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie behandelt wurden.

Bei 15 Patienten lag eine Leberhistologie vor.

Die Altersstruktur der in die Studie eingeschlossenen Wilson-Patienten ist in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt:

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standard- abweichung	Varianz
Alter	76	19	68	38	12	138,2

Tabelle 3: Altersstruktur der in die Studie eingeschlossenen Wilson-Patienten

Demnach lag das Durchschnittsalter bei 38 Jahren. Unter den Patienten waren 28 männlich und 48 weiblich.

Durch die Therapie mit D-Penicillamin, Trientine oder Zink war die Krankheit bei allen außer einer Person gut kontrolliert.

Als Kontrollgruppe diente ein Kollektiv von 295 gesunden Personen (Erhardt A et al., 2002).

Bei den Patienten wurden Albumin, Quick, Bilirubin, Gamma-GT, die Transaminasen GPT und GOT, die alkalische Phosphatase AP, die Thrombozyten, Ferritin, die Transferrinsättigung TFS, das Alpha-Fetoprotein AFP, Coeruloplasmin, Kupfer im 24-Stunden-Urin Cu_{24h}, Gamma-Globulin und der *Body-Mass-Index* BMI bestimmt.

Der *Body-Mass-Index* BMI wurde gemäß folgender Formel berechnet:

$$\text{BMI} = \text{kg/m}^2$$

Es ergaben sich dabei folgende Mittelwerte und Standardabweichungen:

	Mittelwert	Standardabweichung	N
Albumin [g/dl]	4,2	0,4	57
Quick [%]	88	18,9	57
Bilirubin [mg/dl]	0,85	1,1	74
GPT [U/l]	40	51,8	72
GOT [U/l]	38	44,8	72
GGT [U/l]	45	46,2	72
AP [U/l]	97	42,4	72
Thrombozyten [x1000/ μ l]	183	61,8	58

Ferritin [$\mu\text{g/l}$]	161	192,3	73
TFS [%]	31	25,3	71
AFP [$\mu\text{g/l}$]	10,5	44,5	57
Coeruloplasmin [mg/dl]	11,8	6,8	75
Cu24h [mg/l]	0,18	0,2	61
Gamma-Globulin [g/dl]	1,4	0,3	58
BMI [kg/m^2]	23,5	3,4	54

Tabelle 4: Mittelwerte und Standardabweichungen einzelner Laborparameter und des BMI bei den Wilson-Patienten

2.2 Methoden

2.2.1 Fibroscan®

Bei der Messung der Lebersteifigkeit mittels transientser Elastographie (Fibroscan®) wird ein 1-dimensionalen Ultraschall-*Transducer* und –Empfänger verwendet, der in derselben Achse einen Vibrationssender enthält. Dieser Vibrationssender erzeugt eine niederfrequente elastische Welle. Die Sondenspitze wird auf die Haut zwischen den Rippen, die die Leber bedecken, aufgesetzt und ausgelöst (Cobbold JFL et al., 2007). Es wird ein kurzer Stoß eingesetzt, welcher wie ein Stempel auf die Hautoberfläche wirkt. Die stärkste Scherwelle entsteht am Rand des Stempels. Auf diese Weise kommt der scheibenartig geformte Stempel einer Ringquelle nahe. Ein Teil der Welle des Ringes fließt auf der Ultraschallachse zusammen und in etwas Entfernung verläuft er entlang der Achse mit einer Geschwindigkeit, die

nahe der Geschwindigkeit der Scherwellengeschwindigkeit liegt (Bamber J et al., 2013).

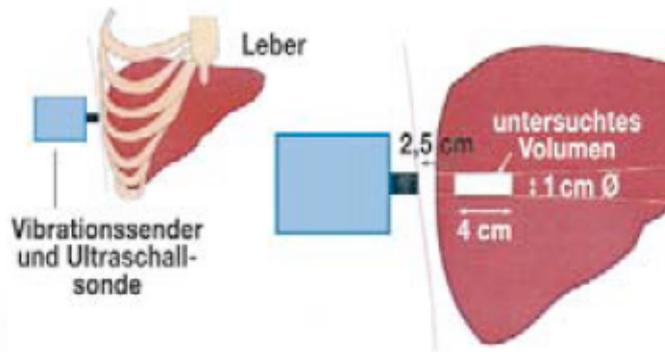


Abb. 6: Nicht invasive Diagnostik der Leberzirrhose (Nachgedruckt mit Genehmigung des Deutschen Ärzteverbandes, aus „Nicht invasive Diagnostik der Leberzirrhose“, Lörke J, Erhardt A, Vogt C, Häussinger D, Deutsches Ärzteblatt 2007, 24: 1752-1757)

Die elastische Welle von 50 Hertz breitet sich mit unterschiedlicher Geschwindigkeit im Lebergewebe aus. Mit Hilfe der hochfrequenten Ultraschallwelle von 1500 m/s ist es möglich die Ausbreitungsgeschwindigkeit der elastischen Welle zu bestimmen (Erhardt A et al., 2006). Die Elastizität der Leber wird abgeleitet von der Wellengeschwindigkeit, die sich an die *Young's Module E* annähert, entsprechend der Formel: $E=3\rho V_s^2$, wobei V_s die Schubgeschwindigkeit und ρ die Dichte ist. Die Deformation des Gewebes wird als eine Funktion von Zeit und Tiefe gezeichnet, so dass ein zweidimensionales „Elastogramm“ entsteht. Die Steigung der Elastogrammkurve zeigt die Ausbreitungsgeschwindigkeit und damit die Steife der Leber, ausgedrückt in kPa (Cobbold JFL et al., 2007). Das Verfahren ermöglicht eine regionale Messung der Elastizität innerhalb der Breite des Ultraschallstrahls und der Scherwelleneindringtiefe von einigen Zentimetern. Es handelt sich nicht um ein Ultraschallgerät und erlaubt somit nicht die Erstellung von konventionellen anatomischen Ultraschallbildern (Bamber J et al., 2013). Das Verfahren ist leicht zu erlernen, kann schnell von einer einzelnen Person durchgeführt werden und bietet eine objektive Messung der Lebersteifigkeit (Cobbold JFL et al., 2007).

2.2.1.1 Durchführung der Messung

Die transiente Elastographie (Fibroscan®) wurde in Rückenlage durchgeführt, wobei der Patient die rechte Hand hinter den Kopf legte. In der Regel wurde die Messsonde auf Höhe des *Processus Xiphoideus* im Bereich der rechten mittleren Axillarlinie senkrecht zur Körperoberfläche aufgesetzt und nur wenn es zu unzureichenden Messergebnissen kam, wurde die Position verändert. Bei den Patienten wurden jeweils zehn Messungen durchgeführt, wobei eine Erfolgsrate (Anzahl der gültigen Messungen durch die Anzahl der Messungen insgesamt) von mindestens 60% erzielt werden sollte (Erhardt A et al., 2006). Konnte nach 10 Messungen keine Erfolgsrate über 60% erzielt werden, wurde die Anzahl der Messungen gegebenenfalls erhöht, um so doch noch die erforderliche Erfolgsrate von mindestens 60% zu erzielen. Es wurden nur die Messungen verwertet, bei denen sich letztlich eine entsprechend hohe Erfolgsrate ergab.

2.2.2 Nachweis von HFE-Genmutationen

Getestet wurden zum einen die HFE-Allele C282Y und H63D, die häufig mit einer hereditären Hämochromatose assoziiert sind, und zum anderen die HFE-Allele S65C und E168X, bei denen wesentlich seltener eine Assoziation zur hereditären Hämochromatose besteht.

Zum Nachweis der HFE-Genmutationen wurde zuerst genomische DNA isoliert und anschließend eine PCR durchgeführt, mit der die für die C282Y- und H63D-Mutation relevanten Genabschnitte auf Chromosom 6 amplifiziert wurden. Die entsprechenden Genabschnitte konnten durch Restriktion mit *RsaI* oder *MboI* und Auftrennung der DNA-Fragmente mittels Elektrophorese detektiert werden (Erhardt A et al., 2003).

Der eben beschriebene Nachweis der HFE-Genmutationen wurde durch das Labor Limbach in Heidelberg vorgenommen.

2.2.3 Bestimmung der Eisenparameter

Eisen wurde durch die Ferrozinmethode (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) in einem automatisierten Analyser bestimmt und gegen das internationale Referenzpräparat WHO 80/578 kalibriert.

Die Bestimmung von Ferritin und Transferrin erfolgte durch eine immunnephelometrische Methode (N Latex Ferritin resp. N Antisera to Human Transferrin, Dade Behring, Marburg, Germany).

Die Bestimmung der Eisenparameter wurde im Labor der Universitätsklinik Düsseldorf vorgenommen.

Die Transferrinsättigung wurde nach folgender Formel berechnet oder direkt vom Labor mitgeteilt:

$$\text{Serumeisen} \times 70,9 / \text{Serumtransferrin (normal: 16-45\%)}$$

Die Normwerte für Ferritin lagen bei 20-280 µl/l für Männer und bei Frauen bei 10-140 µl/l für Frauen unter 45 Jahren und bei 25-250 µl/l bei Frauen über 45 Jahren (Erhardt A et al., 2002).

2.2.4 Histologie

Bei 15 Patienten lag ein histologischer Befund einer Leberbiopsie vor. Die Biopsien wurden in den Jahren zwischen 1974 und 2012 in verschiedenen Kliniken durchgeführt. Die histologische Wertung wurde von unabhängigen Pathologen vorgenommen. Da kein Staging erfolgt war, wurde das Fibrorestadium für die Promotionsarbeit in Anlehnung an Desmet und Scheuer (Desmet et al., 1994) klassifiziert.

2.3 Statistische Verfahren

Die Ergebnisse wurden mit dem Statistikprogramm SPSS 17.0 (SPSS GmbH Software, München, Deutschland) analysiert. Für die Analyse kontinuierlicher

Größen wurde die Student-t-Verteilung (*student's t-test*) oder der Wilxon-Mann-Whitney-Test verwendet, wobei der Wilxon-Mann-Whitney-Test im Gegensatz zum *student's t- test* keine Normalverteilung der Daten erfordert. Der Chi-Quadrat-Test wurde zum Vergleich von kategorialen Variablen eingesetzt. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen, ein p-Wert $< 0,01$ als stark signifikant und ein p-Wert $< 0,001$ als hoch signifikant.

Auch die Korrelationskoeffizienten wurden mit dem Statistikprogramm SPSS berechnet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Ergebnisse des Fibroscans®

Die nachfolgende Tabelle gibt wieder, welche Ergebnisse die Fibroscan®-Untersuchungen der Patienten mit Morbus Wilson erbrachten. Insgesamt wurden 56 Patienten mit Morbus Wilson der Fibroscan®-Untersuchung unterzogen. Die Einzelergebnisse wurden eingeteilt in Gruppen nach Fibrosestadium. Es wird jeweils angegeben, wie viele Patienten absolut und wie viele prozentual die angegebene Lebersteifigkeit in kPa aufwiesen. Dabei wurde als Orientierungshilfe zur Gruppeneinteilung nach Fibrosestadium die in einer Meta-Analyse aus dem Jahr 2008 herausgearbeitete Einteilung von Friedrich-Rust hinzugezogen.

Der Einteilung von Friedrich-Rust zufolge hatten zehn der 56 Patienten einen Fibroscan®-Wert in einem Bereich, der für eine Leberzirrhose spricht. Nach Friedrich-Rusts Einteilung wurde der *Cut-Off* für das Vorliegen einer Leberzirrhose bei 13,01 kPa gesetzt (Friedrich-Rust M et al., 2008). Demnach haben 17,9% der Patienten eine Leberzirrhose.

Der in der Meta-Analyse von Friedrich-Rust ermittelten Einteilung zufolge haben 21 Patienten, was einem Anteil von 37,5% entspricht, eine signifikante Fibrose, also eine Fibrose, die nach Metavir einen Score \geq F2, aber $<$ F4 ergeben würde. Der *Cut-Off* für das Vorliegen einer signifikanten Fibrose wurde dabei bei einem Fibroscan-Wert® von 7,7 kPa festgelegt. Eine Unterteilung der histologischen Stadien F2 und F3 wurde von Friedrich Rust nicht vorgenommen.

Alle Patienten, die einen Fibroscan-Wert® $<$ 7,7 kPa aufweisen, werden in der Meta-Analyse Friedrich-Rusts den histologischen Stadien F0 und F1 zugerechnet. Wie aus der nachfolgenden Tabelle ersichtlich wiesen 44,6% der Patienten einen Fibroscan®-Wert $<$ 7,7 kPa auf.

Insgesamt wurden Werte zwischen 3,30 und 75 kPa erreicht. Der Mittelwert der Ergebnisse der Messung der Lebersteifigkeit mittels transientser Elastographie lag bei 11,1 kPa bei einer Standardabweichung von 11,1.

Fibrosestadium	Steifigkeit der Leber in kPa	Häufigkeit absolut	Häufigkeit in %
F0/F1	< 7,7	25	44,6
F≥2/F3	≥ 7,7	21	37,5
F≥4	≥ 13,0	10	17,9
	Gesamt	56	100

Tabelle 5: Ergebnisse der Messungen der Lebersteifigkeit mittels transientser Elastographie

3.2 Ergebnisse des Fibroscans® bei den Folgeuntersuchungen

Bei 56 Patienten wurde eine Fibroscan®-Untersuchung durchgeführt. Bei 21 wurde eine zweite Fibroscan®-Untersuchung durchgeführt, wobei bei nur 20 dieser Patienten eine Erfolgsrate von über 60% bei den Messungen erzielt werden konnte. Somit finden nur diese 20 Patienten bei der zweiten Folgeuntersuchung Berücksichtigung. Bei 14 Patienten wurde eine dritte, bei fünf eine vierte und bei drei Patienten eine fünfte Untersuchung durchgeführt. Bei einem Patienten wurden eine sechste und eine siebte Untersuchung durchgeführt.

Im Folgemonat eins bis drei wurden zwei, im Folgemonat vier bis sechs wurden 13, im Folgemonat sieben bis neun wurden acht, im Folgemonat zehn bis zwölf wurden sieben, im Folgemonat 13 bis 15 wurden sieben und im Folgemonat 16 bis 18 wurden drei Folgeuntersuchungen durchgeführt. Hierbei finden nur die validen Messungen Berücksichtigung, also nur Messungen mit einer Erfolgsrate über 60%.

Die nachfolgende Tabelle zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der Folgeuntersuchungen in den genannten Zeiträumen. Es wird dabei ebenfalls der jeweils kleinste und größte Wert angegeben, der sich bei den Folgeuntersuchungen im jeweiligen Zeitraum ergab.

	Patientenzahl (n)	Mittelwert der Lebersteifigkeit [kPa]	Minimum [kPa]	Maximum [kPa]
Erstuntersuchung	56	11,07 ± 11,07	3,30	75,00
Monat 1-3	2	9,80 ± 4,81	6,4	13,2
Monat 4-6	13	9,82 ± 4,73	4,7	18,2
Monat 7-9	8	8,93 ± 2,15	5,9	11,4
Monat 10-12	7	7,47 ± 2,27	4,8	10,7
Monat 13-15	7	8,46 ± 3,82	4,6	13,9
Monat 16-18	3	10,80 ± 4,03	6,2	13,7

Tabelle 6: Zeitliche Abstände zwischen erster und nachfolgenden Fibroscan®-Untersuchungen und Ergebnisse der Folgeuntersuchungen

Die nachfolgende Graphik stellt nun noch einmal die individuellen Fibroscan®-Ergebnisse im zeitlichen Verlauf ohne Einteilung in die oben dargestellten Zeiträume dar. Es finden nur Untersuchungen bis zur vierten Folgeuntersuchung Berücksichtigung, da die Anzahl der Patienten, die zu noch mehr Folgeuntersuchungen erschienen sind, zu gering ist. Hier ist ersichtlich, dass die zeitlichen Abstände der einzelnen Untersuchungen von Patient zu Patient variieren, da die Patienten in unterschiedlichen zeitlichen Abständen zu den Untersuchungen erschienen sind. Es ist zu beachten, dass nicht alle der 20 Patienten vier Mal erschienen sind. Einige von ihnen sind auch nur zwei oder drei Mal erschienen.

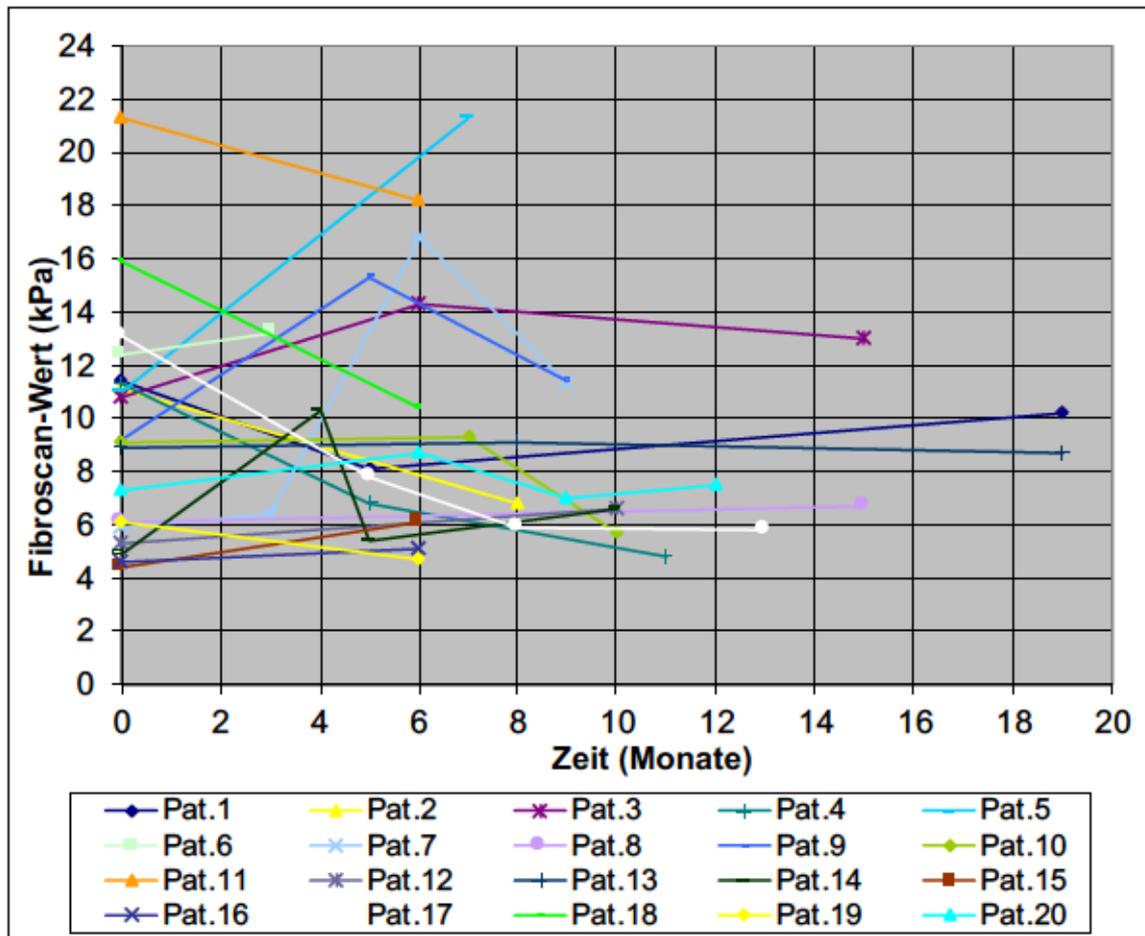


Abb. 7: Fibroscan®-Werte der Untersuchungen eins bis vier im zeitlichen Verlauf

Die nachfolgende Tabelle zeigt nun zum einen den Mittelwert der Fibroscan®-Erstuntersuchung, welcher sich bei den Patienten ergab, bei denen eine Folgeuntersuchung im Zeitraum ein bis drei Monate, vier bis sechs Monate, sieben bis neun Monate, zehn bis zwölf Monate, 13 bis 15 Monate und 16 bis 18 Monate gelaufen ist, und den Fibroscan®-Mittelwert der jeweiligen Folgeuntersuchung in den eben genannten Zeiträumen. Es wird ebenfalls das Signifikanzniveau angegeben, das sich bei den Folgeuntersuchungen in den genannten Zeiträumen im Vergleich zur Erstuntersuchung dieser Patienten ergibt:

		N	Mittelwert
Paar 1	Fibroscan®-Erstuntersuchung	2	9,15 ± 4,60
	Fibroscan® nach 1-3 Monaten	2	9,80 ± 4,81
	<i>P</i> -level		0,14 (n.s.)
Paar 2	Fibroscan®-Erstuntersuchung	13	9,71 ± 5,01
	Fibroscan® nach 4-6 Monaten	13	9,82 ± 4,73
	<i>P</i> -level		0,93 (n.s.)
Paar 3	Fibroscan®-Erstuntersuchung	8	10,71 ± 4,73
	Fibroscan® nach 7-9 Monaten	8	8,93 ± 2,15
	<i>P</i> -level		0,36 (n.s.)
Paar 4	Fibroscan®-Erstuntersuchung	7	7,94 ± 2,84
	Fibroscan® nach 10-12 Monaten	7	7,47 ± 2,27
	<i>P</i> -level		0,74 (n.s.)
Paar 5	Fibroscan®-Erstuntersuchung	7	9,71 ± 5,87
	Fibroscan® nach 13-15 Monaten	7	8,46 ± 3,82
	<i>P</i> -level		0,48 (n.s.)
Paar 6	Fibroscan®-Erstuntersuchung	3	10,63 ± 9,08
	Fibroscan® nach 16-18 Monaten	3	10,80 ± 4,03
	<i>P</i> -level		0,98 (n.s.)

Tabelle 7: Fibroscan®-Mittelwerte der Patienten, bei denen Folgeuntersuchungen gelaufen sind, und Signifikanz der Unterschiede zwischen erster und nachfolgender Untersuchung nach Einteilung in bestimmte zeitliche Intervalle

Es zeigt sich also, dass es keinen signifikanten Fibroseprogress gibt, wenn der Fibroscan®-Mittelwert der Erstuntersuchung der Patienten, bei denen eine Folgeuntersuchung gelaufen ist, verglichen wird mit dem Fibroscan®-Wert, der sich bei der Folgeuntersuchung im jeweiligen Zeitraum ergibt.

Die nachfolgende Tabelle zeigt nun zum einen den jeweiligen Mittelwert der Fibroscan®-Ergebnisse der ersten und zweiten Folgeuntersuchung und zum anderen den Mittelwert der ersten Fibroscan®-Untersuchung, der sich ergibt, wenn man nur die Ergebnisse der Patienten berücksichtigt, bei denen dann auch eine

Folgeuntersuchung gelaufen ist. Hierbei werden die Patienten berücksichtigt, bei denen überhaupt eine Folgeuntersuchung gelaufen ist, wohingegen in der vorhergehenden Tabelle die Folgeuntersuchungen in bestimmte zeitliche Intervalle eingegrenzt wurden. In der nachfolgenden Tabelle finden diese zeitlichen Abstände keine Berücksichtigung.

		N	Mittelwert
Paaren1	Fibroscan®1	20	9,51 ± 4,26
	Fibroscan®2	20	9,76 ± 4,50
	<i>P</i> -level		0,78 (n.s.)
Paaren2	Fibroscan®1	14	9,70 ± 4,24
	Fibroscan®3	14	8,59 ± 3,68
	<i>P</i> -level		0,42 (n.s.)

Tabelle 8: Fibroscan®-Mittelwerte der Patienten, bei denen Folgeuntersuchungen gelaufen sind, und Signifikanz der Unterschiede zwischen erster und nachfolgender Untersuchung

Man sieht also auch hier, dass der Ausgangsfibroscan®-Wert, bei den Patienten, bei denen eine zweite und eine dritte Untersuchung gelaufen ist, sich nicht signifikant unterscheidet von den Folgewerten. Das wiederum bedeutet, dass die Ergebnisse recht konstant sind und keinen größeren Schwankungen unterliegen.

3.3 Unterschiede des Alters, des BMI und der Laborparameter bei Patienten mit und ohne Leberzirrhose (Ermittlung der Zirrhose durch transiente Elastographie)

Die nachfolgende Tabelle soll veranschaulichen wie sich Alter, Albumin, Quick, Bilirubin, GPT, Gamma-GT, GOT, alkalische Phosphatase, Thrombozyten, *Body-Mass-Index*, Ferritin, Transferrinsättigung, Alpha-Fetoprotein, Coeruloplasmin, Kupfer im 24-h-Urin, Kupferausscheidung und Gamma-Globuline bei den Patienten, die dem Fibroscan®-Ergebnis zufolge eine Zirrhose haben, im Vergleich zu den Patienten verhalten, die dem Fibroscan®-Ergebnis zufolge keine Zirrhose haben. Dabei wurde, wie oben bereits beschrieben, der *Cut-off* bei 13 kPa gesetzt,

was bedeutet, dass hier davon ausgegangen wird, dass der Patient, der einen Fibroscan®-Wert ≥ 13 kPa erreicht, eine Leberzirrhose hat.

	Zirrhose im Fibroscan®	N	Mittelwert
Alter [Jahre]	0	46	37 ± 12
	1	10	39 ± 11
	<i>P</i> -level		0,7 (n.s.)
Albumin [g/dl]	0	45	4,2 ± 0,4
	1	10	4,0 ± 0,5
	<i>P</i> -level		0,1 (n.s.)
Quick [%]	0	45	91 ± 16
	1	10	80 ± 23
	<i>P</i> -level		0,1 (n.s.)
Bilirubin [mg/dl]	0	46	0,64 ± 0,3
	1	10	0,81 ± 0,6
	<i>P</i> -level		0,2 (n.s.)
GPT [U/l]	0	43	42 ± 51
	1	10	77 ± 78
	<i>P</i> -level		0,1 (n.s.)
Gamma-GT [U/l]	0	43	41 ± 33
	1	10	104 ± 76
	<i>P</i> -level		0,03

GOT [U/l]	0	43	34 ± 18
	1	10	90 ± 95
	<i>P</i> -level		0,1 (n.s.)
AP [U/l]	0	43	82 ± 27
	1	10	112 ± 33
	<i>P</i> -level		0,004
Thrombozyten [x1000/μl]	0	45	193 ± 56
	1	10	125 ± 56
	<i>P</i> -level		0,001
BMI [kg/m ²]	0	46	23,6 ± 3,4
	1	6	23,4 ± 4,3
	<i>P</i> -level		0,9 (n.s.)
Ferritin [μg/l]	0	46	132 ± 134
	1	9	309 ± 319
	<i>P</i> -level		0,1 (n.s.)
TFS [%]	0	45	32 ± 30
	1	10	26 ± 16
	<i>P</i> -level		0,6 (n.s.)
AFP [μg/l]	0	44	11,5 ± 50
	1	10	8,5 ± 11
	<i>P</i> -level		0,9 (n.s.)

Coeruloplasmin [mg/dl]	0	46	11,3 ± 6,7
	1	10	14,3 ± 7,1
	<i>P</i> -level		0,2 (n.s.)
Cu24h [mg/l]	0	39	0,1 ± 0,2
	1	6	0,3 ± 0,4
	<i>P</i> -level		0,3 (n.s.)
CuUrin [mg/d]	0	39	0,2 ± 0,2
	1	6	0,5 ± 0,7
	<i>P</i> -level		0,4 (n.s.)
Gamma-Globuline [g/dl]	0	45	1,1 ± 0,3
	1	10	2,9 ± 5,3
	<i>P</i> -level		0,3 (n.s.)

Tabelle 9: Unterschiede des Alters, des BMI und der Laborparameter bei Patienten mit Leberzirrhose, ermittelt durch Messung der Lebersteifigkeit mittels transientser Elastographie

Es zeigt sich also, dass sich die Patienten, die einen Fibroscan®-Wert über 13 kPa, und damit nach dem festgelegten *Cut-Off*-Wert eine Zirrhose haben, bei der Gamma-GT, der AP und den Thrombozyten signifikant unterscheiden. Der Unterschied ist für Thrombozyten hoch signifikant negativ auf dem Niveau von <0,001 (2-seitig), für die AP stark signifikant auf dem Niveau von <0,004 (2-seitig) und für die Gamma-GT signifikant auf dem Niveau von <0,03 (2-seitig).

3.4 Korrelation zwischen Alter, BMI und Laborparametern und Ergebnis der Fibroscan®-Untersuchung

Es wurde eine bivariate Korrelation der Fibroscan®-Ergebnisse mit Alter, den Leberwerten GOT, GPT und Gamma-GT, alkalischer Phosphatase (AP), Bilirubin, Albumin, Quick, Thrombozyten, *Body-Mass-Index*, den Eisenparametern Ferritin und Transferrinsättigung, Alpha-Fetoprotein (AFP), Coeruloplasmin, Kupfer im 24-Stunden-Urin und Gamma-Globulinen durchgeführt. Es ergaben sich signifikante Zusammenhänge zwischen dem Fibroscan®-Wert und Albumin, Quick, GPT, Gamma-GT, GOT, AP, Thrombozyten, Ferritin und Gamma-Globulinen. Aus der nachfolgenden Tabelle ist das jeweilige Signifikanzniveau ersichtlich:

		Fibroscan®
Albumin	Korrelation nach Pearson	-0,311
	Signifikanz (2-seitig)	0,021
	N	55
Quick	Korrelation nach Pearson	-0,352
	Signifikanz (2-seitig)	0,008
	N	55
GPT	Korrelation nach Pearson	0,456
	Signifikanz (2-seitig)	0,001
	N	53
Gamma-GT	Korrelation nach Pearson	0,675
	Signifikanz (2-seitig)	0,000
	N	53
GOT	Korrelation nach Pearson	0,736
	Signifikanz (2-seitig)	0,000
	N	53
AP	Korrelation nach Pearson	0,430
	Signifikanz (2-seitig)	0,001
	N	53

Thrombozyten	Korrelation nach Pearson	-0,409
	Signifikanz (2-seitig)	0,002
	N	55
Ferritin	Korrelation nach Pearson	0,336
	Signifikanz (2-seitig)	0,012
	N	55
Gamma-Globuline	Korrelation nach Pearson	0,441
	Signifikanz (2-seitig)	0,001
	N	55

Tabelle 10: Signifikante bivariate Korrelation zwischen Laborparametern und Ergebnis der Fibroscan®-Untersuchung

Demnach ist der Zusammenhang zwischen Ferritin und Fibroscan®-Wert auf dem Niveau von $<0,012$ (2-seitig) signifikant. Ein hoch signifikanter Zusammenhang ergibt sich auf dem Niveau von $<0,001$ (2-seitig) zwischen GPT und Fibroscan®, AP und Fibroscan® und Gamma-Globulinen und Fibroscan® und auf dem Niveau von $<0,0001$ (2-seitig) zwischen Gamma-GT und Fibroscan® und GOT und Fibroscan®. Ein signifikanter negativer Zusammenhang auf dem Niveau von $<0,021$ (2-seitig) ergibt sich zwischen Albumin und Fibroscan®-Wert. Ein stark signifikanter negativer Zusammenhang auf dem Niveau von $<0,008$ (2-seitig) besteht zwischen Fibroscan® und Quick und auf dem Niveau von $<0,002$ (2-seitig) zwischen Fibroscan® und Thrombozyten. Das heißt, dass bei den Patienten, bei denen die Fibroscan®-Werte hoch waren, Ferritin ebenfalls hoch war. GPT, Gamma-GT, GOT, AP und Gamma-Globuline waren sogar hoch signifikant erhöht. Albumin war bei den Patienten mit hohem Fibroscan®-Wert signifikant erniedrigt. Die Thrombozyten waren bei den Patienten, die einen hohen Fibroscan®-Wert aufwiesen, stark signifikant erniedrigt, ebenso der Quick-Wert.

Das Alter, Bilirubin, der BMI, Transferrinsättigung, Alpha-Fetoprotein und die Kupferparameter Coeruloplasmin und Kupferausscheidung im 24-Stunden-Urin korrelierten nicht mit den Ergebnissen der Fibroscan®-Untersuchungen.

3.5 Korrelationen zwischen Alter, BMI und den Laborparametern untereinander

Die folgende Tabelle gibt die restlichen bivariaten Korrelationen zwischen Alter, Albumin, Quick, Bilirubin, GPT, Gamma-GT, GOT, AP, Thrombozyten, *Body-Mass-Index*, Ferritin, Transferrinsättigung, Alpha-Fetoprotein, Coeruloplasmin, Kupferausscheidung im 24-Stunden-Urin und Gamma-Globulinen wieder:

	Alter	Albumin	Quick	Bilirubin	GPT	GGT	GOT	AP	Uroporphyrinogen	BMI	Ferritin	TFS	AFP	Coeruloplasmia	Cu24h	Gamma-Globuline	
Alter	Korrelationsnach Pearson																
	Signifikanz (2-seitig)	0,073	0,031	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
	N	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57
Albumin	Korrelationsnach Pearson	0,073															
	Signifikanz (2-seitig)	0,389	0,031	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	N	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57
Quick	Korrelationsnach Pearson	-0,145	0,285														
	Signifikanz (2-seitig)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	N	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57
Bilirubin	Korrelationsnach Pearson	-0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Signifikanz (2-seitig)	0,979	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	N	74	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57
GPT	Korrelationsnach Pearson	-0,165	-0,140	-0,120	0,073												
	Signifikanz (2-seitig)	0,162	0,311	0,387	0,547												
	N	72	54	54	71												
Gamma-GT	Korrelationsnach Pearson	0,057	-0,279	-0,435	0,189												
	Signifikanz (2-seitig)	0,635	0,041	0,001	0,115												
	N	72	54	54	71												
GOT	Korrelationsnach Pearson	-0,445	-0,338	-0,225	0,220	0,797											
	Signifikanz (2-seitig)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000											
	N	72	54	54	71	72											
AP	Korrelationsnach Pearson	-0,016	-0,165	0,054	0,472	0,110	0,258										
	Signifikanz (2-seitig)	0,896	0,234	0,697	0,000	0,358	0,028										
	N	72	54	54	71	72	72										
Thrombozyten	Korrelationsnach Pearson	0,107	0,352	0,374	-0,289	-0,144	-0,393	-0,138									
	Signifikanz (2-seitig)	0,424	0,007	0,004	0,028	0,296	0,003	0,098									
	N	58	57	57	58	55	55	55									
BMI	Korrelationsnach Pearson	0,065	-0,114	0,063	-0,045	0,208	0,223	0,257	-0,145								
	Signifikanz (2-seitig)	0,541	0,420	0,655	0,746	0,143	0,155	0,059	0,298								
	N	54	52	52	54	51	51	51	53								
Ferritin	Korrelationsnach Pearson	0,070	-0,335	-0,229	0,417	0,387	0,510	0,572	-0,153	0,145							
	Signifikanz (2-seitig)	0,556	0,012	0,090	0,000	0,001	0,000	0,000	0,295	0,296							
	N	73	55	55	72	69	69	69	69	54							
TFS	Korrelationsnach Pearson	-0,115	-0,112	-0,021	0,173	-0,048	-0,009	0,083	0,072	-0,220	0,104						
	Signifikanz (2-seitig)	0,339	0,412	0,878	0,149	0,696	0,973	0,642	0,488	0,108	0,394						
	N	71	55	55	71	68	68	68	68	52	70						
AFP	Korrelationsnach Pearson	-0,059	-0,266	0,083	0,037	-0,001	-0,001	0,033	0,281	-0,087	-0,036						
	Signifikanz (2-seitig)	0,661	0,048	0,544	0,782	0,995	0,810	0,039	0,522	0,139	0,798						
	N	57	55	55	57	54	54	54	54	52	55						
Coeruloplasmia	Korrelationsnach Pearson	0,178	-0,262	0,188	-0,129	0,064	0,176	0,145	0,138	0,123	-0,114						
	Signifikanz (2-seitig)	0,126	0,049	0,212	0,273	0,762	0,591	0,140	0,224	0,300	0,342						
	N	75	57	57	74	72	72	72	72	54	72						
Cu24h	Korrelationsnach Pearson	-0,032	-0,527	-0,429	0,401	0,202	0,351	0,234	-0,555	0,161	0,470						
	Signifikanz (2-seitig)	0,308	0,000	0,003	0,001	0,126	0,005	0,045	0,074	0,302	0,000						
	N	61	45	45	61	59	59	59	59	43	59						
Gamma-Globuline	Korrelationsnach Pearson	-0,018	-0,328	-0,362	0,179	0,294	0,348	0,443	0,311	-0,072	0,208						
	Signifikanz (2-seitig)	0,893	0,013	0,006	0,178	0,030	0,009	0,001	0,021	0,236	0,120						
	N	58	57	57	58	55	55	55	55	53	57						

Tabelle 11: Bivariate Korrelationen zwischen Alter, BMI und den Laborparametern untereinander

Es zeigen sich also hoch signifikante positive Korrelationen auf dem Niveau von $<0,0001$ (2-seitig) zwischen Bilirubin und Ferritin, Bilirubin und AP, GPT und Gamma-GT, GPT und GOT, Gamma-GT und GOT, Gamma-GT und Ferritin, GOT und Ferritin, AP und Ferritin, Ferritin und Kupferausscheidung im 24-Stunden-Urin und auf dem Niveau von $<0,001$ (2-seitig) zwischen Bilirubin und Kupferausscheidung im 24-Stunden-Urin, GPT und Ferritin, GOT und Gamma-Globulinen und AFP und Coeruloplasmin.

Stark signifikante positive Korrelationen auf einem Niveau von $<0,01$ (2-seitig) ergaben sich zwischen Albumin und Thrombozyten, Quick und Thrombozyten, Gamma-GT und Kupferausscheidung im 24-Stunden-Urin und Gamma-GT und Gamma-Globulinen.

Signifikante positive Korrelationen auf einem Niveau von $<0,05$ (2-seitig) zeigten sich zwischen Albumin und Quick, GPT und Gamma-Globulinen, Gamma-GT und AP, GOT und AP, GOT und Kupferausscheidung im 24-Stunden-Urin, AP und AFP und AP und Gamma-Globulinen.

Hoch signifikante negative Korrelationen auf dem Niveau von $<0,0001$ (2-seitig) ergaben sich zwischen Albumin und Kupferausscheidung im 24-Stunden-Urin, Quick und Bilirubin, Thrombozyten und Kupferausscheidung im 24-Stunden-Urin und auf dem Niveau von $<0,001$ (2-seitig) zwischen Quick und Gamma-GT.

Stark signifikante negative Korrelationen auf einem Niveau von $<0,01$ (2-seitig) konnten zwischen Quick und Gamma-Globulinen, Quick und Kupferausscheidung im 24-Stunden-Urin und Gamma-GT und Thrombozyten festgestellt werden.

Signifikante negative Korrelationen auf einem Niveau von $<0,05$ (2-seitig) bestanden zwischen Albumin und Gamma-GT, Albumin und GOT, Albumin und Ferritin, Albumin und AFP, Albumin und Coeruloplasmin, Albumin und Gamma-Globulinen und Bilirubin und Thrombozyten.

Die restlichen Korrelationen ergaben keine signifikanten Ergebnisse.

3.6 Unterschiede zwischen Wilson-Patienten mit histologisch gesicherter Leberzirrhose und solchen ohne Leberzirrhose bezogen auf Laborparameter und Lebersteifigkeit

Fünf von 15 Patienten, von denen eine Leberhistologie vorlag, hatten eine Leberzirrhose. Es liegt somit eine histologische Zirrhoserate unter den Patienten mit Morbus Wilson von 33% vor. Die folgende Tabelle zeigt, dass die Patienten mit histologisch gesicherter Leberzirrhose im Vergleich zu den Patienten, die laut histologischem Befund keine Leberzirrhose aufweisen, keine signifikant höheren Ferritinspiegel, Transferrinsättigung, ALT (GPT), AST (GOT), Gamma-GT, alkalische Phosphatase, Coeruloplasminspiegel oder Bilirubinspiegel haben. Auch Kupfer im Urin (mg/l) unterschied sich bei den Patienten mit histologisch nachgewiesener Leberzirrhose nicht signifikant von den Patienten ohne Leberzirrhose. Es zeigte sich weiterhin, dass die Wilson-Patienten mit Leberzirrhose keinen signifikant erhöhten Fibroscan®-Wert im Vergleich zu den Wilson-Patienten ohne Zirrhose haben.

Die nachfolgende Tabelle zeigt die genauen Ergebnisse der eben besprochenen Aspekte:

	Leberzirrhose (n=5)	Keine Leberzirrhose (n=10)	p-Level
Ferritin [$\mu\text{g/l}$]	105 \pm 82	66 \pm 37	n.s.
TFS [%]	18 \pm 4	46 \pm 59	n.s.
ALT [U/l]	56 \pm 26	32 \pm 23	n.s.
AST [U/l]	60 \pm 51	35 \pm 18	n.s.
Gamma-GT [U/l]	69 \pm 57	43 \pm 46	n.s.
AP [U/l]	109 \pm 44	77 \pm 17	n.s.
Bilirubin [mg/dl]	0,5 \pm 0,1	0,7 \pm 0,3	n.s.
Kupfer im Urin [mg/l]	0,05 \pm 0,03	0,08 \pm 0,07	n.s.
Coeruloplasmin [mg/dl]	11 \pm 6	9,7 \pm 4,9	n.s.
Steifigkeit der Leber [kPa]	22,8 \pm 29,4	8,4 \pm 2,3	n.s.

Tabelle 12: Unterschiede zwischen Patienten mit histologisch gesicherter Leberzirrhose und solchen ohne Leberzirrhose bezogen auf Laborparameter und Lebersteifigkeit

Die nachfolgende Tabelle zeigt den histologischen Fibrosegrad der Patienten, bei denen eine Leberbiopsie erfolgt ist und die Ergebnisse der Messung der Lebersteifigkeit mittels transienter Elastographie:

Fibrosegrad	histolog. Zirrhose	Fibroscan®-Wert [kPa]	Zirrhose im Fibroscan®
4	1	75	1
4	1	15,9	1
4	1	9,7	0
4	1	7,3	0
4	1	6,1	0
3	0	10,2	0
3	0	10,1	0
3	0	8,9	0
2	0	6,3	0
2	0	5,6	0
2	0	11,3	0
1,5	0	4,9	0
1	0	8,9	0
1	0	7,2	0
0	0	11,0	0

Tabelle 13: Histologischer Fibrosegrad und Fibroscan®-Wert der Patienten, bei denen eine Leberbiopsie erfolgt ist

Es zeigt sich also, dass lediglich zwei von fünf Patienten, die histologisch eine nachgewiesene Zirrhose haben, einen Fibroscan®-Wert ≥ 13 kPa haben. Dies entspricht einer Sensitivität von 40%.

3.7 Ergebnisse der HFE-Genmutationsanalyse

Bei der HFE-Genmutationsanalyse der Allele C282Y, H63D, S65C und E168X ergab sich, dass kein Patient mit Morbus Wilson eine Mutation auf den Allelen S65C oder E168X hatte.

16,4% der Patienten mit Morbus Wilson waren heterozygot für die Mutation auf dem Allel C282Y. 2,7% aller Wilson-Patienten waren homozygot für diese Mutation. Bei der Kontrollgruppe ergab sich eine heterozygote Mutationsrate für das Allel C282Y von 10,8% und eine homozygote Mutationsrate von 0,7%.

Für das Allel H63D ergaben sich heterozygote Mutationen bei 26% der Patienten mit Morbus Wilson. 1,4% waren homozygot für diese Mutation. In der Kontrollgruppe fanden sich bei 27,1% heterozygote Mutationen und bei 2,7% homozygote Mutationen.

Eine *Compound*-Heterozygotie der Allele C282Y und H63D ergab sich bei 5,6% der Patienten mit Morbus Wilson. In der Kontrollgruppe kam diese *Compound*-Heterozygotie mit einer Rate von 3,7% vor.

Insgesamt zeigte sich, dass 41,1% aller Wilson-Patienten entweder eine Mutation auf dem Allel C282Y oder auf dem Allel H63D hatten, wobei die entsprechende Rate in der Kontrollgruppe bei 37,3% lag.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass sich die Prävalenz der HFE-Genmutationen zwischen Patienten mit Morbus Wilson und der Kontrollgruppe nicht unterschied (41,1% vs. 37,3%; n.s.).

Die beschriebenen Ergebnisse werden durch die nachfolgende Tabelle veranschaulicht:

	M. Wilson (n=73)	Kontrolle (n=295)	p-Level
Aminosäure 282			
WT282/WT282[%]	80,8	88,5	n.s.
C282Y/WT282[%]	16,4	10,8	n.s.
C282Y/C282Y[%]	2,7	0,7	n.s.
Aminosäure 63			
WT63/WT63[%]	74	70,2	n.s.
H63D/WT63[%]	26	27,1	n.s.
H63D/H63D[%]	1,4	2,7	n.s.
Aminosäure 282 und 63			
C282Y/H63D[%]	5,6	3,7	n.s.
Jegliche Mutation			
C282Y oder H63D	41,1	37,3	n.s.

Tabelle 14: Ergebnisse der HFE-Genmutationsanalyse

3.8 Vergleich von Eisenparametern, HFE-Genmutationen und Coeruloplasmin

Folgende Tabelle dient dem Vergleich der Eisenparameter Ferritin und Transferinsättigung bei Patienten mit Morbus Wilson und denen einer Kontrollgruppe.

	Ferritin [$\mu\text{g/l}$]	TFS [%]
MW (n=73)	161 \pm 192	31 \pm 25
Kontrolle (n=276)	87 \pm 137	29 \pm 14
p-Level	0,003	n.s.
MW mit HFE-Mutation (n=28)	122 \pm 121	36 \pm 37
Kontrolle mit HFE-Mutation (n=104)	87 \pm 102	32 \pm 16
p-Level	n.s.	n.s.
MW mit HFE-Wildtyp (n=43)	172 \pm 208	29 \pm 14
Kontrolle mit HFE-Wildtyp (n=172)	87 \pm 154	27 \pm 13
p-Level	0,015	n.s.

Tabelle 15: Unterschiede von Eisenparametern bei Patienten mit und ohne HFE-Genmutationen

Es zeigt sich, dass die Patienten mit Morbus Wilson signifikant höhere Ferritinwerte aufwiesen als die gesunde Kontrollgruppe (161 \pm 192 $\mu\text{g/l}$ vs. 87 \pm 137 $\mu\text{g/l}$; $p < 0,003$). Hingegen bestehen keine Unterschiede bezüglich der Transferrinsättigung. Wenn man nur die Patienten mit Morbus Wilson berücksichtigt, die einen HFE-Wildtyp aufweisen, sind auch hier die Ferritinspiegel signifikant höher als in der Kontrollgruppe mit HFE-Wildtyp (172 \pm 208 $\mu\text{g/l}$ vs. 87 \pm 154 $\mu\text{g/l}$; $p < 0,015$). Hinsichtlich der Transferrinsättigung ergeben sich keine signifikanten Unterschiede.

Bei den Wilson-Patienten mit HFE-Genmutation zeigte sich kein Unterschied hinsichtlich der Ferritinspiegel in Vergleich zu den Personen in der Kontrollgruppe, die eine HFE-Genmutation aufwiesen. Auch die Transferrinsättigung unterschied sich nicht bei Wilson-Patienten mit HFE-Genmutation im Vergleich zur Kontrollgruppe mit HFE-Genmutationen.

Unter den Patienten gab es 64 mit für Morbus Wilson typischen, erniedrigten Coeruloplasminwerten und elf mit normalen Coeruloplasminwerten. Die sich anschließende Tabelle zeigt, dass die Patienten mit niedrigeren Coeruloplasminspiegeln jünger sind als die Patienten mit normalen Coeruloplasminspiegeln (37 ± 12 Jahre vs. 44 ± 10 Jahre; $p < 0,046$). Hinsichtlich Ferritin und Transferrinsättigung ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bei Patienten mit niedrigem oder hohem Coeruloplasmin.

Ebenfalls nicht signifikant waren die Unterschiede zwischen beiden Gruppen in Bezug auf AST bzw. GOT, ALT bzw. GPT, Gamma-GT, alkalische Phosphatase, Bilirubin und Kupfer im Urin.

Die sich anschließende Tabelle zeigt die genauen Ergebnisse der eben beschriebenen Aspekte:

	Erniedrigtes Coeruloplasmin (n=64)	Normales Coeruloplasmin (n=11)	p-Level
Alter [Jahre]	37±12	44±10	0,046
Ferritin [µg/l]	167±189	128±225	n.s.
TFS [%]	32±27	26±13	n.s.
ALT [U/l]	38±45	51±81	n.s.
Gamma-GT [U/l]	43±39	58±75	n.s.
AP [U/l]	95±43	107±37	n.s.
Bilirubin [mg/dl]	0,9±1,2	0,6±0,2	n.s.
Kupfer im Urin [mg/l]	0,19±0,21	0,14±0,13	n.s.
AST [U/l]	33±25	65±97	n.s.

Tabelle 16: Unterschiede zwischen Alter und ausgewählten Laborparametern bei Patienten mit niedrigem und solchen mit normalem Coeruloplasmin

4 DISKUSSION

4.1 Vergleich der Ergebnisse der Messung der Lebersteifigkeit mittels transienter Elastographie bei Patienten mit Morbus Wilson mit den Ergebnissen gesunder Probanden

In der vorliegenden Arbeit ergab sich bei der Messung der Lebersteifigkeit mittels transienter Elastographie ein Mittelwert von 11,1 kPa bei einer Standardabweichung von 11,1. Dabei schwankten die Werte zwischen 3,30 und 75 kPa.

Vergleicht man die eben genannten Ergebnisse der Wilson-Patienten mit Werten, die sich aus der Messung der Lebersteifigkeit mittels transienter Elastographie bei gesunden Probanden ergeben, so zeigt sich, dass der Mittelwert bei den Wilson-Patienten deutlich höher liegt als bei gesunden Probanden. So untersuchte Sirli in einer rumänischen Studie 152 gesunde Probanden, die entweder gesunde Freiwillige oder Patienten anderer Fachgebiete außer der Gastroenterologie waren. Der Mittelwert der Lebersteifigkeit war $4,8 \pm 1,3$ kPa, wobei die Werte zwischen 2,3 und 8,8 kPa schwankten. Der Mittelwert der Lebersteifigkeit lag bei gesunden Probanden unter 5 kPa (Sirli R et al., 2009).

Es zeigt sich also, dass es einen deutlichen Unterschied zwischen dem Mittelwert der Lebersteifigkeitsmessungen von 11,1 kPa bei den Wilson-Patienten und dem Mittelwert von unter 5 kPa bei gesunden Probanden gibt.

4.1.1 Sensitivität und Spezifität der transienten Elastographie

Die transiente Elastographie ist ein nicht-invasives Mittel zur Messung der Lebersteifigkeit, die mit dem histologischen Stadium der Leberfibrose korreliert ist. Mehrere Studien haben eine gute Treffsicherheit der transienten Elastographie ergeben, wenn es darum ging eine Zirrhose bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen vorherzusagen. Der positive Vorhersagewert PPV (*positive predictive value*) für die Diagnose einer Leberzirrhose ist bei einer einzigen Messung mit 50 % niedrig, steigt aber schon bei der zweiten unabhängigen Messung auf 94 %

(Del Poggio P et al., 2009). In ersten größeren Studien werden für die Diagnose Leberzirrhose Sensitivitäten von 77 bis 87% und Spezifitäten von 91 bis 97% bei Schwellenwerten zwischen 12,5 und 14,4 kPa beschrieben (Lörke J et al., 2007). Beispielsweise verglich Wong die transiente Elastographie mit Leberbiopsien von 246 Patienten mit nicht-alkoholischer Steatohepatitis und zeigte eine Sensitivität von 91% und eine Spezifität von 75% für die Vorhersage einer ernsten Fibrose ($F \geq 3$), wenn ein Schwellenwert von 7,9 kPa verwendet wird (Wong et al., 2010). Bei 380 Patienten mit chronischem Alkoholabusus ergab sich ein positiver prädiktiver Wert von 97% bei einem Schwellenwert für eine Leberzirrhose von 13 kPa (Lörke J et al., 2007). Dennoch ist es so, dass das Vorliegen einer Fettleber und eines metabolischen Syndroms die Messergebnisse etwas erhöhen und die Treffsicherheit des Verfahrens etwas reduzieren. Es ist nicht sicher, ob der Anstieg in Beziehung steht mit dem Vorhandensein einer Steatofibrose, durch die Steatosis selbst oder durch die entzündliche Komponente hervorgerufen wird (Del Poggio et al., 2009). Leider konnte in der vorliegenden Arbeit keine Sensitivität erreicht werden, die an die eben genannten Werte heranreicht. Es zeigte sich lediglich bei zwei von fünf Patienten, die laut Leberhistologie eine Zirrhose aufweisen, ein Fibroscan®-Wert ≥ 13 kPa, welcher somit nach der Einteilung von Friedrich-Rust für eine Zirrhose spricht (Friedrich-Rust et al., 2008). Dies entspricht lediglich einer Sensitivität von 40%, und das obwohl mindestens zehn Messungen der Lebersteifigkeit mit einer Erfolgsrate von mindestens 60% durchgeführt wurden. Die geringe Sensitivität kann ggf. dadurch erklärt werden, dass zwischen Leberbiopsie und Durchführung der Fibroscan®-Untersuchung Jahre lagen, in denen die Patienten auch medikamentös therapiert wurden.

4.1.2 Mögliche Fehlerquellen bei der Messung

Für die Differenzierung leichter Fibrosestadien scheint die transiente Elastographie ungeeignet. Es werden AUROC-Werte zwischen 0,72 und 0,81 beschrieben. Unter dem AUROC-Wert versteht man die „*area under the receiver operator curve*“ (AUROC=graphische Gegenüberstellung von Sensitivität und Spezifität). Je größer die Fläche unter der Kurve, desto besser ist der diagnostische Test. Einem

optimalen Testverfahren mit einer Sensitivität und Spezifität von 100% entspricht die Fläche 1,0 (Lörke J et al., 2007). Bei im Rahmen einer prospektiven Studie in der Universitätsklinik Düsseldorf mit Fibroscan® untersuchten Patienten konnte nicht sicher zwischen einer F0- und F1-, F1- und F2-Fibrose oder F2- und F3-Fibrose (Klassifikation nach Desmet und Scheuer) unterschieden werden (Erhardt et al., 2006).

Bei adipösen Patienten kann es schwierig sein mit der Standardsonde (3,5 MHz, 2 mm Vibrationsamplitude) ausreichende Signale zu erhalten. Inzwischen wurde eine spezielle Sonde für adipöse Patienten eingeführt (2,5 MHz, 3 mm Vibrationsamplitude) (Bamber J et al., 2013). In einer Studie mit mehr als 13000 Messungen der Lebersteifigkeit ergaben sich 3,1% Misserfolge und 15,8% unreelle Ergebnisse. Beides war assoziiert mit einem BMI $>30 \text{ kg/m}^2$, einem Alter >52 Jahre und einem Typ 2-Diabetes. In einer weiteren Studie korrelierte die technische Misserfolgsrate mit dem BMI. Es ergab sich eine Misserfolgsrate von 7% für einen BMI $\geq 30 \text{ kg/m}^2$, von 19% für einen BMI $\geq 35 \text{ kg/m}^2$ und von 59% für einen BMI $\geq 40 \text{ kg/m}^2$, wobei die Misserfolgsraten auf ein vernachlässigbar geringes Level (0,7, 0 und 4,9%) sanken, wenn die XL-Sonde für adipöse Patienten verwendet wurde (Cosgrove D et al., 2013).

Weitere limitierende Faktoren für die Durchführung der transienten Elastographie ergeben sich bei zu engen Interkostalräumen, Aszites, Leber Raumforderungen, akuten Hepatitiden sowie Zustand nach Leberteilresektion, da hier Vernarbungen die Ausbreitung der elastischen Welle beeinträchtigen können (Lörke J et al., 2007). Auch eine Herzinsuffizienz, die das Lebervolumen vergrößert, kann die Messung beeinflussen (Cosgrove D et al., 2013). Bei der akuten Hepatitis (hohe GPT) können zu hohe Resistenzen gemessen werden, ohne dass eine Zirrhose vorliegt (Hüppe D et al., 2009). Erhöhte Messwerte können auch entstehen, wenn eine extrahepatische Cholestase vorliegt, Beta-Blocker eingenommen werden oder die Messung in angehaltener Inspirationsstellung vorgenommen wird. Optimal für die Messung ist das Anhalten der Atmung in Neutralposition.

Ein weiteres Problem der transienten Elastographie ist, dass Gewebe steifer wird, wenn es komprimiert wird. Das heißt, dass eine Vorbelastung insbesondere in oberflächlichen Geweben zu falsch hohen Messungen führen kann (Cosgrove D et al., 2013).

Der Einfluss von Fettgehalt der Leber, Durchblutungsänderungen oder Schwankungen des Pfortaderdruckes auf die Lebersteifigkeit ist systematisch nicht untersucht (Lörke J et al., 2007).

4.2 Folgeuntersuchungen mittels Fibroscan®

In der vorliegenden Arbeit wurde nicht nur eine Messung der transienten Elastographie pro Patient vorgenommen, sondern es wurden die Werte auch im Verlauf kontrolliert, sofern die Patienten im Verlauf der Studie nochmals vorstellig wurden.

Eine erste Fibroscan®-Untersuchung wurde bei 56 Patienten durchgeführt. Bei 20 Patienten kam eine zweite hinzu, bei 14 Patienten eine dritte, bei fünf Patienten eine vierte und bei drei Patienten eine fünfte Untersuchung. Bei einem Patienten wurde eine sechste und siebte Untersuchung durchgeführt.

Im Zeitraum von ein bis drei Monaten erfolgten zwei, im Zeitraum von vier bis sechs Monaten 13, im Zeitraum von sieben bis neun Monaten acht, im Zeitraum von zehn bis zwölf Monaten sieben, im Zeitraum von 13 bis 15 Monaten sieben und im Zeitraum von 16-18 Monaten drei Fibroscan®-Folgeuntersuchungen.

Es wurden die Mittelwerte der Ergebnisse der Fibroscan®-Folgeuntersuchungen in den genannten Zeiträumen berechnet und diese Werte verglichen mit der Fibroscan®-Erstuntersuchung nur dieser Patienten. Hierbei zeigte sich jeweils im Vergleich mit der Erstuntersuchung kein signifikanter Progress. In einer Arbeit von Cope-Yokoyama wurde die Progression der Leberfibrose bei Patienten mit Morbus Wilson histologisch durch Leberbiopsien im Verlauf untersucht, wobei die Intervalle zwischen zwei und zwölf Jahren lagen. Hierbei zeigte sich bei sechs von zwölf Patienten eine stabile Leberhistologie oder eine Verbesserung. Bei den anderen sechs Patienten zeigte sich ein Progress der Fibrose. Die berechnete Rate der

Progression der Leberfibrose lag in der gesamten Gruppe bei null Einheiten pro Jahr von der ersten bis zur zweiten Biopsie (vier Jahre) und bei 0,25 Einheiten pro Jahr von der zweiten bis zur dritten Untersuchung (drei Jahre). In der Gruppe der Patienten, bei denen die Fibrose fortgeschritten ist, wurde die Rate der Progression der Fibrose mit 0,11 Einheiten pro Jahr zwischen der ersten und zweiten Biopsie und 0,6 Einheiten zwischen der zweiten und dritten Biopsie berechnet (Cope-Yokoyama S et al., 2010). Kritisch anzumerken an der Studie von Cope-Yokoyama ist sicherlich die geringe Patientenzahl. In der Gesamtgruppe zeigte sich in der Studie von Cope-Yokoyama im Intervall zwischen der ersten und zweiten Biopsie, also in einem Zeitraum von vier Jahren, kein Progress. Auch in der aktuellen Studie zeigt sich kein Progress, wobei die Intervalle zwischen den einzelnen Fibroscan®-Untersuchungen noch sehr viel kürzer sind. Ein weiterer Grund für einen fehlenden Progress kann auch sein, dass alle untersuchten Patienten unter Therapie standen. Kritisch anzumerken ist an der aktuellen Studie, dass es in einzelnen Untersuchungsintervallen nur sehr wenige Patienten gibt. So gibt es im Zeitraum von ein bis drei Monaten beispielsweise nur zwei Patienten. Die Intervalle hätten jedoch nicht größer gefasst werden können, um so mehr Patienten pro Intervall zu erhalten, da ansonsten teilweise einzelne Patienten in einem Intervall zweimal erschienen wären. Nur weil die Intervalle mit drei Monaten relativ klein gewählt wurden, konnte vermieden werden, dass ein Patient in einem Intervall zweimal erscheint. Das Problem besteht darin, dass die Patienten unregelmäßig erschienen sind, je nachdem wie schwer sie erkrankt waren. Ein regelmäßiges Erscheinen wäre für die Patienten sicherlich nicht zumutbar gewesen.

Des Weiteren wurden die Mittelwerte der ersten Fibroscan®-Untersuchung rückwirkend von den Patienten ermittelt, bei denen im Verlauf eine Folgeuntersuchung durchgeführt wurde, hierbei jedoch jetzt unabhängig davon in welchem zeitlichen Abschnitt die zweite bzw. dritte Untersuchung gelaufen ist. Hierdurch konnten für die ersten beiden Folgeuntersuchungen höhere Patientenzahlen von 20 Patienten bei der zweiten und 14 Patienten bei der dritten Untersuchung erzielt werden. Auch hierbei fand nur der Ausgangsfibroscan®-Wert der Patienten Berücksichtigung, bei denen dann auch eine Folgeuntersuchung gelaufen ist. Hierbei wurde ebenfalls festgestellt, dass der Ausgangsmittelwert der Fibroscan®-Ergebnisse bei

den Patienten, bei denen eine zweite oder dritte Untersuchung gelaufen ist, sich nicht signifikant von den Werten unterschied, die bei der zweiten und dritten Untersuchung ermittelt wurden. Die Ergebnisse sind also recht konstant und unterliegen keinen größeren Schwankungen. Dies spricht für eine hohe Retest-Reliabilität der transienten Elastographie.

Auch in der Literatur findet man Daten über *Follow-up*-Untersuchungen mittels transienter Elastographie. Hierzu soll auf eine chinesische Studie verwiesen werden, in der die Stabilität der transienten Elastographie zur Einschätzung einer Leberfibrose untersucht wurde. Dazu wurden insgesamt 637 Probanden untersucht, die sowohl Gesunde, asymptomatische Hepatitis-B-Virus-Träger, Patienten mit chronischer Hepatitis B als auch Patienten mit HBV-assoziiierter Zirrhose waren. Von diesen 637 Probanden bekamen 302 eine zweite Untersuchung. Im Unterschied zu der vorliegenden Arbeit wurde diese zweite Untersuchung jedoch unmittelbar nach der ersten wiederholt. Dabei kam es auch vor, dass die zweite Untersuchung von einem anderen Untersucher durchgeführt wurde. Es wurde der Korrelationskoeffizient zur Messung der Reproduktivität der Untersuchung berechnet. Die Intra- und Inter-Untersucher-Stabilität war zufriedenstellend mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,970 und 0,847. Für Gesunde oder asymptomatische HBV-Carrier war die Stabilität geringer mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,736 und 0,639. Daraus wurde geschlossen, dass die Messung der Lebersteifigkeit mittels transienter Elastographie eine hohe Stabilität aufweist (Li LF et al., 2008).

4.3 Unterschiede der Blutparameter bei Wilson-Patienten mit mittels transienter Elastographie ermittelter Leberzirrhose

In der vorliegenden Arbeit ergab sich ein hoch signifikanter negativer Zusammenhang zwischen erhöhtem Fibroscan®-Wert (Lebersteifigkeit >13 kPa) und damit definitionsgemäß dem Vorhandensein einer Leberzirrhose und Thrombozyten, ein stark signifikanter positiver Zusammenhang zwischen erhöhtem Fibroscan®-Wert und alkalischer Phosphatase und ein signifikanter positiver Zusammenhang zwischen erhöhtem Fibroscan®-Wert und Gamma-GT.

Wenngleich die eben genannten Zusammenhänge bekannt sein dürften, soll hier nochmal auf eine Studie verwiesen werden, in der die Thrombozytopenie als Marker für das Vorliegen einer Zirrhose untersucht wurde. In dieser Studie aus Taiwan wurden allerdings keine Wilson-Patienten, sondern Patienten mit Hepatitis B- und C-Virusinfektionen untersucht. Das Ziel war anhand der Thrombozytenzahl Hochrisiko-Patienten für ein hepatozelluläres Karzinom (HCC) zu identifizieren, um diese einem Screening-Programm aus Ultraschall-Untersuchungen und Bestimmung von Alpha-Fetoprotein zuzuführen. Im ersten Teil der Studie wurde die Korrelation zwischen Plättchenzahl und pathologischen hepatischen Fibrose-Scores bei Patienten mit Hepatitis B oder C ermittelt. Im zweiten Teil der Studie wurde der Anteil der Patienten mit einer Thrombozytenzahl unter $150000/\mu\text{l}$ unter den Patienten mit hepatozellulärem Karzinom (HCC) eruiert. Es zeigte sich, dass bei den Patienten mit Hepatitis C-Virusinfektion die Plättchenzahl entsprechend den pathologisch erhöhten Fibrose-Scores fiel. Die beste *Cut-Off*-Plättchenzahl war $150000/\mu\text{l}$ für die Diagnose einer Leberzirrhose. Die Sensitivität war 68,2% und die Spezifität 76,4%, wenn die pathologischen Fibrose-Scores zur Diagnose der Leberzirrhose herangezogen wurden und 76,2% bzw. 87,8%, wenn die Ultraschalluntersuchung zur Diagnostik herangezogen wurde. Das Ergebnis der Studie ist also, dass die Thrombozytopenie ein valider Stellvertreter der Zirrhose ist und zudem ein valider Marker zu Identifikation von Hochrisiko-Patienten für ein hepatozelluläres Karzinom (Lu SN et al., 2006).

Die Thrombozytopenie, die in der vorliegenden Arbeit als Marker für die Leberzirrhose ermittelt wurde, wurde demnach bereits in anderen Studien als valider Marker zur Identifikation von Zirrhosepatienten ausfindig gemacht. Die Patienten der vorliegenden Arbeit, die der Messung der Lebersteifigkeit mittels transienter Elastographie zufolge eine Leberzirrhose haben, zeigten im Mittel eine Thrombozytenzahl von $125000/\mu\text{l}$, die damit deutlich unter der in der taiwanesischen Studie ermittelten, für die Diagnose einer Leberzirrhose notwendigen, Thrombozytenzahl von $150000/\mu\text{l}$ lag.

4.4 Beeinflussung der transienten Elastographie durch andere Parameter

In der vorliegenden Arbeit wurden die Fibroscan®-Ergebnisse mit Alter, den Leberwerten GOT, GPT, Gamma-GT, alkalischer Phosphatase (AP), Bilirubin, Albumin, Quick, Thrombozyten, *Body-Mass-Index*, den Eisenparametern Ferritin und Transferrinsättigung, Alpha-Fetoprotein (AFP), Coeruloplasmin, Kupfer im 24-Stunden-Urin und Gamma-Globulinen korreliert. Der Unterschied zum vorhergehenden Abschnitt besteht darin, dass es sich hier um einfache Korrelationen handelt, wohingegen im vorherigen Abschnitt untersucht wurde, ob es hinsichtlich der eben genannten Parameter Unterschiede gibt zwischen Patienten, die laut Fibroscan® eine Leberzirrhose haben im Vergleich zu den Patienten, die laut Fibroscan® keine Zirrhose haben.

Es ergab sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen Ferritin und Fibroscan®-Wert auf dem Niveau von $<0,012$ (2-seitig). Ein hoch signifikanter Zusammenhang ergab sich auf dem Niveau von $<0,001$ (2-seitig) zwischen GPT und Fibroscan®, AP und Fibroscan® und Gamma-Globulinen und Fibroscan® und auf dem Niveau von $<0,0001$ (2-seitig) zwischen Gamma-GT und Fibroscan® und GOT und Fibroscan®. Ein signifikanter negativer Zusammenhang ergab sich auf dem Niveau von $<0,021$ (2-seitig) zwischen Albumin und Fibroscan®-Wert. Ein stark signifikanter negativer Zusammenhang auf dem Niveau von $<0,008$ (2-seitig) bestand zwischen Fibroscan® und Quick und auf dem Niveau von $<0,002$ (2-seitig) zwischen Fibroscan® und Thrombozyten.

Das Alter, Bilirubin, der BMI, Transferrinsättigung, Alpha-Fetoprotein und die Kupferparameter Coeruloplasmin und Kupferausscheidung im 24-Stunden-Urin korrelierten nicht mit den Ergebnissen der Fibroscan®-Untersuchungen.

Interessant ist der signifikante Zusammenhang zwischen Ferritin und dem Fibroscan®-Wert. Die restlichen Zusammenhänge dürften bekannt sein. Hierzu soll auf eine koreanische Studie aufmerksam gemacht werden, in der bei Patienten mit nicht-alkoholischer Steatohepatitis untersucht wurde, ob Serum-Eisen-Parameter

und hepatische Eisenablagerung unabhängige Prädiktoren für Leberschäden wie Leberfibrose oder Inflammation sind. Dazu wurden die Laborparameter und Histologien von 39 Patienten mit nicht-alkoholischer Steatohepatitis untersucht. Es ergab sich, dass das Serumferritin mit hepatischer Inflammation und Fibrose assoziiert war. Multivariante Analysen konnten das Serumferritin jedoch nicht als unabhängigen Prädiktor für Leberschäden identifizieren (Moon JH et al., 2006). In der koreanischen Studie wurde somit zwar ebenso wie in der vorliegenden Arbeit ein signifikanter Zusammenhang zwischen Ferritin und Fibrose festgestellt, jedoch konnte Ferritin nicht als unabhängiger Prädiktor für einen Leberschaden herausgestellt werden. Auch in dieser Arbeit konnte nicht eindeutig gezeigt werden, dass Ferritin ein Prädiktor für einen Leberschaden ist. Zwar korrelierten, wie in diesem Abschnitt gezeigt werden konnte, die erhöhten Ferritinwerte mit erhöhten Fibroscan®-Werten, im vorhergehenden Abschnitt dieser Arbeit stellte sich jedoch heraus, dass bei Patienten, die einen Fibroscan®-Wert >13 kPa und damit definitionsgemäß eine Leberzirrhose haben, der Ferritin-Wert nicht erhöht war. Einen Erklärungsansatz für den Zusammenhang zwischen erhöhten Ferritinspiegeln und dem Vorhandensein eines Leberschadens liefert die Studie von Tan et al. Hier konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer chronischen Lebererkrankung signifikant reduzierte Hepcidin-Level im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe haben. Die niedrigsten Hepcidin-Level fanden sich dabei bei Patienten mit Leberzirrhose. Das Verhältnis von Hepcidin zu Ferritin war signifikant niedriger bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen im Vergleich zur Kontrollgruppe und nahm ab mit der Zunahme des Stadiums der Fibrose und der Siderose. Das Verhältnis von Hepcidin zu Ferritin war assoziiert mit der Progression der Fibrose (Tan TC et al., 2012). Der in dieser Arbeit festgestellte signifikante Zusammenhang zwischen Ferritin und Fibroscan®-Wert kann also womöglich dadurch erklärt werden, dass bei fortschreitendem Leberschaden die Hepcidin-Level sinken, was zu einer vermehrten Eisenresorption aus den Enterozyten führt. Somit steigen der Eisengehalt im Serum und somit konsekutiv auch der Ferritinspiegel.

4.5 Assoziation von histologisch gesicherter Leberzirrhose mit Leberwerten, Eisenparametern und Lebersteifigkeit

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht wie sich Ferritin, Transferrinsättigung, ALT, AST, Gamma-GT, alkalische Phosphatase, Bilirubin, Coeruloplasmin, Kupfer im Urin (mg/l) und die Lebersteifigkeit, gemessen mittels transientser Elastographie, unterscheiden bei Patienten, bei denen eine Leberhistologie mit Nachweis einer Leberzirrhose vorlag, im Vergleich zu den Patienten, bei denen histologisch keine Leberzirrhose vorlag. Es bleibt kritisch anzumerken, dass die Histologien oft sehr alt waren und daher nicht zwingend mit aktuellen Laborwerten korrelieren müssen.

Leider war der Anteil der Patienten, bei denen überhaupt eine Leberhistologie vorlag sehr gering. Nur bei 15 Patienten lag eine Histologie vor, wovon fünf laut Histologie eine Zirrhose aufwiesen. Dies entspricht einer Zirrhoserate von 33%. In einer Studie von Gheorghe mit 55 Patienten mit Morbus Wilson wurde bei 19 Patienten eine Leberbiopsie durchgeführt. Dabei ergab sich, dass vier dieser Patienten eine Leberzirrhose hatten, was 21% entsprach (Gheorghe L et al., 2004). Der in dieser Arbeit ermittelte Anteil der Zirrhosepatienten unter den Wilson-Patienten liegt also über dem in der Studie von Gheorghe histologisch ermittelten Anteil an Zirrhosepatienten. Es bleibt jedoch zu überlegen, ob ggf. die Patienten, bei denen eine gravierendere Leberbeteiligung angenommen wurde, eher einer Leberbiopsie unterzogen wurden als die restlichen Patienten. Hierdurch könnte der mit 33% relativ hohe Anteil der Zirrhotiker erklärt werden.

In vorhergehenden Abschnitten dieser Arbeit wurde bereits darauf eingegangen, wie sich bestimmte Blutparameter unterscheiden bei Patienten, die nach dem Ergebnis der Messung der Lebersteifigkeit mittels transientser Elastographie eine Leberzirrhose haben im Vergleich zu denen, die nach dem Ergebnis dieser Untersuchung keine Leberzirrhose haben. Diese Korrelationen sind sicher als valider anzusehen, da die Messung der transienten Elastographie am selben Tag vorgenommen wurde wie die Blutabnahme.

In der aktuellen Arbeit ergab sich ein Mittelwert der Lebersteifigkeit unter den Patienten, die eine histologisch gesicherte Leberzirrhose haben, von 22,8 kPa. Der Mittelwert der Lebersteifigkeit unter den Patienten, die histologisch lediglich ein Fibrosestadium null bis drei aufwiesen und somit keine Zirrhose hatten, betrug 8,4 kPa. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied der Lebersteifigkeit bei den Patienten mit histologisch nachgewiesener Leberzirrhose im Vergleich zu den Patienten ohne Leberzirrhose. Dies ist erstaunlich, erklärt sich aber möglicherweise durch die teils sehr alten Leberhistologien und vor allem durch die sehr geringe Zahl der Patienten, die histologisch eine Leberzirrhose aufwiesen (n=5). Zudem ist die Standardabweichung mit 29,4 sehr hoch, was sich dadurch erklärt, dass es einen Patienten mit histologisch gesicherter Leberzirrhose gibt, der eine Lebersteifigkeit von 75 kPa aufweist.

In einer Veröffentlichung von Sebastiani werden indirekte Serummarker für Leberfibrose benannt: Thrombozytenzahl, AST, ALT, Gamma-GT, Gamma-Globuline, Albumin und Prothrombinzeit (Sebastiani G, 2009). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Parameter AST, ALT und Gamma-GT waren bei den Patienten, bei denen sich histologisch eine Leberzirrhose zeigte, nicht höher als bei den Patienten, bei denen histologisch keine Leberzirrhose festgestellt wurde. Die Ergebnisse von Sebastiani decken sich also nicht mit der vorliegenden Arbeit.

In einer Studie von Morais wurden Serummarker mit dem Grad der Fibrose und nekroinflammatorischen Aktivität bei Hepatitis C-Patienten und Patienten mit Schistosomiasis korreliert. Aufgrund der größeren Bedeutung in Europa soll hier lediglich auf den Vergleich der vorliegenden Arbeit mit den Hepatitis C-Patienten aus der Studie von Morais eingegangen werden. Hier ergab sich für die alkalische Phosphatase eine statistisch signifikante *area under the curve* (AUC) für die Fähigkeit eine milde oder schwere Fibrose voraus zu sagen ($p=0,005$). Für die alkalische Phosphatase ergab sich mit 69,57% ein relativ hoher positiver Vorhersagewert (de Morais CN et al., 2010). Das Ergebnis der Studie von Morais stimmt also nicht überein mit dem Ergebnis der vorliegenden Arbeit, in der bei Patienten mit Leberzirrhose keine signifikant höheren AP-Werte gefunden wurden, als bei Patienten ohne Leberzirrhose.

In der vorliegenden Arbeit ergab sich kein signifikanter Unterschied in den Bilirubin-Spiegeln bei Patienten mit histologisch gesicherter Leberzirrhose und solchen, die laut Leberhistologie nicht unter einer Leberzirrhose leiden. Dieser Aspekt verhält sich diskrepanz zu Fibrotest und den Child-Pugh-Kriterien. Unter den serologischen Fibrosetests ist der Fibrotest der bekannteste und in Europa derzeit am meisten verwendete Fibrosetest (Fierbinteanu-Braticevici C et al., 2010). Er wurde in vorhergehenden Teilen dieser Arbeit bereits beschrieben und bezieht Bilirubin mit ein, um den fibrotischen Umbau der Leber nicht-invasiv einschätzen zu können. Auch in den Child-Pugh-Kriterien spielt die Höhe des Bilirubinspiegels eine bedeutende Rolle. Der Bilirubinspiegel ist hier eines von fünf Kriterien, um eine Stadieneinteilung bei Leberzirrhose vorzunehmen. Dadurch, dass die Höhe des Bilirubinspiegels in diesen beiden klinisch etablierten Scores eine wichtige Rolle einnimmt, ist ersichtlich, dass der nicht signifikante Unterschied des Bilirubinspiegels bei Patienten mit und ohne histologisch gesicherte Leberzirrhose kritisch zu sehen ist.

Zur Transferrinsättigung lassen sich in der Literatur keine Informationen über Unterschiede zwischen Patienten mit und Patienten ohne histologisch gesicherte Leberzirrhose finden, zumindest dann nicht, wenn nicht zusätzlich eine Hämochromatose vorliegt.

In der aktuellen Arbeit ergab sich auch für Ferritin kein signifikanter Unterschied bei Patienten mit und Patienten ohne histologisch gesicherte Leberzirrhose. Dies deckt sich damit, dass sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied hinsichtlich Ferritin bei Patienten, die einen Fibroscan®-Wert $>13\text{kPa}$ aufwiesen, im Vergleich zu den Patienten, die einen Fibroscan®-Wert $<13\text{kPa}$ aufwiesen, ergab. Andererseits ergab sich für Ferritin und Lebersteifigkeit, ermittelt durch transiente Elastographie, ein signifikanter Zusammenhang. Dieser Aspekt wurde bereits in vorhergehenden Abschnitten dieser Arbeit diskutiert. In diesem Zusammenhang soll nochmals auf die bereits zuvor erwähnte Studie von Tan et al. verwiesen werden, in der gezeigt wurde, dass Patienten mit einem chronischen Leberschaden signifikant reduzierte Hcpidin-Level aufweisen im Vergleich zu Gesunden, woraus eine vermehrte Eisenresorption aus den Enterozyten mit ansteigendem Serumeisen

und konsekutiv auch ansteigendem Ferritinspiegel resultiert (Tan TC et al., 2012). Es gäbe also durchaus eine Rationale für erhöhte Ferritinspiegel bei Patienten mit fortgeschrittenem Leberschaden, welche hier aber nicht gezeigt werden konnte. Hingegen wurden in einer Studie von Moon Laborparameter und Leberhistologien untersucht. Es ergab sich, dass das Serumferritin mit hepatischer Inflammation und Fibrose assoziiert war. Multivariate Analysen konnten das Serumferritin jedoch nicht als unabhängigen Prädiktor für Leberschäden identifizieren (Moon JH et al., 2006). Hierdurch würde das Ergebnis der vorliegenden Arbeit, dass ein erhöhter Ferritinwert nicht als Prädiktor für fortgeschrittenen Leberschaden dient, gestützt, es muss jedoch bedacht werden, dass in der Studie von Moon der Zusammenhang zwischen Ferritin und Fibrose und nicht zwischen Ferritin und Zirrhose untersucht wurde. Somit ist eine Vergleichbarkeit zur aktuellen Arbeit nicht zwingend gegeben.

Bezüglich Kupfer im Urin (mg/l) ergaben sich in der vorliegenden Arbeit ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit und Patienten ohne histologisch gesicherte Leberzirrhose. Eigentlich könnte man annehmen, dass bei Patienten mit histologisch gesicherter Leberzirrhose von einer höheren Krankheitsaktivität auszugehen ist und deshalb, wie bei Patienten mit Morbus Wilson üblich (Brůha R et al., 2009), die 24-Stunden-Kupferausscheidung höher sein müsste. Dazu ist anzumerken, dass alle Patienten der aktuellen Studie zum Zeitpunkt der Erhebung der 24-Stunden-Kupferausscheidung unter Therapie standen und entkupfert waren. D.h., dass bei diesen Patienten die 24-Stunden-Kupferausscheidung gering ist. Die Leberbiopsie wurde bei den Patienten z.T. vor Jahren durchgeführt, um die Diagnose zu sichern. Zum Zeitpunkt der Leberbiopsie stand also das Gros der Patienten noch nicht unter Therapie und ein Vergleich des Kupfers im Urin zwischen den Patienten mit und denen ohne histologisch gesicherte Leberzirrhose wäre zu diesem Zeitpunkt sicherlich interessanter und sinnvoller gewesen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse dieser Arbeit sich diskrepant verhalten zu den Ergebnissen, welche sich bei der Literaturrecherche ergaben. In der vorliegenden Arbeit waren Ferritin, Transferrinsättigung, ALT, AST,

Gamma-GT, alkalische Phosphatase, Coeruloplasmin, Bilirubin und Kupfer im Urin bei den Patienten mit histologisch gesicherter Leberzirrhose nicht signifikant höher als bei solchen ohne Leberzirrhose. Dies war jedoch auch zu erwarten, da zwischen Leberpunktion und Erhebung der Laborparameter z.T. Jahre lagen, in denen die Patienten Therapien erhalten haben. Somit ist eine Korrelation der Laborparameter mit den Ergebnissen der Histologie ohnehin schwierig. Ein weiterer Kritikpunkt ist sicherlich die mit $n=15$ recht geringe Fallzahl der Patienten, die überhaupt eine Leberpunktion erhalten haben. Eine erneute Leberpunktion bzw. erstmalige Punktion von Patienten, deren Krankheitsaktivität zum Zeitpunkt der Studie größtenteils gut kontrolliert war, wäre ethisch sicher nicht vertretbar gewesen. Interessant ist, dass die Lebersteifigkeit, welche durch transiente Elastographie ermittelt wurde, unter den Zirrhotikern nicht signifikant erhöht war im Vergleich zu den Nicht-Zirrhotikern, wobei auch hier nochmals auf die geringe Patientenzahl mit histologischer Zirrhose ($n=5$) und die hohe Standardabweichung hingewiesen werden muss.

4.6 Assoziation von Eisenparametern mit HFE-Genmutationen und Coeruloplasmin

Es gibt zahlreiche Interaktionen zwischen dem Eisen- und Kupferstoffwechsel. Das Ziel der aktuellen Studie war die Prävalenz und die klinische Relevanz von HFE-Genmutationen bei Patienten mit Morbus Wilson zu untersuchen und in Bezug zu den Eisenparametern zu setzen (Erhardt A et al., 2002). Ebenso wurden die Coeruloplasminwerte in Bezug gesetzt zu Eisenparametern und Leberwerten. Hinweise darauf, dass HFE-Genmutationen bei Patienten mit Morbus Wilson einen Komorbiditätsfaktor darstellen könnten, ergaben sich daraus, dass es Berichte über eine exzessive Eisenüberladung und eine schwere dekompensierte Leberzirrhose bei einer jungen Frau mit Morbus Wilson gibt, die heterozygot für Hämochromatose war (Hafkemeyer P et al., 1994). Bei Patienten mit Porphyria cutanea tarda stellte sich die HFE-Heterozygotie als Komorbiditätsfaktor heraus (Sampietro M et al., 1998).

In der aktuellen Studie zeigte sich, dass sich bei Patienten mit Morbus Wilson häufiger erhöhte Ferritinspiegel finden. Selbst bei Patienten mit Morbus Wilson, die einen HFE-Wildtyp aufweisen, sind die Ferritinspiegel signifikant höher als in der Kontrollgruppe mit HFE-Wildtyp. Die Transferrinsättigung scheint dagegen kein geeigneter Parameter zu sein, um die Eisenüberladung bei Morbus Wilson fest zu stellen.

HFE-Genmutationen scheinen kein Komorbiditätsfaktor bei Patienten mit Morbus Wilson, bei denen die Krankheit gut kontrolliert ist, zu sein. Es gab keine signifikanten Unterschiede der Frequenz von HFE-Genmutationen zwischen Patienten mit Morbus Wilson und der Kontrollgruppe. HFE-Genmutationen erklären also kaum die erhöhten Ferritinspiegel bei den Wilson-Patienten. Folglich sind die unterschiedlichen Ferritinlevel bei Patienten mit Morbus Wilson und der Kontrollgruppe eher dem Morbus Wilson an sich zuzurechnen als den HFE-Genmutationen.

Die hohen Ferritinspiegel könnten zu der Hypothese passen, dass niedrige Coeruloplasminspiegel oder eine verminderte Coeruloplasminaktivität beim Morbus Wilson zu Eisenakkumulation führen könnten, da Coeruloplasmin für die Eisenausscheidung benötigt wird (Mukhopadhyay C et al., 1998). Auch die Therapie mit einem Kupfer-Chelatbildner senkt die Coeruloplasminfunktion noch weiter, da sie die Aufnahme von Kupfer in Kupferproteine unterdrückt (Erhardt A et al., 2002). Bereits früher konnte ein Effekt der Kupfer-depletierenden Therapie auf die Eisenakkumulation gezeigt werden (Shiono et al., 2001). Auch die Patienten der aktuellen Studie standen unter Kupfer-depletierender Therapie.

Die Eisenausscheidung aus der Leber ist angewiesen auf Ferroportin und die Ferroxidaseaktivität von Coeruloplasmin, welches sich im Blut in löslicher Form befindet (Vashchenko G und MacGillivray RT, 2013). Ferroportin ist hierbei ein Hepcidin-regulierter Eisenabflusskanal (Ganz T, 2007). Coeruloplasmin ist ebenso wie Hephaestin eine Multi-Kupfer-Oxidase (Vashchenko G und MacGillivray RT, 2013). Die Hauptaufgabe von Coeruloplasmin ist die Oxidation von Fe^{2+} zu Fe^{3+} , ein Vorgang, welcher für die Bindung von Eisen an Transferrin (das Haupteisentransportprotein) und Ferritin (das Haupteisenspeicherprotein) essentiell ist. Die Funktion des Hephaestin als Ferroxidase ist essentiell für die Bindung von Eisen an

Apotransferrin in der *Lamina propria* der intestinalen Mukosa (Wierzbicka D und Gromadzka G, 2014). Im Enterozyten kann Eisen entweder in Ferritin gespeichert werden oder zur basolateralen Membran wandern, wo es durch Ferroportin (Ireg1) aus dem Enterozyten heraus transportiert wird. Anschließend wird Fe^{2+} durch Hephaestin reoxidiert zu Fe^{3+} und dann von Transferrin aufgenommen, welches das Eisen an die Gewebe verteilt (Ganz T und Nemeth E, 2012). Man könnte also davon ausgehen, dass die Patienten, die ein niedriges Coeruloplasmin haben, auch höhere Ferritinspiegel aufweisen, da postuliert werden könnte, dass die Patienten, die ein niedriges Coeruloplasmin haben, auch weniger Hephaestin haben – schließlich sind beide Kupfer-abhängige Ferroxidasen. Bei einer geringeren Hephaestin-Aktivität könnte Fe^{2+} weniger zu Fe^{3+} reoxidiert werden. Folglich wäre anzunehmen, dass Eisen in den Enterozyten vermehrt in Ferritin gespeichert wird. Auch durch die verminderte Coeruloplasminaktivität selbst würden die Ferritinspiegel steigen, da Eisen vermehrt in zytoplasmatischem Ferritin in Hepatozyten gespeichert würde. Sowohl das niedrige Coeruloplasmin selbst als auch die vermutlich ebenfalls erniedrigte Hephaestinaktivität könnten also zu höheren Ferritinspiegeln bei Patienten mit Morbus Wilson führen, die ein niedriges Coeruloplasmin aufweisen.

Diese Hypothese bestätigt sich in der vorliegenden Studie jedoch nicht, da Patienten mit niedrigem Coeruloplasmin keine signifikant höheren Ferritinspiegel aufweisen, als Patienten mit normalem Coeruloplasmin. Es zeigt sich dennoch ein nicht signifikanter Trend zu höheren Ferritinspiegeln bei Patienten mit niedrigem Coeruloplasmin im Vergleich zu Patienten mit normalem Coeruloplasminspiegel. Möglicherweise ist die Patientenzahl mit 75 Patienten auch zu gering und bei einer höheren Patientenzahl würde sich eventuell nicht nur ein Trend zeigen, sondern bei erniedrigtem Coeruloplasmin möglicherweise auch ein erhöhter Ferritinspiegel. Es wurde kein Effekt von HFE-Genmutationen auf die Eisenparameter Ferritin und Transferrinsättigung bei Patienten mit Morbus Wilson im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet. Dass keine Effekte einer HFE-Genmutation beobachtet werden konnten, ist jedoch nicht verwunderlich, da HFE-Heterozygotie meistens nicht zu phänotypisch in Erscheinung tretender Hämochromatose führt (Erhardt A et al.,

2002). Selbst bei C282Y-Homozygotie scheint die Penetranz eines Hämochromatose-Phänotyps sehr gering zu sein (Beutler E et al., 2002).

Die aktuelle Studie ist eine Erweiterung einer Studie, die 2002 an der Universitätsklinik Düsseldorf abgeschlossen wurde. Damals wurde die Prävalenz und Signifikanz von Mutationen der Allele C282Y und H63D bei 40, nicht miteinander verwandten Patienten, untersucht. Das Ergebnis war, dass sich die Frequenz der Mutationen in den Allelen C282Y (11,3% vs. 6,2%) und H63D (18,8% vs. 16,4%) zwischen Patienten mit Morbus Wilson und der Kontrollgruppe nicht signifikant unterschied (Erhardt A et al., 2002). Damals wurde angeregt ein größeres Patientenkollektiv zu untersuchen, um HFE-Genmutationen als Komorbiditätsfaktor bei Patienten mit Morbus Wilson auszuschließen. Durch die aktuelle Studie, die das Patientenkollektiv auf 73 erweiterte, konnten die 2002 gewonnenen Erkenntnisse bestätigt werden: Es scheint keine signifikanten Unterschiede in der Frequenz von HFE-Genmutationen bei Patienten mit Morbus Wilson und der Kontrollgruppe zu geben. Der damals erhobene Verdacht, dass die erhöhten Ferritinspiegel, die bei Wilson-Patienten gefunden werden können, durch die verminderten Coeruloplasminspiegel bzw. die verminderte Aktivität des Coeruloplasmins hervorgerufen werden, da Coeruloplasmin für die Eisenausscheidung erforderlich ist, konnte in der aktuellen Studie so nicht bestätigt werden. Es zeigte sich zwar ein dahin gehender Trend, welcher jedoch nicht signifikant war.

In der aktuellen Studie wurden zusätzlich die Allele S65C und E168X des HFE-Gens auf Mutationen hin untersucht. Es konnte bei keinem Patienten weder eine homozygote noch eine heterozygote Mutation gefunden werden. Folglich scheinen auch diese Mutationen bei Patienten mit Morbus Wilson nicht häufiger vorzukommen als in der Normalbevölkerung.

Wenn die höheren Ferritinspiegel bei Patienten mit Morbus Wilson weder durch Unterschiede in der Frequenz von HFE-Genmutationen zwischen Patienten mit Morbus Wilson und der Kontrollgruppe noch durch niedrigere Coeruloplasmin- bzw. Hephaestinaktivität erklärt werden können, dann stellt sich die Frage, was dann für die höheren Ferritinspiegel bei den Patienten mit Morbus Wilson verantwortlich ist. Hierfür muss man auf die entscheidende Rolle des Hpcidins im

Eisenstoffwechsel zurückkommen: Ein erniedrigtes Hepcidin führt zu Gewebe-Eisenüberladung (Nemeth E et al., 2004). Dies erklärt sich dadurch, dass in den Zellen, die Ferroportin exprimieren, Hepcidin einen konzentrationsabhängigen inhibitorischen Effekt auf den Eisenexport hat (Ganz T, 2007). Hepatozyten haben sich herausgestellt als die Hauptproduzenten des Eisen-Regulator-Proteins Hepcidin (Ganz T und Nemeth E, 2012). In einer Studie von Tan et al. konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer chronischen Lebererkrankung signifikant reduzierte Hepcidin-Level im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe haben. Die niedrigsten Hepcidin-Level fanden sich bei Patienten mit Leberzirrhose. Das Verhältnis von Hepcidin zu Ferritin war signifikant niedriger bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen im Vergleich zur Kontrollgruppe und nahm ab mit der Zunahme des Stadiums der Fibrose und der Siderose. Das Verhältnis von Hepcidin zu Ferritin war assoziiert mit der Progression der Fibrose (Tan TC et al., 2012). Auch die Patienten mit Morbus Wilson leiden unter einem teils fortgeschrittenen Leberschaden. In dieser Arbeit wurde dem entsprechend ein signifikanter Zusammenhang zwischen Ferritin und dem Ergebnis der Fibroscan®-Untersuchung festgestellt, auch wenn sich dieser Zusammenhang nicht zeigte bei Patienten mit einem Fibroscan-Wert $>13\text{kPa}$, was definitionsgemäß dem Vorliegen einer Leberzirrhose entspricht. Es ist dennoch davon auszugehen, dass die Patienten, die unter einem fortgeschrittenen Leberschaden leiden, eine geringere Hepcidinproduktion aufweisen. Dies wiederum führt zu einer vermehrten Eisenaufnahme aus den Enterozyten und somit konsekutiv zu einer Eisenüberladung mit Anstieg des Ferritins.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In der aktuellen Studie wurden 56 Patienten mit gesichertem Morbus Wilson einer Messung der Lebersteifigkeit mittels transienter Elastographie unterzogen. Es ergab sich bei 17,9% der Patienten mit Morbus Wilson eine Lebersteifigkeit von über 13 kPa, so dass nach dieser Untersuchung bei ihnen vom Vorliegen einer Leberzirrhose ausgegangen werden kann. Im Mittel lag die Lebersteifigkeit bei 11,1 kPa. Histologisch ergab sich eine Zirrhoserate von 33%.

Bei den durchgeführten Folgeuntersuchungen zeigte sich in den zeitlichen Intervallen von ein bis drei, vier bis sechs, sieben bis neun, zehn bis zwölf, 13 bis 15 und 16 bis 18 Monaten im Vergleich zur Erstuntersuchung kein Progress.

Es wurde weiterhin untersucht, ob sich Unterschiede des Alters, des BMI und der Laborparameter bei Patienten mit Leberzirrhose, welche durch Messung der Lebersteifigkeit ermittelt wurde, ergeben. Signifikante Zusammenhänge ergaben sich zwischen dem Vorhandensein einer Leberzirrhose und alkalischer Phosphatase, Thrombozyten und Gamma-GT, wobei es sich bei den Thrombozyten um einen negativen Zusammenhang handelt. Anders als bei der bivariaten Korrelation zwischen Ferritin und Fibroscan®-Untersuchung ergab sich hier kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein einer Leberzirrhose und Ferritin.

Die Arbeit beschäftigte sich auch mit den Unterschieden zwischen Wilson-Patienten mit histologisch gesicherter Leberzirrhose und solchen ohne Leberzirrhose. Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen Vorhandensein einer Leberzirrhose in der Histologie und Ferritin, Transferrinsättigung, ALT, AST, Gamma-GT, AP, Bilirubin, Kupfer im Urin und Coeruloplasmin. Die Steifigkeit der Leber betrug bei den Patienten mit histologisch gesicherter Leberzirrhose 22,8 kPa im Vergleich zu 8,4 kPa bei den Nicht-Zirrhotikern. Dieser Unterschied ist nicht signifikant.

Ein weiterer Aspekt der vorgestellten Arbeit war die Untersuchung der Prävalenz und der klinischen Relevanz von HFE-Genmutationen (n=73 für die Allele C282Y und H63D, n=51 für das Allel S65C, n=49 für das Allel E168X) bei Patienten mit

Morbus Wilson und die Herstellung eines Bezuges zu den Eisenparametern. Ebenfalls wurden die Coeruloplasminwerte in Bezug gesetzt mit Eisenparametern und Leberwerten. Es zeigte sich, dass bei Patienten mit Morbus Wilson ein erhöhter Ferritinspiegel im Vergleich zur Normalbevölkerung festgestellt werden kann. Gleichzeitige heterozygote Mutationen auf den Allelen C282Y oder H63D scheinen keinen Einfluss auf Eisenparameter bei gut behandelten Patienten mit Morbus Wilson zu haben. Die These, dass die erhöhten Ferritinspiegel hervorgerufen werden durch einen verminderten Coeruloplasminspiegel bzw. eine verminderte Aktivität des Coeruloplasmins und vermutlich auch des Hephaestins, wodurch bedingt Eisen in den Enterozyten und Hepatozyten vermehrt in zytoplasmatischem Ferritin gespeichert würde, konnte nicht durch eine statistische Signifikanz bewiesen werden.

Bei keinem Patienten mit Morbus Wilson konnte eine heterozygote oder eine homozygote Mutation auf den Allelen S65C und E168X des HFE-Gens nachgewiesen werden.

6 LITERATUR UND QUELLENVERZEICHNIS

Bamber J, Cosgrove D, Dietrich CF, Fromageau J, Bojunga J, Calliada F, Cantisani V, Correas J-M, D'Onofrio M, Drakonaki EE, Fink M, Friedrich-Rust M, Gilja OH, Havre RF, Jenssen C, Klauser AS, Ohlinger R, Saftoiu A, Schaefer F, Sporea I, Piscaglia F. EFSUMB Guidelines and Recommendations on the Clinical Use of Ultrasound Elastography. Part 1: Basic Principles and Technology. *Ultraschall in Med* 2013; 34: 169–184.

Bedossa P, Dargère D, Paradis V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38: 1449-1457.

Beutler E, Felitti V J, Koziol J A, Ho N J, Gelbart T. Penetrance of 845G→A (C282Y) HFE hereditary haemochromatosis mutation in the USA. *Lancet* 2002; 359: 211-218.

Böhm M, Bokemeyer C, Hörl W, Kruis W. Funktioneller Eisenmangel bei chronischen Erkrankungen. *Beilage in Zeitschrift für Rheumatologie* 2011; 70: 1-7.

Brewer GJ. Ein Ratgeber für Patienten und deren Angehörige zu Morbus Wilson und Kupferfragen. Books on Demand GmbH, Norderstedt 2006.

Brůha R, Marecek Z, Martásek P, Nevsímalová S, Petráč J, Urbánek P, Kalistová H, Pospíšilová L. Wilson's disease. *Cas Lek Cesk* 2009; 148: 544-548.

Cobbold JFL, Morin S, Taylor-Robinson SD. Transient elastography for the assessment of chronic liver disease: Ready for the clinic? *World J Gastroenterol* 2007; 13: 4791-4797.

Cope-Yokoyama S, Finegold MJ, Sturniolo GC, Kim K, Mescoli C, Rugge M, Medici V. Wilson disease: histopathological correlations with treatment on follow-up liver biopsies. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 1487-1494.

Cosgrove D, Piscaglia F, Bamber J, Bojunga J, Correas JM, Gilja OH, Klauser AS, Sporea I, Calliada F, Cantisani V, D'Onofrio M, Drakonaki EE, Fink M, Friedrich-Rust M, Fromageau J, Havre RF, Jenssen C, Ohlinger R, Săftoiu A, Schaefer F,

Dietrich CF. EFSUMB Guidelines and Recommendations on the Clinical Use of Ultrasound Elastography. Part 2: Clinical Applications. *Ultraschall in Med* **2013**; **34**: 238–253.

Del Poggio P, Colombo S. Is transient elastography a useful tool for screening liver disease? *World J Gastroenterol* **2009**; **15**: 1409-1414.

Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer PJ. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology*. **1994**; **19**: 1513-1520.

Erhardt A, Hoffmann A, Hefter H, Häussinger D. HFE gene mutations and iron metabolism in Wilson's disease. *Liver* **2002**; **22**: 474-478.

Erhardt A, Lörke J, Vogt C, Poremba C, Willers R, Sagir A, Häussinger D. Transiente Elastographie zur Diagnose der Leberzirrhose. *Dtsch Med Wochenschr* **2006**; **131**: 2765-2769.

Erhardt A, Maschner-Olberg A, Mellenthin C, Osman Y, Kappert G, Adams O, Donner A, Willers R, Niederau C, Häussinger D. HFE mutations and chronic hepatitis C: H63D and C282Y heterozygosity are independent risk factors for liver cirrhosis. *J Hepatol* **2003**; **38**: 335-342.

Ferenci P, Steindl-Munda P, Vogel W, Jessner W, Gschwantler M, Stauber R, Datz C, Hackl F, Wrba F, Bauer P, Lorenz O. Diagnostic Value of Quantitative Hepatic Copper Determination in Patients With Wilson's Disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **2005**; **3**: 811-818.

Fierbinteanu-Braticevici C, Dina I, Petrisor A, Tribus L, Negreanu L, Carstoiu C. Noninvasive investigations for non alcoholic fatty liver disease and liver fibrosis. *World J Gastroenterol* **2010**; **16**: 4784-4791.

Forns X, Ampurdanès S, Llovet JM, Aponte J, Quintó L, Martínez-Bauer E, Bru-guera M, Sánchez-Tapias JM, Rodés J. Identification of chronic hepatitis C pa-

tients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology* **2002**; 36: 986-992.

Freitag C. Untersuchungen zu orofacialen und Extremitätenbewegungen bei Morbus Wilson. Dissertation. Düsseldorf **2003**.

Friedrich-Rust M, Mei-Fang O, Martens S, Sarrazin C, Bojunga J, Zeuzem S, Herrmann E. Performance of Transient Elastography for the Staging of Liver Fibrosis: A Meta-Analysis. *Gastroenterol* **2008**; 134: 960–974.

Ganz T. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood* **2003**; 102: 783-788.

Ganz T. Molecular control of iron transport. *J Am Soc Nephrol* **2007**; 18: 394-400.

Ganz T, Nemeth E. Hepcidin and iron homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2012**; 1823: 1434–1443.

Gheorghe L, Popescu I, Iacob S, Gheorghe C, Vaidan R, Constantinescu A, Iacob R, Becheanu G, Angelescu C, Diculescu M. Wilson's Disease: a challenge of diagnosis. The 5-year experience of a tertiary centre. *Rom J Gastroenterol* **2004**; 13: 179-185.

Hafkemeyer P, Schupp M, Storch M, Gerok W, Häussinger D. Excessive iron storage in a patient with Wilson's disease. *Clin Invest* **1994**; 72: 134-136.

Hahn U, Schwarz J, Gratz S, Kaiser JW, Jarnig M, Förstl H. Morphologische Magnetresonanz-Tomographie: Ihre Wertigkeit bei der Diagnose neurodegenerativer Erkrankungen. *Dtsch Med Wochenschr* **2008**; 133: 15-18.

Halangk J, Witt H, Puhl G, Gäbelein G, Müller T, Landt O, Neuhaus P, Wiedemann B, Luck W, Berg T. Evaluation von Mutationen im HFE-Gen als genetischer Risikofaktor für die Progression bei chronischer Hepatitis C Virus (HCV) Infektion. *Z Gastroenterol* **2005**; 43: 4-14.

Hastka J, Heimpel H, Metzgeroth G. DGHO-Leitlinie Eisenmangel und Eisenmangelanämie.

<https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/eisenmangel-und-eisenmangelanaemie/@@view/html/index.html#ID0EIH> (abgerufen am 29.11.16)

Hüppe D, Mauss S. Nichtinvasive Bestimmung des Fibrosegrades der Leber durch Elastographiemessung mittels Fibroscan® – eine Alternative zur Leberpunktion? *Ärzteblatt Thüringen* **2009**; 2: 98-101.

Huster D. Untersuchungen zur Funktion, Regulation und Pathophysiologie des Kupfertransportproteins ATP7B (Morbus Wilson Protein). Habilitation. Leipzig **2006**.

Huster D, Kühn HJ, Mössner J, Caca K. Morbus Wilson. *Internist* **2005**; 46: 731-740.

Kim BE, Nevitt T, Thiele DJ. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nature Chemical Biology* **2008**; 4: 176-185.

Leong WI, Lönnerdal B. Hepcidin, the Recently Identified Peptide that Appears to Regulate Iron Absorption. *J Nutr* **2004**; 134: 1-4.

Li LF, Dai L, Zhang Q, Chen YP, Feng XR, Guo YB, Hou JL. Factors influencing the success rate and stability of transient elastography for liver fibrosis evaluation. *Journal of Southern Medical University* **2008**; 28: 595-597.

Lörke J, Erhardt A, Vogt C, Häussinger D. Nicht invasive Diagnostik der Leberzirrhose. *Deutsches Ärzteblatt* **2007**; 24: 1752-1757.

Lu SN, Wang JH, Liu SL, Hung CH, Chen CH, Tung HD, Chen TM, Huang WS, Lee CM, Chen CC, Changchien CS. Thrombocytopenia as a surrogate for cirrhosis and a marker for the identification of patients at high-risk for hepatocellular carcinoma. *Cancer*. **2006** Nov 1; 107(9):2212-22.

Merle U, Schaefer M, Fereci P, Stremmel W. Clinical presentation, diagnosis, and long-term outcome of Wilson's disease: a cohort study. *Gut* **2007**; 56: 115-120.

Meyerrose KW. Klinische Symptomatik, Verlauf und Therapie bei 51 Patienten mit Morbus Wilson. Dissertation. Düsseldorf 1989.

Moon JH, Park SH, Oh KC, Jung JO, Shin WG, Kim JP, Kim KO, Park CH, Hahn T, Yoo KS, Kim JH, Kim DJ, Lee MS, Park CK, Jun SY. Association of hepatic iron deposition and serum iron indices with hepatic inflammation and fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease. *Korean J Gastroenterol* 2006; 47: 432-439.

de Moraes CN, Carvalho Bde M, de Melo WG, de Melo FL, Lopes EP, Domingues AL, Jucá N, Martins JR, Diniz GT, Montenegro SM. Correlation of biological serum markers with the degree of hepatic fibrosis and necroinflammatory activity in hepatitis C and schistosomiasis patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010; 105: 460-466.

Mukhopadhyay C K, Attieh Z K, Fox P L. Role of ceruloplasmin in cellular iron uptake. *Science* 1998; 297: 714-717.

Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, Kaplan J. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to Ferroportin and inducing its internalization. *Science* 2004; 306: 2090-2093.

Pohl A, Behling C, Oliver D, Kilani M, Monson P, Hassanein T. Serum aminotransferase levels and platelet counts as predictors of degree of fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 3142-3146.

Poynard T, Munteanu M, Imbert-Bismut F, Charlotte F, Thabut D, Le Calvez S, Messous D, Thibault V, Benhamou Y, Moussalli J, Ratziu V. Prospective Analysis of Discordant Results between Biochemical Markers and Biopsy in Patients with Chronic Hepatitis C. *Clinical Chemistry* 2004; 8:1344-1355.

Sampietro M, Piperno A, Lupica L, et al. High prevalence of the His63Asp HFE mutation in Italian patients with porphyria cutanea tarda. *Hepatology* 1998; 27: 181-184.

Sebastiani G. Non-invasive assessment of liver fibrosis in chronic liver diseases: implementation in clinical practice and decisional algorithms. *World J Gastroenterol* **2009**; 15: 2190-2203.

Sharma S, Khalili K, Nguyen GC. Non-invasive diagnosis of advanced fibrosis and cirrhosis. *World J Gastroenterol* **2014**; 20: 16820–16830.

Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, Laftah AH, Takeuchi K, Halliday N, Khan Y, Warley A, McCann FE, Hider RC, Frazer DM, Anderson GJ, Vulpe CD, Simpson RJ, McKie AT. Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* **2005**; 122: 789-801.

Shiono Y, Wakusawa S, Hayashi H, et al. Iron accumulation in the liver of male patients with Wilson's disease. *Am J Gastroenterol* **2001**; 96: 3147-3151.

Sirli R, Sporea I, Tudora A, Deleanu A, Popescu A. Transient elastographic evaluation of subjects without known hepatic pathology: does age change the liver stiffness? *J Gastrointestin Liver Dis* **2009**; 18: 57-60.

Tan TC, Crawford DH, Franklin ME, Jaskowski LA, Macdonald GA, Jonsson JR, Watson MJ, Taylor PJ, Fletcher LM. The serum hepcidin:ferritin ratio is a potential biomarker for cirrhosis. *Liver Int* **2012**; 32: 1391-1399.

Vashchenko G, MacGillivray RT. Multi-copper oxidases and human iron metabolism. *Nutrients* **2013**; 5: 2289-2313.

Wierzbicka D, Gromadzka G. Ceruloplasmin, Hephaestin and zyklopen: the three multicopper oxidases important for human iron metabolism. *Postepy Hig Med Dosw* **2014**; 68: 912-924.

Wong VW, Vergniol J, Wong GL, Foucher J, Chan HL, Le Bail B, Choi PC, Kow M, Chan AW, Merrouche W, Sung JJ, de Lédinghen V. Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **2010**; 51: 454-462.

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. A. Erhardt für die gute Betreuung der Arbeit, für die freundliche und unkomplizierte Atmosphäre bei unseren Treffen und dafür, dass er stets ein offenes Ohr für mich hatte.

Ich bedanke mich weiterhin bei Herrn Prof. Dr. D. Häussinger, dem Direktor der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie an der Universitätsklinik Düsseldorf, für die Möglichkeit der Durchführung der Arbeit.

Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. H. Hefter, dem Leiter der neurologischen Spezialsprechstunde für Patienten mit Morbus Wilson, bedanken für die hervorragende Kooperation.

Auch meiner Familie möchte ich herzlich für die vielfältige Unterstützung danken, wobei hier insbesondere mein Bruder Martin zu erwähnen ist, der wertvolle Hilfeleistung bei Formatierung und Layoutgestaltung geleistet hat.

Zuletzt möchte ich mich natürlich noch bei meinem Mann Patrick bedanken für die viele Geduld, die er mir entgegen gebracht hat und für die vielen Dinge, durch die er mich entlastet hat.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

21.11.2016, Kristin Giese-Westerkamp