

Iron content of liver tissue : a biochemical, histological and clinical study, especially in hereditary haemochromatosis

Citation for published version (APA):

van Deursen, C. T. B. M. (1989). *Iron content of liver tissue : a biochemical, histological and clinical study, especially in hereditary haemochromatosis*. Rijksuniversiteit Limburg.

Document status and date:

Published: 01/01/1989

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Chapter VIII

Summary and conclusions

In conditions with increased iron stores estimation of the liver iron content is considered to be the most important parameter. The iron content can be estimated by histological examination of liver tissue after staining with Perls' blue, after which various grading systems (such as those developed by Rowe, Scheuer, Brissot, Kreeftenberg or Sindram) may be used. A more precise and accurate method is chemical measurement of the liver iron content by flameless atomic absorption spectrophotometry (FAAS).

In hereditary haemochromatosis (HH), iron is absorbed in excess of the body's needs and is stored in parenchymal organs. The body iron stores thus increase with time resulting in organ damage. If a patient with HH has been identified, his family members also need to be examined for homozygosity for HH. Since this may involve younger individuals who have not yet accumulated very large amounts of iron, it is important to have a reliable chemical method for the determination of the liver iron content.

In this thesis the results are presented of liver iron determinations by FAAS after homogenisation of the tissue specimen.

In chapter II a review of the literature is presented on the subject of hereditary haemochromatosis. The summary and conclusions are given at the end of the chapter.

In chapter III a chemical method is presented for the determination of liver iron in small tissue specimens. The tissue was homogenised and the total liver iron content was measured by FAAS. The protein content was determined by the method of Lowry. The iron content was expressed in $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein. The results of the iron measurements with this method were compared with those of the acid digestion method on 60 liver specimens. The CV_{duplo} of the method presented was 8 %, compared with 26 % for the acid digestion method.

The ferritin content and haem iron content of these liver homogenates were also determined, with respective CV_{duplo} values of 14 % and 30 %. The ferritin iron core increased with an increasing total iron content until saturation of ferritin iron appeared to be reached at 2.5 μg ferritin iron per mg liver protein.

The results of the chemical liver iron determinations were plotted against the grades of iron staining found by histological examination.

It was concluded that direct analysis of liver homogenate was more precise and accurate than analysis after sample preparation by destruction of tissue with strong acid, and that the distribution of iron in the normal liver was homogeneous. Since only very small samples are needed, this method can be applied to biopsy material.

In chapter IV the method of liver iron determination by FAAS using liver homogenates as described in chapter III, was applied to formalin-fixed, paraffin-embedded tissue and compared with the results of analysis of fresh tissue from the same specimens. The correlation between the results of the two groups was good ($r = 0.92$). It was concluded that material which had been processed routinely in the histopathological department (and stored in the archives) can be used for quantitative iron determinations for clinical or research purposes.

In chapter V the method of iron determination by FAAS using liver homogenates was applied to 15 specimens from abnormal livers, i.e. 6 with steatosis, 8 with fibrosis/cirrhosis and 1 with haemochromatosis. Because there was decreased homogeneity of the tissue the procedure was less accurate in these pathological livers, but it was concluded that it could still be considered a reliable method with satisfactory precision.

In chapter VI five different histological grading systems for iron staining, i.e. the modified Rowe system, the Scheuer system, the Brissot system, the modified Kreeftenberg system and the Sindram system, were compared. Moreover, the results were related to the tissue iron content as measured by chemical analysis by means of FAAS, using liver homogenates.

It was concluded that, for general purposes such as comparison of histological and chemical assessments of liver iron content, a simple histological grading system for staining (e.g. the modified Rowe system or the Scheuer system) was equal to any other (and more complicated) system.

Furthermore, iron determination by chemical analysis should be part of the diagnostic procedure when iron storage diseases are suspected, since there is a considerable spreading of values in each staining grade and, moreover, there is a degree of overlap of values in successive grades.

Finally, in chapter VII, a description is given of five families with hereditary haemochromatosis which have been investigated in our clinic. Family A was a large sibship of 16 persons, family B had a homozygous-heterozygous parenthood, family C-1 and C-2 were probably related, and family D consisted of young persons with relatively low serum ferritin levels. Also this parenthood was homozygous-heterozygous.

There were 13 homozygous patients, 9 males and 4 females. The age at the time of

diagnosis ranged from 33 to 67 years. The classical triad of hyperpigmentation, hepatomegaly and diabetes mellitus was only present in 1 patient. The number of patients with arthralgia was strikingly high (10 out of 13 patients). The transferrin saturation was higher than 62 % in all but one patient. The serum ferritin levels were very high, except for the members of family D.

Increased liver iron concentrations and raised hepatic iron indices could be demonstrated in all patients who underwent a liver biopsy.

HLA typing proved to be useful in determining homozygosity or heterozygosity of the subjects.

The patients were treated with phlebotomy therapy, 500 ml once a week, until the serum ferritin level had returned to normal. This treatment was tolerated well, but it did not improve the complaints about arthralgia.

By screening the family members of the index cases it has been possible to identify 7 subjects as homozygous for hereditary haemochromatosis, and to start their treatment at a younger age.

The diagnostic procedures described in this thesis have been applied successfully in this clinical study.

It should be realised that hereditary haemochromatosis is the most frequent autosomal recessive disorder. If the diagnosis is established and treatment is started early enough, it is possible, in a rather simple way, to prevent irreversible organ damage.

Hereditary haemochromatosis will then no longer be 'an orphan disease' as W.R. Bacon called it.

Samenvatting en conclusies

Wanneer de hoeveelheid ijzer in het lichaam is toegenomen, wordt de bepaling van het ijzergehalte van de lever beschouwd als de gouden standaard hiervoor.

Het ijzergehalte kan worden geschat door histochemisch onderzoek van leverweefsel met behulp van kleuring met Perls' blauw. Hierbij kan gebruik worden gemaakt van verscheidene graderingssystemen, zoals die van Rowe, Scheuer, Brissot, Kreeftenberg of Sindram.

Een nauwkeuriger methode is de meting van het ijzergehalte van de lever door middel van chemische analyse, zoals de vlamloze atoomabsorptie-spectrofotometrie.

Bij hereditaire haemochromatose wordt meer ijzer uit de darm geabsorbeerd dan het lichaam nodig heeft, en het overschot wordt in parenchymateuze organen gestapeld. Op deze manier neemt in de loop van de tijd de ijzervoorraad van het lichaam toe. Wanneer bij een patiënt de diagnose 'hereditaire haemochromatose' is gesteld, dienen zijn familieleden eveneens te worden onderzocht, teneinde homozygoten voor deze aandoening op het spoor te komen.

Dit kan betekenen, dat bij tamelijk jonge personen, die nog geen grote hoeveelheden ijzer hebben kunnen stapelen, het ijzergehalte van de lever bepaald moet worden. Het is van belang, dat de gebruikte methode ook bij een relatief geringe ijzerconcentratie een nauwkeurige en betrouwbare uitslag oplevert.

In dit proefschrift worden de resultaten gepresenteerd van leverijzerbepalingen met behulp van vlamloze atoomabsorptie- spectrofotometrie (VAAS) na homogenisering van het weefsel.

In hoofdstuk II wordt een literatuuroverzicht gegeven met betrekking tot hereditaire haemochromatose (HH).

Deze aandoening wordt gedefiniëerd als een falen van het systeem, dat de ijzerabsorptie reguleert, waardoor meer ijzer in het lichaam wordt opgenomen dan nodig is.

Onderzoeken hebben aangetoond, dat HH een erfelijke afwijking is, met een autosomaal recessieve overerving. De frekwentie van homozygotie is 2 tot 3 per 1000 en van heterozygotie 1 per 10 personen. Dit betekent, dat HH een van de meest voorkomende autosomaal recessieve aandoeningen is.

Er is een verband tussen het HH-gen en het HLA-systeem. Er bestaat een 'linkage disequilibrium' met het A3 allel. Dit allel komt in ongeveer 70 % van de haplotypen van homozygote personen voor, terwijl dit percentage voor de bevolking in het algemeen ongeveer 28 bedraagt.

Bij HH wordt teveel ijzer uit de dunne darm geabsorbeerd, ongeveer 4 - 5 gram per dag, in plaats van 1 - 2 gram. In het bloed wordt het ijzer-ion aan apotransferrine gebonden. Wanneer het transferrine volledig met ijzer verzadigd is, treft men ijzer ook aan in complexen met laag moleculair gewicht. Deze complexen worden zeer snel door de lever geklaard en dit heeft ijzerstapeling in het parenchym tot gevolg. In de hepatocyten worden de ijzer-ionen opgeslagen in ferritine-moleculen en in haemosiderine. De aanwezigheid van ijzer-ionen kan de vorming van zeer reactieve hydroxyl ionen en superoxide stimuleren. Deze kunnen aanleiding geven tot de synthese van collageen en de ontwikkeling van fibrose.

De klinische verschijnselen van HH zijn: malaise, vermoeidheid, gewichtsverlies, buikpijn, impotentie, diabetes mellitus, arthralgie, hyperpigmentatie van de huid, hepatomegalie en uitingen van cardiomyopathie.

Wat het laboratoriumonderzoek betreft: de bepaling van de transferrine-verzadiging en het ferritine-gehalte in het serum worden gebruikt, meestal gecombineerd, om een verhoogde kans op ijzerstapeling vast te stellen. Als deze bepalingen afwijkend zijn, dient een leverbiopsie te worden verricht, met chemische bepaling van het ijzergehalte en berekening van de zgn. leverijzer-index (d.w.z.: het ijzergehalte van de lever, gedeeld door de leeftijd in jaren).

Röntgenonderzoek van de aangetaste gewrichten kan verlies van gewrichtskraakbeen aantonen, met vernauwing van de gewrichtsspleet, sclerose van het subchondrale bot, vorming van osteofyten, subchondrale cysten, demineralisatie en chondrocalcinose.

In geval er een contra-indicatie bestaat voor invasief onderzoek zoals een leverbiopsie, kan een CT-scan of een NMR-scan gebruikt worden om het ijzergehalte van de lever te schatten.

Bij histopathologisch onderzoek kan men ijzerneerslagen aantreffen in parenchymateuze organen en ook in de huid, in klieren en in de mucosa van het maag-darmkanaal. In de lever kan men siderose vaststellen en de ontwikkeling van fibrose. In de latere stadia ziet men cirrhose. Bij ongeveer 20 % van de patiënten met cirrhose kan een hepatocellulair carcinoom ontstaan, zelfs nadat de overmaat aan ijzer door aderlatingen is verwijderd.

De lijst van differentiële diagnoses is tamelijk uitgebreid.

De behandeling is eenvoudig en bestaat uit aderlatingen, 500 ml per week, totdat het serum ferritine-gehalte genormaliseerd is. Na deze behandeling heeft de patiënt dezelfde prognose als normale personen, tenzij er een levercirrhose is ontstaan. De prognose is minder gunstig wanneer er orgaanbeschadiging is opgetreden, en wordt dan vooral bepaald door de aard van het lijden, bijvoorbeeld cardiomyopathie of gedecompenseerde levercirrhose.

Wanneer bij een patiënt is vastgesteld dat hij homozygoot is voor HH, dienen zijn familieleden, met name de ouders, en de broers en zusters, te worden onderzocht op verschijnselen van HH. Voor dit doel worden bepalingen van de transferrine verzadiging en van het serum ferritine-gehalte gebruikt. Zonodig kan HLA-typering aanvullende informatie verschaffen. Personen die homozygoot zijn voor HH, dienen behandeld te worden door middel van aderlatingen, teneinde hun ijzervoorraad te normaliseren en orgaanbeschadiging te voorkomen.

Aangezien HH tamelijk frekwent voorkomt en de symptomen pas duidelijk worden als er al organen zijn aangetast, hebben verscheidene onderzoekers voorgesteld om, eventueel binnen geselecteerde groepen, de bevolking te testen op de aanwezigheid van een te grote ijzervoorraad.

Bij dergelijke onderzoeken is een prevalentie van 4,5 tot 12 per 1000 personen vast-

gesteld. De kans is groot, dat op deze wijze bij een aantal personen de diagnose HH kan worden gesteld, nog voordat er irreversibele schade is opgetreden. Een tijdig ingestelde therapie zal het ontstaan daarvan kunnen voorkomen.

In hoofdstuk III wordt een chemische methode voor de bepaling van het ijzergehalte in kleine hoeveelheden leverweefsel besproken.

Het weefsel werd gehomogeniseerd en het ijzergehalte werd gemeten met behulp van vlamloze atoomabsorptie-spectrofotometrie. Het eiwitgehalte werd bepaald volgens de methode van Lowry et al. Het ijzergehalte werd uitgedrukt in $\mu\text{g}/\text{mg}$ eiwit.

De uitslagen van de ijzerbepalingen in 60 levermonsters, uitgevoerd volgens deze methode, werden vergeleken met de resultaten, verkregen volgens de methode van zure destructie van het weefsel.

De CV_{duplo} van de beschreven methode bedroeg 8 %, terwijl die van de zuur-destructie-methode 26 % was.

Het ferritine-gehalte en het haemijzergehalte van deze leverhomogenaten werden eveneens bepaald, met CV_{duplo} waarden van resp. 14 en 30 %. De verzadiging van ferritine met ijzer nam toe, naarmate het totale ijzergehalte steeg, tot ongeveer 2,5 μg ferritine-ijzer per mg levereiwit. Bij hogere concentraties ferritine-ijzer bleef de verzadiging constant.

De uitslagen van de chemische ijzerbepalingen van het leverweefsel werden uitgezet tegen de graad van ijzerkleuring bij het histochemisch onderzoek.

De conclusies uit deze onderzoeken luiden, dat de directe analyse van leverhomogenaat nauwkeuriger was dan de analyse, waarbij het levermonster met een sterk zuur werd gedestruëerd. Verder bleek de verdeling van ijzer in normale levers homogeen te zijn.

Aangezien voor de ijzerbepaling in leverhomogenaat slechts kleine hoeveelheden weefsel nodig zijn, is deze methode ook toepasbaar op biopten.

In hoofdstuk IV werd de ijzerbepaling met behulp van VAAS in gehomogeniseerd leverweefsel (zoals beschreven in hoofdstuk III) toegepast op leverweefsel, dat voor histologische bewerking in formaline was gefixeerd en was ingebed in paraffine. De uitslagen hiervan werden vergeleken met de resultaten van dezelfde methode, toegepast op vers ingevroren weefsel van hetzelfde levermonster. Er was een goede correlatie tussen de uitkomsten van beide groepen ($r = 0.92$). Hieruit werd geconcludeerd, dat materiaal, dat voor histologisch onderzoek is bewerkt (en in het archief wordt bewaard), geschikt is voor kwantitatieve ijzerbepaling.

In hoofdstuk V werd de eerder beschreven methode gebruikt voor de ijzerbepaling van monsters van pathologische levers, 6 levers met steatose, 8 met fibrose/cirrhose en 1 met haemochromatose.

Uit het onderzoek bleek, dat de bepalingsmethode voor deze abnormale levers welis-

waar minder accuraat was, als gevolg van de verminderde homogeniteit van het weefsel, maar toch nog betrouwbare resultaten gaf.

In hoofdstuk VI werden vijf graderingssystemen (namelijk die van Rowe, Scheuer, Brissot, Sindram en Kreeftenberg) voor de histochemische bepaling van het ijzergehalte van de lever met elkaar vergeleken. Bovendien werden de uitslagen van deze systemen gerelateerd aan het ijzergehalte, bepaald door middel van chemische analyse met VAAS van homogenaten van dezelfde levers.

De conclusie was, dat voor algemeen gebruik, zoals vergelijking van histologische en chemische bepalingen van het ijzergehalte van de lever, een eenvoudig histologisch graderingssysteem (bijv. het gemodificeerde Rowe-systeem, of het systeem van Scheuer) gelijkwaardig is aan enig ander, gecompliceerder systeem. Uit het onderzoek bleek ook, dat er een aanzienlijke spreiding van waarden was voor iedere graad van ijzerkleuring en tevens, dat er een belangrijke overlapping van waarden in de opeenvolgende graden bestond. De gevolgtrekking hieruit was, dat chemische bepaling van het ijzergehalte van de lever dient te worden verricht, als een ijzerstapelingsziekte wordt vermoedt.

Tot slot werd in hoofdstuk VII een beschrijving gegeven van 5 families met hereditaire haemochromatose, die op de afdeling Interne Geneeskunde werden onderzocht.

Familie A was een groot gezin met 16 broers en zusters.

Familie B betrof een homozygote vader en een heterozygote moeder.

Familie C-1 en C-2 waren waarschijnlijk aan elkaar verwant.

En familie D bestond uit jonge personen met relatief lage serum ferritine-waarden. Ook van deze familie was een ouder homozygoot en een heterozygoot.

Er waren 13 homozygote personen, 9 mannen en 4 vrouwen. De leeftijd ten tijde van het stellen van de diagnose varieerde van 33 tot 67 jaar. Het klassieke trias van hyperpigmentatie van de huid, hepatomegalie en diabetes mellitus was slechts bij 1 patiënt aanwezig.

Het aantal patiënten met gewrichtsklachten was opvallend hoog, nl. 10 van de 13. De transferrine verzadiging was hoger dan 62 % bij alle patiënten op één na. De serum ferritine-uitslagen waren sterk verhoogd, met uitzondering van de leden van familie D.

Bij alle patiënten, die een leverbiopsie ondergingen, bleken de ijzerconcentratie en de leverijzer-index verhoogd te zijn.

De HLA-typering bleek van nut te zijn bij het vaststellen van de homozygotie of heterozygotie van de familieleden.

De patiënten werden behandeld met aderlatingen, 500 ml per week, totdat het serum ferritine-gehalte normaal was geworden. Deze therapie werd goed verdragen. De gewrichtsklachten verbeterden echter niet.

Door het onderzoek van familieleden van propositi was het mogelijk om bij nog 7 anderen vast te stellen, dat zij homozygoot waren voor hereditaire haemochromatose. Daardoor kon hun behandeling op een jongere leeftijd aanvangen dan anders het geval zou zijn geweest.

De diagnostische methodes, die in dit proefschrift werden beschreven, zijn met succes toegepast in het klinisch onderzoek.

Men moet zich er van bewust zijn, dat hereditaire haemochromatose de meest frequent voorkomende, autosomaal recessieve aandoening is. Als de diagnose vroeg genoeg wordt gesteld, en een aanvang wordt gemaakt met de behandeling, is het op een tamelijk eenvoudige wijze mogelijk, om irreversibele beschadiging van organen te voorkomen.

Dan zal hereditaire haemochromatose niet langer 'het weeskind onder de ziekten' behoeven te zijn, zoals W.R. Bacon het uitdrukte.