

Izvorni rad
Original paper

Medicina 2004;42(40):265-270
UDK: 612.392.4:575.113.1

MUTACIJE GENA ZA HEMOKROMATOZU U BOLESNIKA S POVIŠENIM VRIJEDNOSTIMA SERUMSKOG ŽELJEZA

HEMOCHROMATOSIS GENE MUTATIONS IN PATIENTS WITH ELEVATED SERUM IRON

*Nada Starčević Čizmarević¹, Sandra Milić², Smiljana Ristić¹,
Davor Štimac², Miljenko Kapović¹*

SAŽETAK

Cilj našeg istraživanja bio je ustanoviti učestalost C282Y i H63D mutacija u bolesnika s povišenim vrijednostima serumskog željeza različite etiologije. U istraživanje je bilo uključeno 105 bolesnika (84 muškarca i 21 žena) koji su podijeljeni u dvije skupine. U prvoj je skupini bilo 55 bolesnika s povišenim vrijednostima serumskog željeza, koji su prekomjerno konzumirali alkohol, a u drugoj 50 bolesnika s povišenim vrijednostima serumskog željeza nepoznate etiologije. Prisutnost mutacija u HFE genu ustanovili smo metodom lančane reakcije polimeraze (PCR) nakon koje je slijedila restrikcija s odgovarajućim restrikcijskim endonukleazama.

Prema dobivenim rezultatima, frekvencije C282Y i H63D alela u skupini bolesnika koji su konzumirali alkohol, iznose 4,5% i 20,1%, a u bolesnika s povišenim vrijednostima serumskog željeza nepoznate etiologije 18,0% i 19,0%. Usporedbom učestalosti HFE alela i genotipova između navedenih skupina bolesnika utvrdili smo statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) u frekvenciji C282Y alela kao i u frekvenciji C282Y homozigota.

Naši rezultati upućuju na to da je analiza mutacija HFE gena korisna u bolesnika s povišenim vrijednostima serumskog željeza, pogotovo kad nije jasno ima li bolesnik jetrenu bolest s povišenim vrijednostima serumskog željeza ili ima nasljednu hemokromatozu uz povišene nalaze jetrenih enzima.

KLJUČNE RIJEČI: nasljedna hemokromatoza, mutacije HFE-gena, C282Y, H63D, konzumacija alkohola, željezo

UVOD

Hemokromatoza je poremećaj u metabolizmu željeza u kojemu povećana crijevna apsorpcija željeza dovodi do njegova prekomjernog odlaganja u parenhimnim orga-

ABSTRACT

To study the role of hemochromatosis gene mutations in patients with elevated serum iron, we have analysed C282Y and H63D mutations of the HFE gene. The investigation included 105 patients (84 males and 21 females) divided in two groups: 55 active alcoholic individuals (49 males and 6 females) and 50 individuals (35 males and 15 females) with elevated serum iron of unknown etiology. The analysis of HFE gene mutations was performed using the PCR-RFLP method.

According to our results C282Y and H63D allele frequencies were 4.54% and 20.09% in active alcoholics and 18.00% and 19.00% in the second group of patients without the history of alcohol consumption, respectively. Comparing the HFE allele and genotype frequencies between investigated groups statistically significant differences ($p < 0.05$) were observed in the frequency of C282Y allele and the frequency of C282Y homozygotes.

Our results suggest that the analysis of HFE mutations can be useful in patients with the elevated serum iron, especially in patients with unclear hereditary hemochromatosis or another liver disease, such as alcoholic liver disease.

KEY WORDS: hereditary hemochromatosis; HFE gene mutations, C282Y, H63D, alcohol consumption, iron

nima s oštećenjem tkiva i posljedičnom funkcijskom insuficijencijom, posebno jetre, gušterače, srca, kože i hipofize. S obzirom na način nastajanja, postoji nasljedna ili hereditarna hemokromatoza (NH) za koju se zna da je uzrokovana mutacijama gena za hemokromatozu (HFE), i stečena hemokromatoza koja je nastala taloženjem željeza i oštećenjem tkiva zbog drugih bolesti.¹ Stečeni poremećaji taloženja željeza, kao što je npr. u alkoholnoj cirozi jetre, u parenhimnim organima mogu dovesti do iste kliničke slike i patoloških promjena kao i NH.

Ustanova: ¹Zavod za biologiju i medicinsku genetiku, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, ²Katedra za internu medicinu, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

Prispjelo: 9. 4. 2004.

Prihvaćeno: 29. 4. 2004.

Adresa za dopisivanje: Mr. sc. Nada Starčević Čizmarević, dipl. ing., Zavod za biologiju i medicinsku genetiku, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Braće Brančetta 20, 51000 Rijeka. Tel. 051-651-129. e-mail: snada@medri.hr

Nekad se vjerovalo da je bolest koju danas poznajemo kao hemokromatozu, samo jedan oblik alkoholne ciroze. Bliska povezanost pretjerane konzumacije alkohola i kliničke ekspresije hemokromatoze predmet je zanimanja već više godina budući da ciroza jetre obilježava teži stadij bolesti i u hemokromatozi i u alkoholnoj bolesti jetre.² U obje su bolesti poremećeni parametri željeza. Željezo inducira oksidativni stres koji ima ključnu ulogu u patogenezi alkoholne bolesti jetre i u hemokromatozi.

Nasljedna hemokromatoza jedna je od najčešćih autosomnih recesivnih bolesti u europskoj populaciji. HFE gen lokaliziran je na kraćem kraku kromosoma 6 (6p21.3), čime je postalo moguće genetsko testiranje za dvije mutacije (C282Y i H63D) koje se najčešće povezuju s bolesti.³

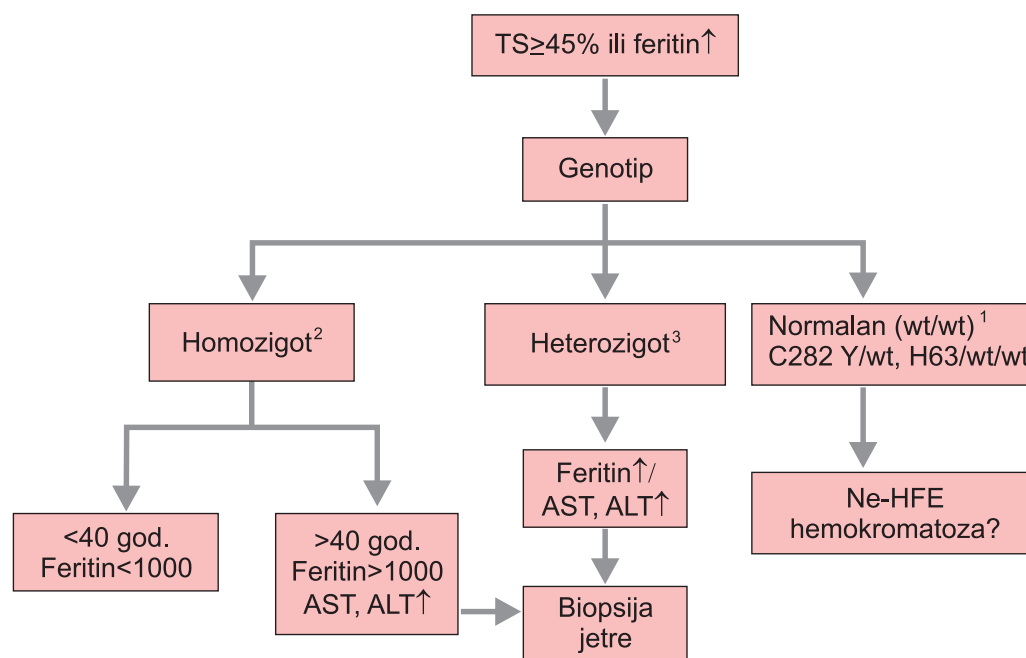
Dijagnostički algoritam (slika 1.) za NH promijenio se otkako je dostupna analiza mutacija HFE gena, čime je poraslo zanimanje za probir populacije, a time i ranu dijagnozu bolesti i odgovarajuću terapiju.⁴ I danas je pri sumnji na hemokromatozu, potrebno najprije odrediti koncentraciju serumskog željeza, ukupan kapacitet vezanja željeza (TIBC), zasićenje transferina (željezo/TIBCx100%) i feritin, a tek onda provesti gensku analizu.⁵

Naime, bolesnici s NH-om u 60-100% slučajeva su homozigoti za mutaciju C282Y ili složeni heterozigoti za C282Y mutaciju na jednom alelu i H63D mutaciju na drugom alelu te u 1% homozigoti za mutaciju H63D.^{3,6} Ostale mutacije povezane s NH-om još se istražuju.

Namjera je našeg istraživanja bila ustanoviti učestalost C282Y i H63D mutacija u bolesnika s povišenim vrijednostima serumskog željeza različite etiologije.

BOLESNICI

U istraživanje je bilo uključeno ukupno 105 bolesnika (84 muškarca i 21 žena) koji su u razdoblju od 1. lipnja 2002. do 1. lipnja 2003. obrađivani na Gastroenterološkom odjelu ili polikliničkoj službi Klinike za internu medicinu Kliničkoga bolničkog centra Rijeka, a ustanovljene su im povišene vrijednosti serumskog željeza. Bolesnici su bili upoznati s istraživanjem te su dali pisani pristanak, a istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Rijeci. U svih je bolesnika uzeta detaljna anamneza i određeni odgovarajući biokemijski pokazatelji serumskog željeza. Na osnovi anamnestičkih podataka osnovane su dvije skupine bolesnika. U prvoj je skupini bilo 55 bolesnika (49 muškarca i 6 žena) s



Slika 1. Dijagnostički algoritam (preuzeto iz Pietrangelo A. Haemochromatosis. Gut 2003; 52(Suppl III); ii23-iii30)

Figure 1 Diagnostic algorithm (taken from Pietrangelo A. Haemochromatosis. Gut 2003; 52(Suppl III); ii23-iii30)

¹ wt/wt- wild type – normalan genotip

² C282Y/C282Y

³ C282Y/H63D

povišenim vrijednostima serumskog željeza, koji su konzumirali alkohol u količinama većim od 80 g/dan tijekom 5 i više godina, a u drugoj 50 bolesnika s povišenim vrijednostima serumskog željeza nepoznate etiologije.

Iz istraživanja su isključeni i bolesnici s prije dijagnosticiranim bolestima: talasemijom major, sideroblastenom anemijom, hemolitičkom anemijom, s prekomjernim uzimanjem željeza (prehrana, transfuzije), s akutnim (virusni i toksični hepatitis) i kroničnim jetrenim bolestima i jasno definiranom dijagnozom (kronični virusni hepatitis B i C, porphyria cutanea tarda, portokavalni spoj i dr.) te bolesnici na dugotrajnoj hemodijalizi.

METODE

Iz seruma bolesnika određivala se vrijednost željeza 2,4,6-tri (2 pyridyl) -5-triazinom, a UIBC kolorimetrijskom metodom. Povišena vrijednost serumskog željeza bila je iznad 26,9 mol/l.

Bolesnicima je izvađeno i 6 ml periferne krvi, koja je do DNA-izolacije zamrznuta u epruvetama s antikoagulantom na -20°C. Za molekularno-genetičku analizu izolirali smo DNA prema standardnom protokolu te utvrđivali prisutnost svake od mutacija u HFE-genu s pomoću lančane reakcije polimeraze (PCR) nakon koje

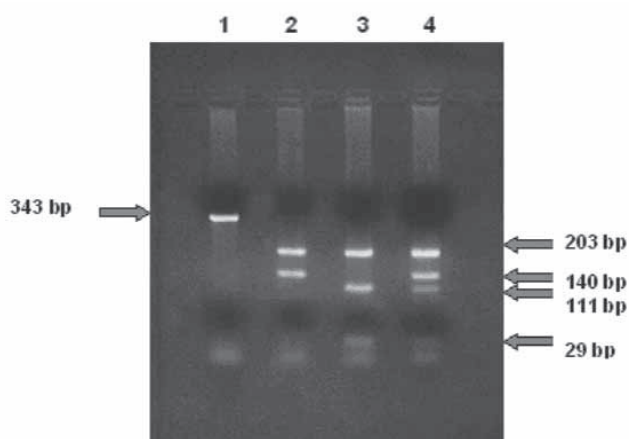
je slijedila restrikcija s odgovarajućim restrikcijskim enzimima (Rsa I za C282Y mutaciju i Mbo I za H63D mutaciju). Uvjete i početnice za lančanu reakciju polimeraze opisali su Feder i suradnici.³ Restrikcijske fragmente razdvojene elektroforezom analizirali smo pod UV-lampom i ovisno o migraciji restrikcijskih fragmenata na gelu razlikovali smo homozigote normalnog genotipa, heterozigote i homozigote za svaku navedenu mutaciju (slika 2.).

Usporedba učestalosti C282Y i H63D alela i genotipova između skupina bolesnika provedena je χ^2 -testom i Fisherovim egzaktnim testom, a statistička značajnost razlika izražena je na razini 0,05.

REZULTATI

Distribucija HFE genotipova u obje skupine bolesnika s povišenim vrijednostima serumskog željeza prikazana je u tablici 1.

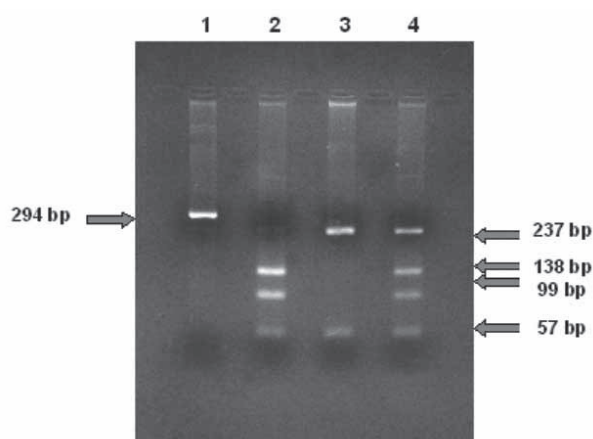
U skupini od 55 bolesnika koji uz povišene vrijednosti serumskog željeza prekomjerno konzumiraju alkohol, njih 28 (50,9%) imalo je uredan genotip, a 27 (48,1%) bolesnika imalo je neku od ispitivanih HFE mutacija. U ovoj skupini samo je jedna osoba (0,9%) bila homozigot, i to za H63D mutaciju. Niti jedna osoba nije bila složeni heterozigot za navedene mutacije. Hete-



Slika 2. Veličina PCR-produkta i restrikcijskih fragmenata za pojedini genotip pri analizi C282Y-lokusa

Figure 2 Size of PCR product and restrictive fragments for particular genotype in analysing C282Y locus

- 1 - PCR-produkt
- 2 - normalan homozigot
- 3 - homozigotna mutacija
- 4 - heterozigot



Slika 3. Veličina PCR-produkta i restrikcijskih fragmenata za pojedini genotip pri analizi H63D-lokusa

Figure 3 Size of PCR product and restrictive fragments for particular genotype in analysing H63D locus

- 1 - PCR-produkt
- 2 - normalan homozigot
- 3 - homozigotna mutacija
- 4 - heterozigot

Tablica 1. Distribucija učestalosti HFE-genotipova u bolesnika s povišenim vrijednostima serumskog željeza

Table 1 *Distribution of HFE genotype incidence in patients with elevated serum iron*

C282Y	H63D	I. skupina ¹ N (%)	II. skupina ² N (%)	p
-/-	-/-	28 (50,9)	21 (42,0)	NS ³
-/-	+/-	21 (38,2)	16 (32,0)	NS ³
-/+	-/-	5 (9,1)	5 (10,0)	NS ³
-/-	+/+	1 (1,8)	0	NS ³
+/+	-/-	0	5 (10,0)	<0,05
+/-	+/-	0	3 (6,0)	NS ³
Ukupno		55	50	

¹ bolesnici s povišenim serumskim željezom koji su prekomjerno konzumirali alkohol

² bolesnici s povišenim serumskim željezom nepoznate etiologije

³ NS - nema statističke značajnosti

rozigota za C282Y mutaciju bilo je 5 (9,1%), a heterozigota za H63D mutaciju 21 (38,2%).

U drugoj skupini od 50 bolesnika s povišenim vrijednostima serumskog željeza, 21 (42,0%) bolesnik imao je uredan genotip, a 29 (58,0%) bolesnika imalo je neku od ispitivanih HFE mutacija. Pronašli smo pet C282Y homozigota (10,0%), dok su tri osobe (6,0%) bile složeni heterozigoti s C282Y mutacijom na jednom kromosomu i H63D mutacijom na drugome homolognom kromosomu. U ovoj skupini bolesnika heterozigota za C282Y mutaciju bilo je 5 (10,0%), a heterozigota za H63D mutaciju 16 (32,0%).

Usporedbom pojedinih HFE genotipova između dviju skupina bolesnika, ustanovljena je statistički

značajna razlika (p 0.05) u učestalosti C282Y homozigota u bolesnika s povišenim vrijednostima serumskog željeza nepoznate etiologije.

Da bismo ustanovili frekvencije C282Y i H63D alela u bolesnika s povišenim vrijednostima serumskog željeza analizirali smo ukupno 210 kromosoma na te dvije mutacije. Dobiveni rezultati u skupini bolesnika s povišenim vrijednostima serumskog željeza i povećanom konzumacijom alkohola pokazuju da je ukupna frekvencija C282Y alela iznosila 4,5%, a frekvencija H63D alela 20,1% (tablica 2.). Frekvencija C282Y alela u skupini bolesnika s povišenim vrijednostima serumskog željeza nepoznate etiologije iznosila je 18,0%, te 19,0% za H63D alel (tablica 2.).

Tablica 2. Mutacije HFE-gena: frekvencija alela (%) u bolesnika s povišenim vrijednostima serumskog željeza

Table 2 *HFE gene mutations: allele frequency (%) in patients with elevated serum iron*

Mutacije HFE-gena	I. skupina ¹ (N=55)	II. skupina ² (N=50)	p
C282Y	4,5	18,0	<0,05
H63D	20,1	19,0	NS ³

¹ bolesnici s povišenim serumskim željezom koji su prekomjerno konzumirali alkohol

² bolesnici s povišenim serumskim željezom nepoznate etiologije

³ NS - nema statističke značajnosti

Frekvencija C282Y alela bila je statistički značajno veća ($p < 0,05$) u skupini bolesnika s povišenim serumskim željezom nepoznate etiologije.

RASPRAVA

Istraživanjem smo obuhvatili bolesnike s povišenim vrijednostima serumskog željeza, podijeljene u dvije skupine, u kojih smo ustanovili učestalost HFE alela i genotipova odgovornih za razvoj manifestne hemokromatoze. Razlikovanjem skupina bolesnika koji konzumiraju alkohol u prekomjernim količinama i bolesnika s povišenim serumskim željezom nepoznate etiologije nastojali smo pokazati nužnost molekularno-genetičke analize u diferencijaciji nasljedne i stečene hemokromatoze.

Za razliku od niza studija o značenju HFE mutacija u dijagnostici hemokromatoze, do sada je u literaturi objavljeno svega nekoliko studija o ulozi mutacija HFE gena u bolesnika s alkoholnom bolesti jetre.⁷⁻¹⁰ Što se tiče C282Y mutacije, frekvencija ovog alela u naših bolesnika iznosila je 4,5%, što je statistički značajno manje nego u ostalih bolesnika s povišenim vrijednostima serumskog željeza nepoznate etiologije (tablica 2.), a ne odstupa od vrijednosti objavljenih za opću hrvatsku populaciju (3,3%).¹¹ Takav rezultat odgovara već spomenutim studijama iz ovog područja i ne upućuje na povezanost ove mutacije s razvojem alkoholne bolesti jetre.

U bolesnika koji prekomjerno konzumiraju alkohol, jedna je osoba bila homozigot za H63D mutaciju (tablica 1.), a učestalost H63D alela (20,1%) (tablica 2.), koji je inače podjednako i s većom učestalošću zastupljen u raznim europskim populacijama, nije se statistički značajno razlikovala od frekvencije u hrvatskoj populaciji (14,5%).¹¹ Rezultati objavljeni u dvije studije^{9,10} o ulozi ove mutacije u alkoholnoj bolesti jetre oprečni su, i iako naši rezultati nisu ustanovili izravnu uključenost H63D mutacije u razvoj alkoholne bolesti jetre, ne možemo negirati svaku vezu budući da je heterozigota za tu mutaciju (38,2%) više u bolesnika nego u općoj populaciji (23%).

U bolesnika s povišenim vrijednostima serumskog željeza nepoznate etiologije, ustanovili smo 5 homozigota (10%) za C282Y mutaciju, a frekvencija C282Y alela je 18%. Dosadašnje brojne studije pokazuju ulogu mutacija HFE gena u dijagnostici NH. Pojavnost homozigota za C282Y mutaciju u oboljelih je različita u različitim studijama: Austrija 78%, Francuska 91%, Italija 69%, Velika Britanija 92%, Sjedinjene Američke Države 82%, Kanada 95%.⁶ Jazwinska i sur.¹² su pak u studiji u Australiji ustanovili da su svi oboljeli (100%) bili homozigoti za C282Y mutaciju. U studijama Pietrangela,¹³ Carrelle,¹⁴ Olynyka,¹⁵ Mure¹⁶ i Beutlera¹⁷ očekivano je zna-

čajno viša frekvencija C282Y alela u bolesnika s NH-om i vrijednosti iznose od 43% do 86%.

Mogući razlog što je u naših bolesnika nađen manji broj homozigota za C282Y mutaciju u odnosu prema prije navedenim studijama jest postojanje razlika u kriterijima za uključivanje jer su u navedenim studijama, uz povišenu vrijednost serumskog željeza, uzete u obzir i povišene vrijednosti zasićenja transferinom i/ili povišene vrijednosti feritina. Na prije navedene kriterije u našem istraživanju, iz kojih bi se mogli izdvojiti nosioci mutacija HFE gena kao i oni s genotipovima odgovornim za NH, odlučili smo se zbog relativne jednostavnosti i dostupnosti. Razlike u učestalosti C282Y mutacije bi se mogle objasniti i etničkim razlikama odnosno zemljopisnim smještajem ispitivanih populacija. Stoga je naša pretpostavka da u populacijama s nižom frekvencijom C282Y alela nego u zemljama sjeverne i zapadne Europe, ostale mutacije HFE gena te određeni okolišni čimbenici mogu biti jedan od kofaktora za razvoj klinički manifestnog NH-a.

Što se tiče H63D mutacije, razina učestalosti homozigota za H63D mutaciju kreće se među bolesnicima, u objavljenim studijama, oko 1%.⁶ U naših bolesnika s povišenim serumskim željezom nismo ustanovili niti jednog homozigota, a frekvencija H63D alela iznosi 19%. Frekvencija H63D alela u studijama Deugniera¹⁸ i Steinberga¹⁹ iznosi 18,4%, odnosno 21,1% i odgovara našim rezultatima.

Studije u europskim populacijama pokazuju da je frekvencija složenih heterozigota C282Y/H63D u bolesnika 4-6%.⁶ Naši se rezultati uklapaju u navedene s učestalošću složenih heterozigota od 6%.

Serumsko željezo, TS i feritin uobičajeni su biokemijski testovi koji se upotrebljavaju u dijagnostici hemokromatoze. Povišenje razine željeza može biti postprandijalno, ali postoje i diurnalne promjene koncentracije željeza te je senzitivnost ove pretrage 56%, a ako je udružena s povišenjem TS i feritina, senzitivnost postaje veća (86%).²⁰ Isto tako, željezo i feritin mogu biti normalni u mladih bolesnika ili pak povišeni zbog mnogih razloga (kronični virusni hepatitis, alkoholna bolest jetre, nealkoholni steatohepatitis, u nekim malignim bolestima i u drugim upalnim stanjima).

Željezo i alkohol nezavisni su hepatotoksini sa sličnim patogenim mehanizmom. Konzumacija alkohola potiče prekomjerno nakupljanje željeza i značajno povećava rizik od ciroze jetre u bolesnika s NH-om.²¹ Razlog zbog kojega prekomjerna konzumacija alkohola naglašava kliničku ekspresiju hemokromatoze, nejasan je. Najvjerojatnije bi objašnjenje bilo da su željezo i alkohol dodatni kofaktori, a svaki od njih izaziva oksidativni stres i fibrogenezu jetre.

Česta dijagnostička nedoumica nastupa kad nije jasno ima li bolesnik jetrenu bolest (npr. alkoholnu

cirozu jetre) s povišenim vrijednostima serumskog željeza ili bolesnik ima NH uz povišene nalaze jetrenih enzima.

Upravo u takvim je okolnostima analiza mutacija HFE gena iznimno korisna, što je dokazalo i naše istraživanje. Ako je bolesnik homozigot za C282Y ili složeni heterozigot C282Y/H63D, opterećenje željezom najvjerojatnije je uzrokovano genetskim poremećajem. S druge strane, ako bolesnik ima neku drugu jetrenu bolest (npr. alkoholnu bolest jetre) i heterozigot je za C282Y, heterozigot za H63D ili nema niti jednu od tih mutacija, preopterećenje željezom vjerojatno je uzrokovano osnovnom jetrenom bolešću, a možda manjim dijelom HFE genotipom.

LITERATURA

- Powell LW, Isselbacher KJ. Hemokromatoza. U: Harrison (ed.) Principi interne medicine. Prvo hrvatsko izdanje, Split, Placebo, 1997:1814-6.
- Fletcher LM, Powell LW. Hemochromatosis and alcoholic liver disease. *Alcohol* 2003; 30:131-6.
- Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A et al. A novel MHC class I-like is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* 1996; 13:399-408.
- Bulaj ZJ, Griffen LM, Jorde LB, Edwards CQ, Kushner JP. Clinical and biochemical abnormalities in people heterozygous for hemochromatosis. *N Engl J Med* 1996; 335:1799-1805.
- Powell LW, George K, McDonnell SM, Kowdley KV. Diagnosis of hemochromatosis. *Ann Intern Med* 1998; 129:925-31.
- Brissot P, Moirand R, Jouanolle AM, Guyader D, Le Gall JY, Deugnier Y, David V. A genotypic study of 217 unrelated probands diagnosed as "genetic hemochromatosis" on "classical" phenotypic criteria. *J Hepatol* 1999; 30: 588-93.
- Brandhagen DJ, Fairbanks VF, Baldus WP, Smith CI, Kruckeberg KE, Schaid DJ, Thibodeau SN. Prevalence and clinical significance of HFE gene mutations in patients with iron overload. *Am J Gastroenterol* 2000; 95:2910-4.
- Frenzer A, Rudzki Z, Norton I, Butler WJ. Heterozygosity of the haemochromatosis mutation, C282Y, does not influence susceptibility to alcoholic cirrhosis. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33:1324
- Grove J, Daly AK. Heterozygotes for HFE mutations have no increased risk of advanced alcoholic liver disease. *Gut* 1998; 43:262-6.
- Ropero GP, Villegas MA, Fernandez AM, Garcia-Agundez JA, Gonzalez FFA, Benitez RJ et al. C282Y and H63D mutations of HFE gene in patients with advanced alcoholic liver disease. *Rev Esp Enferm Dig* 2001; 93:156-63.
- Ristic S, Makuc J, Starcevic N, Logar N, Brajenovic-Milic B, Stepec S et al. Hemochromatosis gene mutations in the Croatian and Slovenian populations. *Clin Genet* 2003; 64:444-6.
- Jazwinska EC, Cullen LM, Busfield F, Pyper WR, Webb SI, Powell LW et al. Haemochromatosis and HLA-H. *Nat Genet* 1996; 14:249-51.
- Pietrangelo A, Montosi G, Totaro A, Garuto C, Conte D, Cassanelli S et al. Hereditary hemochromatosis in adults without pathogenic mutations in the hemochromatosis gene. *N Engl J Med* 1999; 341:725-32.
- Carella M, DeAmbrosio L, Totaro A, Grifa A, Valentino MA, Piperno A et al. Mutation analysis of the HLA-H gene in Italian haemochromatosis patients. *AM J Hum Genet* 1997; 60:828-32.
- Olynyk JK, Cullen DJ, Aquilia S, Rossi E, Summerville L, Powell LW. A population-based study of the clinical expression of the hemochromatosis gene. *N Engl J Med* 1999; 341:718-24.
- Mura C, Nousbaum JB, Verger P, Moalic MT, Ragueneas O, Mercier AY, Ferec C. Phenotype-genotype correlation in haemochromatosis subjects. *Hum Genet.* 1997; 101:271-6.
- Beutler E, Felitti VJ, Koziol JA, Ho NJ, Gelbart T. Penetrance of 845G A (C282Y) HFE hereditary haemochromatosis mutation in the USA. *Lancet* 2002; 359:211-8.
- Deugnier YM, Turlin B, Loreal O. Iron and neoplasia *J Hepatol* 1998; 28:21-5.
- Steinberg KK, Cogswell ME, Chang JC, Caudill SP, McQuillan GM, Bowman BA et al. Prevalence of C282Y and H63D mutations in the hemochromatosis (HFE) gene in the United States. *JAMA.* 2001; 285:2216-22.
- Tavill AS. Diagnosis and management of hemochromatosis. *Hepatology* 2001; 33:1321-8.
- Fletcher LM, Dixon JL, Purdie DM, Powell LW, Crawford DH. Excess alcohol greatly increases the prevalence of cirrhosis in hereditary hemochromatosis. *Gastroenterology* 2002; 122: 281-9.