



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
Α' ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ – ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ : ΠΟΛΥΖΟΣ ΑΡΗΣ

Μελέτη της γενετικής βάσης συνδρόμων υπερφερριτιναιμίας
με ή χωρίς αναιμία σε Έλληνες ασθενείς


ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Σταματία-Λυδία Χατζηνικολάου

Ιατρός

ΑΘΗΝΑ 2013

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

 ΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ, ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ,
ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝ
ΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙ
ΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ
ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ· ΗΓΗΣΑΣΘ
ΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗ
Ν ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΑΣΘΑΙ, Κ
ΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ, Κ
ΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΛΥΤΕΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝ
ΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ,
ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥ
ΓΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ
ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣ
ΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝ
ΤΟΣ, ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΛΟ
ΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ, ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ, ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ·
ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ὈΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟ
ΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗ
ΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΙΗ, ΕΙΡΪΕΙΝ· ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ
ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕΥ
ΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ ὈΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥ
ΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΪΟΝ ΔΩΣΩ· ΑΓΜΩΣ Δ
Ε ΚΑΙ ΟΣΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝ
ΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ· ΟΥ ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘ
ΙΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ ΠΡ
ΗΪΙΟΣ ΤΗΣΔΕ· ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΩ,
ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ὈΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤ
ΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΙΑΣ ΕΚΟΥΣΙΑΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΑΣ, Τ
ΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥ
ΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡ
ΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ· Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ,
Η ΙΔΩ, Η ΔΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΚΑΤΑ Β
ΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Δ ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ
ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟ
ΙΑΥΤΑ· ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕ
Δ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘ
ΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ Π
ΔΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΔΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ· ΠΑΡΑΒΑΙ
ΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

Αίτηση Διδακτορικής Διατριβής: 23.06.2005 (Αρ. Πρωτ. 10239)

Ορισμός Θέματος : 19.09.2005

«Μελέτη της γενετικής βάσης της αναιμίας Diamond-Blackfan στον ελληνικό πληθυσμό»

Τροποποίηση Θέματος: 27.11.2008

«Μελέτη της γενετικής βάσης συνδρόμων υπερφερριτιναιμίας με ή χωρίς αναιμία σε Έλληνες ασθενείς»

Κατάθεση 1^{ης} Έκθεσης Προόδου: 06.09.2006

Κατάθεση 2^{ης} Έκθεσης Προόδου: 07.12.2011

Κατάθεση 3^{ης} Έκθεσης Προόδου: 24.05.2013

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. ΓΕΡΑΣΙΜΟΣ Α. ΠΑΓΚΑΛΗΣ

Ομότιμος Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών

2. ΙΩΑΝΝΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών

3. ΑΝΤΩΝΙΟΣ ΚΑΤΤΑΜΗΣ

Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών

*στους γονείς μου,
Αντιγόνη και Πέτρο*

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο της Α' Παθολογικής Κλινικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών κατά το χρονικό διάστημα 2005 έως 2013.

Ευχαριστώ θερμά τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον ομότιμο Καθηγητή Γεράσιμο Πάγκαλη, τον Καθηγητή Ιωάννη Μελέτη και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Αντώνη Καττάμη για την εμπιστοσύνη τους με το θέμα της διατριβής, την υποστήριξή τους, καθώς και για το χρόνο που μου διέθεσαν και την πάντα καλή τους διάθεση.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Λέκτορα Γιώργο Παπανικολάου όχι μόνο για τις πολύτιμες συμβουλές, τις διορθώσεις και την επιστημονική καθοδήγηση στην παρούσα διατριβή, αλλά κυρίως γιατί αποτέλεσε για μένα σημείο αναφοράς στον ερευνητικό τρόπο σκέψης και στην επιστημονική προσέγγιση των πραγμάτων.

Ευχαριστώ πολύ τον Αναπληρωτή Καθηγητή Νικόλαο Σακελλαρόπουλο και τον ιατρό και φίλο, Αντώνη Αντωνιάδη για την εκπαίδευση και τη βοήθειά τους στο Ηπατολογικό Ιατρείο, τη συνεχή τους υποστήριξη και την εμπύχωση που μου έχουν προσφέρει κατά τη διάρκεια των τελευταίων χρόνων.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Υπεύθυνη του Εργαστηρίου της Α' Παθολογικής Κλινικής, Βασιλική Καλότυχου, για τη βοήθεια και τη συνεργασία της, καθώς και όλους εκείνους που με βοήθησαν κατά την παραμονή μου στο χώρο του Εργαστηρίου.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον ομότιμο Καθηγητή Δημήτρη Λουκόπουλο για την πολύτιμη καθοδήγησή του κατά τη συγγραφή της διατριβής και τη συνεχή του υποστήριξη.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στη βιολόγο, ερευνήτρια και φίλη Δανάη Παλαιολόγου, χωρίς τη βοήθεια της οποίας δε θα είχα καταφέρει να ολοκληρώσω την παρούσα προσπάθεια. Η εκπαίδευση στο εργαστήριο, η βοήθειά της στο πειραματικό μέρος της διατριβής, οι συμβουλές της κατά τη συγγραφή της εργασίας και η συνεχής ηθική και ψυχολογική υποστήριξη υπήρξαν ανεκτίμητες.

Ευχαριστώ θερμά τους γονείς μου που με υποστήριξαν με κάθε τρόπο, υλικό και ψυχικό, και που πίστεψαν στην προσπάθειά μου. Για άλλη μια φορά με έκαναν να αισθανθώ πόσο τυχερή είμαι.

Τέλος, ευχαριστώ όλους εκείνους που μου συμπαραστάθηκαν και με υποστήριξαν κατά τη διάρκεια της εκπόνησης και της συγγραφής της παρούσας διατριβής.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

| | |
|--|-----------|
| 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 4 |
| 1.1 Ομοιοστασία του σιδήρου | 5 |
| 1.1.1 Η βιολογική σημασία του σιδήρου | 5 |
| 1.1.2 Κατανομή του σιδήρου και ημερήσιο ισοζύγιο | 6 |
| 1.1.3 Απορρόφηση και διακίνηση του σιδήρου στο πλάσμα και τους ιστούς | 7 |
| 1.1.3.1 Απορρόφηση του σιδήρου | 7 |
| 1.1.3.2 Διακίνηση του σιδήρου στο πλάσμα | 11 |
| 1.1.3.3 Πρόσληψη του σιδήρου από τα κύτταρα των ιστών | 12 |
| 1.1.4 Ομοιοστασία του σιδήρου στον οργανισμό – Ο ρόλος της εψιδίνης..... | 15 |
| 1.1.4.1 Η ρύθμιση της έκφρασης της εψιδίνης..... | 17 |
| 1.1.5 Η ενδοκυττάρια ομοιοστασία του σιδήρου..... | 22 |
| 1.1.5.1 Διακίνηση, χρήση και αποθήκευση του σιδήρου μέσα στα κύτταρα | 22 |
| 1.1.5.2 Ρύθμιση της ομοιοστασίας του σιδήρου στο κύτταρο: Το σύστημα IRE/IRP | 23 |
| 1.1.5.3 Δομή, ρόλος και ρύθμιση των σιδηρορυθμιστικών πρωτεϊνών..... | 27 |
| 1.1.5.4 Φυσιολογικές λειτουργίες της IRP1 και της IRP2–Μελέτες σε ποντίκια . | 29 |
| 1.2 Φερριτίνη : Ο ρόλος της στον οργανισμό | 31 |
| 1.2.1 Εισαγωγή..... | 31 |
| 1.2.2 Δομή της φερριτίνης | 31 |
| 1.2.3 Ο ρόλος και η λειτουργία της φερριτίνης | 33 |
| 1.2.4 Τα γονίδια της φερριτίνης | 35 |
| 1.2.5 Η ρύθμιση της φερριτίνης | 37 |
| 1.2.5.1 Ρύθμιση της φερριτίνης ανάλογα με τα επίπεδα του σιδήρου | 37 |
| 1.2.5.2 Ρύθμιση της φερριτίνης στη φλεγμονή..... | 38 |
| 1.2.5.3 Ρύθμιση της φερριτίνης στο οξειδωτικό στρες | 39 |
| 1.2.5.4 Ρύθμιση της φερριτίνης στην υποξία και την ισχαιμία..... | 39 |
| 1.2.5.5 Ρύθμιση της φερριτίνης στον καρκίνο | 40 |
| 1.2.5.6 Ρύθμιση της φερριτίνης από άλλους παράγοντες..... | 40 |
| 1.2.6 Η κλινική σημασία της φερριτίνης | 41 |
| 1.3 Κληρονομικό Σύνδρομο Υπερφερριτιναιμίας Καταρράκτη (HHCS) | 44 |
| 1.3.1 Παθογένεια του HHCS..... | 44 |
| 1.3.2 Μεταλλάξεις στο HHCS | 46 |
| 1.3.3 Συσχέτιση μεταξύ γονοτύπου και φαινοτύπου στο HHCS..... | 48 |
| 1.3.4 Κλινικά χαρακτηριστικά του HHCS | 49 |
| 1.3.4.1 Υπερφερριτιναιμία χωρίς υπερφόρτωση σιδήρου..... | 49 |
| 1.3.4.2 Ο καταρράκτης στο HHCS | 50 |
| 1.3.4.3 Φαινοτυπική ετερογένεια στο HHCS..... | 53 |
| 1.3.5 Επιδημιολογία του HHCS | 54 |
| 1.3.6 Διάγνωση και θεραπεία του HHCS..... | 55 |
| 1.3.6.1 Διάγνωση του HHCS | 55 |
| 1.3.6.2 Θεραπευτικοί χειρισμοί στο HHCS | 56 |

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

| | |
|---|-----------|
| 2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ..... | 59 |
| 3. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ | 61 |
| 3.1 Κλινικό υλικό - Ασθενείς..... | 61 |
| 3.1.1 Καταγραφή και διαγνωστική προσέγγιση ασθενών με υπερφερριταιμία ... | 61 |
| 3.1.2 Καταγραφή ασθενών με υπερφερριταιμία και καταρράκτη | 63 |
| 3.1.3 Λήψη δειγμάτων ολικού αίματος..... | 64 |
| 3.2 Μέθοδοι για τη διεξαγωγή μοριακού ελέγχου | 65 |
| 3.2.1 Απομόνωση γενωμικού DNA..... | 66 |
| 3.2.2 Ποσοτικός προσδιορισμός DNA (φωτομετρικός προσδιορισμός) | 67 |
| 3.2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR) | 68 |
| 3.2.3.1 Αρχή της μεθόδου..... | 68 |
| 3.2.3.2 Προτύπωση της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του IRE του γονιδίου FTL..... | 70 |
| 3.2.3.3 Multiplex PCR για την ανίχνευση μεταλλάξεων στα γονίδια HFE, TfR2, FPN1 της κληρονομικής αιμοχρωμάτωσης..... | 71 |
| 3.2.3.4 Προτύπωση της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου HJV | 72 |
| 3.2.4 Ηλεκτοφόρηση σε πηκτή αгарόζης..... | 74 |
| 3.2.5 Καθαρισμός προϊόντος της PCR | 75 |
| 3.2.6 Ανάγνωση της πρωτοταγούς αλληλουχίας των βάσεων του DNA (Sequencing) | 77 |
| 3.2.6.1 Αρχή της μεθόδου..... | 77 |
| 3.2.6.2 Διαδικασία - Υλικά..... | 79 |
| 3.2.7 Ανίχνευση μεταλλάξεων με τη μέθοδο πολυμορφισμού μήκους θραυσμάτων εκ περιορισμού (Restriction Fragment Length Polymorphism-RFLP) | 81 |
| 3.2.7.1 Αρχή της μεθόδου..... | 81 |
| 3.2.7.2 Προτύπωση μεθόδου RFLP για την ανίχνευση της μετάλλαξης FTL C39G | 82 |
| 3.2.7.3 Προτύπωση μεθόδου RFLP για την ανίχνευση της μετάλλαξης HJV G320V..... | 84 |
| 3.2.8 Ανάστροφος υβριδισμός προϊόντων PCR για την ανίχνευση μεταλλάξεων στα γονίδια HFE, TfR2 και FPN1 | 86 |
| 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... | 88 |
| 4.1. Μελέτη ασθενών με εμμένουσα ασυμπτωματική υπερφερριταιμία..... | 88 |
| 4.1.1 Κλινικά χαρακτηριστικά υπερφερριταιμικών ασθενών | 88 |
| 4.1.2 Διαγνωστικά αίτια υπερφερριταιμίας..... | 88 |
| 4.1.3 Μοριακός έλεγχος στη διαγνωστική προσέγγιση της υπερφερριταιμίας.... | 90 |
| 4.2. Ασθενείς με υπερφερριταιμία και καταρράκτη | 91 |
| 4.2.1. Ασθενείς με υπερφερριταιμία, καταρράκτη και θετικό οικογενειακό ιστορικό | 91 |
| 4.2.1.1 Οικογένεια 1 | 91 |
| 4.2.1.2 Οικογένεια 2..... | 95 |
| 4.2.1.3 Οικογένεια 3..... | 97 |
| 4.2.1.4 Οικογένεια 4..... | 100 |

| | |
|---|------------|
| 4.2.1.5 Οικογένεια 5..... | 102 |
| 4.2.1.6 Οικογένεια 6..... | 104 |
| 4.2.1.7 Οικογένεια 7..... | 108 |
| 4.2.2. Ασθενείς με υπερφερριτιναιμία και καταρράκτη, χωρίς θετικό οικογενειακό ιστορικό | 111 |
| 4.2.2.1 Ασθενείς με μεταλλάξεις στο IRE του γονιδίου FTL | 111 |
| 4.2.2.2 Ασθενείς χωρίς μεταλλάξεις στο IRE του γονιδίου FTL | 114 |
| 4.2.3 Σύνοψη αποτελεσμάτων ασθενών με HHCS | 119 |
| 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... | 120 |
| 5.1. Η διερεύνηση της εμμένουσας ασυμπτωματικής υπερφερριτιναιμίας..... | 120 |
| 5.1.1 Υπερφερριτιναιμία και συσσώρευση σιδήρου | 120 |
| 5.1.2 Η σημασία του κορεσμού τρανσφερρίνης στη διαγνωστική προσέγγιση της υπερφερριτιναιμίας | 121 |
| 5.1.3 Η κληρονομική αιμοχρωμάτωση στην Ελλάδα..... | 123 |
| 5.1.4 Συνήθη αίτια υπερφερριτιναιμίας..... | 124 |
| 5.1.5 Δυσκολία στη διάγνωση της υπερφερριτιναιμίας..... | 127 |
| 5.1.6 Ο ρόλος του μοριακού ελέγχου στη διαγνωστική προσέγγιση της υπερφερριτιναιμίας | 129 |
| 5.2. Το κληρονομικό σύνδρομο υπερφερριτιναιμίας καταρράκτη (HHCS) στον ελληνικό πληθυσμό | 131 |
| 5.2.1 Το HHCS ως αίτιο υπερφερριτιναιμίας | 131 |
| 5.2.2 Το HHCS χαρακτηρίζεται από φαινοτυπική ετερογένεια. | 132 |
| 5.2.2.1 Ηλικία διάγνωσης του HHCS | 132 |
| 5.2.2.2 Τιμές φερριτίνης στο HHCS | 133 |
| 5.2.2.3 Καταρράκτης στο HHCS | 134 |
| 5.2.3 Η γενετική βάση του HHCS στον ελληνικό πληθυσμό..... | 135 |
| 5.2.3.1 Μεταλλάξεις στο HHCS σε Έλληνες ασθενείς | 135 |
| 5.2.3.2 Γεωγραφική κατανομή των περιστατικών με HHCS στην Ελλάδα..... | 136 |
| 5.2.3.3 Συσχέτιση γονοτύπου - φαινοτύπου | 137 |
| 5.2.3.4 Οικογένειες και de novo μεταλλάξεις στο HHCS | 137 |
| 5.2.4 Διάγνωστικοί και θεραπευτικοί χειρισμοί στο HHCS..... | 138 |
| 5.2.4.1 Διαγνωστική προσέγγιση του ασθενή με πιθανό HHCS | 138 |
| 5.2.4.2 Ο ρόλος του μοριακού ελέγχου στη διαγνωστική προσέγγιση του HHCS | 139 |
| 5.2.4.3 Θεραπευτικοί χειρισμοί στο HHCS | 140 |
| 5.2.4.4 Σιδηροπενία και HHCS | 140 |
| 5.2.4.5 Ευαισθητοποίηση για το HHCS | 141 |
| 6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ | 143 |
| 7. SUMMARY | 146 |
| 8. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ..... | 149 |
| 9. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ..... | 152 |
| 10.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 159 |
| 11. ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ | 173 |

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

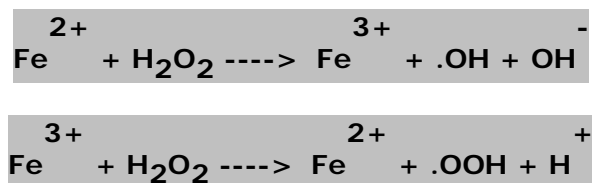
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ομοιοστασία του σιδήρου

1.1.1 Η βιολογική σημασία του σιδήρου

Ο σίδηρος αποτελεί ένα από τα βασικά ιχνοστοιχεία για τη λειτουργία όλων των ευκαρυωτικών κυττάρων και των περισσότερων προκαρυωτικών οργανισμών. Συμμετέχει στον κυτταρικό μεταβολισμό, στη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων και των πρωτεϊνών, είναι συμπαραγοντας σε ενζυμικές αντιδράσεις οξειδοαναγωγής, της κυτταρικής αναπνοής και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Στα θηλαστικά αποτελεί την προσθετική ομάδα της αιμοσφαιρίνης και μέσω αυτής μετέχει στη μεταφορά οξυγόνου από τους πνεύμονες στους ιστούς. Επιπλέον, είναι βασικό στοιχείο της μυοσφαιρίνης των μυϊκών κυττάρων. Η ένδεια σιδήρου αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη και οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο.

Ο βιολογικός ρόλος του σιδήρου έγκειται κυρίως στην ιδιότητά του να μεταπίπτει από την οξειδωμένη (Fe^{3+}) στην αναχθείσα (Fe^{2+}) μορφή, και αντίστροφα. Η ιδιότητά του αυτή τον καθιστά πολύτιμο και συγχρόνως τοξικό για το κύτταρο, λόγω της παραγωγής ελεύθερων ριζών, με τη συμμετοχή του στην αντίδραση Haber-Weiss-Fenton, όπως φαίνεται παρακάτω.



Οι ελεύθερες ρίζες ($\cdot\text{OOH}$, OH^-) είναι ιδιαίτερα τοξικές και καταστρέφουν τις κυτταρικές μεμβράνες, τις πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα. Επομένως, τόσο η υπερφόρτωση σιδήρου όσο και η έλλειψη αυτού οδηγούν σε διαταραχές του

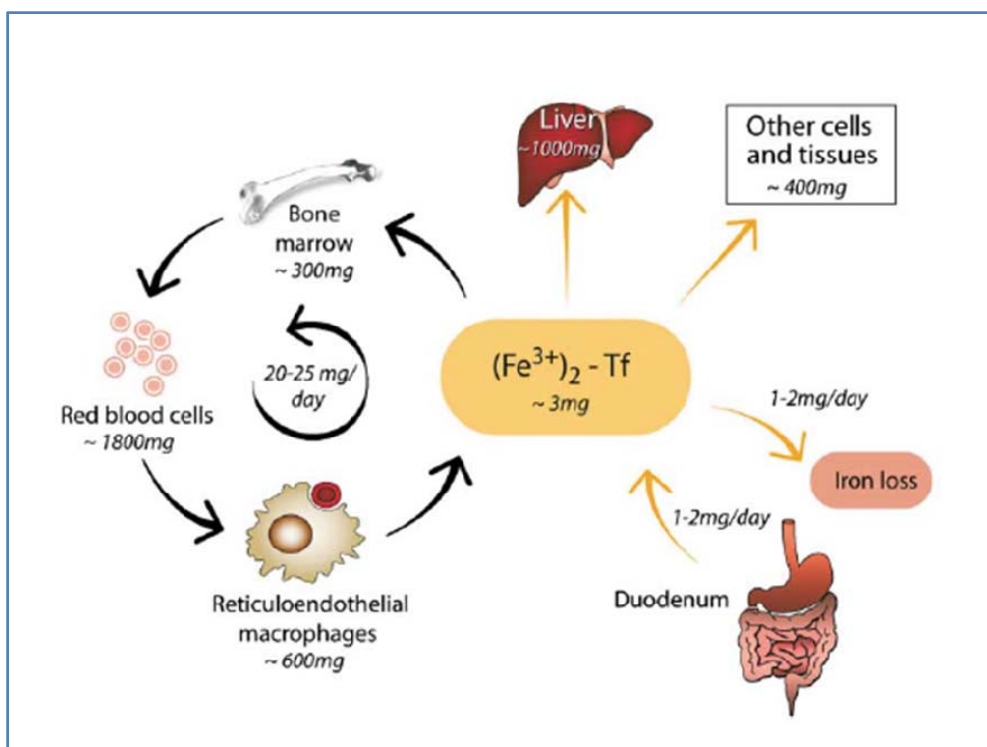
κυτταρικού μεταβολισμού. Για το λόγο αυτό, τόσο σε κυτταρικό επίπεδο, όσο και στο επίπεδο του οργανισμού, έχουν αναπτυχθεί πολύπλοκοι και σύνθετοι μηχανισμοί ομοιοστασίας του σιδήρου (Hentze et al., 2004).

1.1.2 Κατανομή του σιδήρου και ημερήσιο ισοζύγιο

Ο φυσιολογικός ενήλικας έχει συνολικά 3-5 g σιδήρου. Από αυτά, περίπου 65-75% βρίσκονται στην αιμοσφαιρίνη των κυττάρων της ερυθράς σειράς με τη μορφή της αίμης, ενώ 3-4% είναι προσδεμένα στην αίμη της μυοσφαιρίνης. Περίπου 10-20% του συνολικού σιδήρου αποθηκεύεται στο ήπαρ με τη μορφή της φερριτίνης, από όπου μπορεί άμεσα να κινητοποιηθεί προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για τις ανάγκες του οργανισμού. Ο υπόλοιπος σίδηρος είναι κατανεμημένος στο δικτυοενδοθηλιακό σύστημα, στα κυττοχρώματα και σε άλλα πρωτεϊνικά σύμπλοκα των ιστών (Zhang, 2010).

Η καθημερινή παραγωγή 200 δισεκατομμυρίων ερυθροκυττάρων απαιτεί 20-30 mg σιδήρου και βασίζεται στην ανακύκλωση του σιδήρου μέσω του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος. Τα γερασμένα και κατεστραμμένα ερυθροκύτταρα φαγοκυτταρώνονται από τα μακροφάγα και ο σίδηρος που απελευθερώνεται από την αίμη αποδίδεται στο πλάσμα, όπου συνδέεται με την τρανσφερρίνη για να μεταφερθεί και να αποδοθεί στους ερυθροβλάστες του μυελού (Fleming, 2008) Καθώς η συνολική ποσότητα του σιδήρου που κυκλοφορεί στο πλάσμα προσδεμένος στην τρανσφερρίνη είναι μόλις 3 mg, η κάλυψη των καθημερινών αναγκών της ερυθροποίησης εξασφαλίζεται με την ανακύκλωση της τρανσφερρίνης πάνω από 10 φορές ημερησίως. Έχει υπολογιστεί ότι ένα άτομο σιδήρου που προσδένεται στην τρανσφερρίνη, θα παραμείνει στην κυκλοφορία για μόλις 90 λεπτά πριν χρησιμοποιηθεί από τους ερυθροβλάστες του μυελού των οστών (Cavill, 2002).

Η εντερική απορρόφηση, η οποία, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, επαρκεί για να καλύψει τις καθημερινές απώλειες σιδήρου μέσω της επιθηλιακής αποφολίδωσης, του ιδρώτα και της λειτουργικής ή μη αιμορραγίας, είναι περίπου 1-2 mg (Andrews, 1999).



Εικόνα 1.1: Ομοιοστασία του σιδήρου στον ανθρώπινο οργανισμό. Αναφέρονται οι βασικές οδοί στη διακίνηση του σιδήρου μεταξύ κυττάρων και ιστών. Σημειώνονται τα φυσιολογικά επίπεδα του σιδήρου στα διαφορετικά όργανα, καθώς και η ποσότητα του σιδήρου που απορροφάται και διακινείται καθημερινά (Hentze et al., 2004).

1.1.3 Απορρόφηση και διακίνηση του σιδήρου στο πλάσμα και τους ιστούς

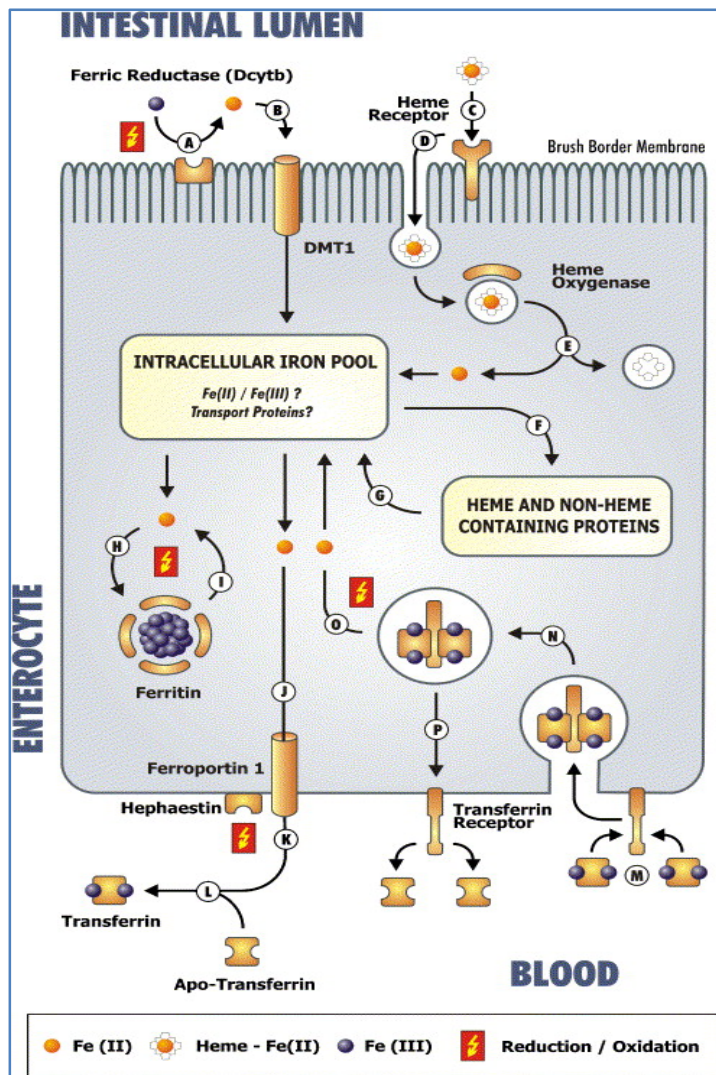
1.1.3.1 Απορρόφηση του σιδήρου

Η απορρόφηση του σιδήρου γίνεται από τα επιθηλιακά κύτταρα του δωδεκαδακτύλου και του πρώτου τμήματος της νήσιδας. Η εντερική απορρόφηση υπό φυσιολογικές συνθήκες καλύπτει τις καθημερινές απώλειες σιδήρου, και είναι της τάξης των 1-2 mg σιδήρου ημερησίως. Καθώς δεν υπάρχει μηχανισμός ρύθμισης της απέκκρισης του σιδήρου, η διατήρηση της ομοιοστασίας του βασίζεται στη ρύθμιση της εντερικής του απορρόφησης (Han, 2011). Ο σίδηρος προσφέρεται για απορρόφηση είτε ως ανόργανος

σίδηρος, είτε συνδεδεμένος με την αίμη. Ο μηχανισμός απορρόφησης είναι πολύπλοκος, επακριβώς ελεγχόμενος και διαφορετικός για τις δύο μορφές.

Ο ανόργανος σίδηρος αποτελεί το 90% περίπου του σιδήρου των τροφών και βρίσκεται κυρίως στην οξειδωμένη, μη διαλυτή και μη βιοδιαθέσιμη μορφή του (Fe^{3+}). Προκειμένου να απορροφηθεί, ο σίδηρος πρέπει να αναχθεί σε δισθενή (Fe^{2+}) και σε αυτό συμβάλλει το όξινο περιβάλλον του στομάχου και οι οξειδοαναγωγάσες (όπως η οξειδοαναγωγή του δωδεκαδακτυλικού κυτοχρώματος b – Dcytb) που βρίσκονται στην εντερική επιφάνεια των εντεροκυττάρων (McKie et al., 2001). Το χαμηλό pH του στομάχου συμβάλλει στην απορρόφηση του σιδήρου, απελευθερώνοντας τον από τις τροφές και διατηρώντας τον σε διαλυτή μορφή μέσω της δέσμευσής του από μόρια όπως οι αμίνες, τα αμινοξέα και οι υδατάνθρακες. Η παρατεταμένη αχλωρυδρία οδηγεί σε σιδηροπενία, κυρίως σε δίαιτες φτωχές σε σίδηρο. Σε πρόσφατες έρευνες φαίνεται ότι το pH του δωδεκαδακτύλου επηρεάζει σημαντικά τα επίπεδα σιδήρου μόνο όταν η περιεκτικότητά του στη δίαιτα είναι χαμηλή (Gkouvatsos et al., 2012).

Ο δισθενής σίδηρος μεταφέρεται στο εσωτερικό των εντεροκυττάρων μέσω μιας διαμεμβρανικής πρωτεΐνης που ονομάζεται μεταφορέας δισθενών μετάλλων 1 (divalent metal transporter 1, DMT1) και εντοπίζεται στην ψηκτροειδή παρυφή τους. Ο DMT1 μπορεί να μεταφέρει και άλλα δισθενή μόρια (όπως π.χ. χαλκό, ψευδάργυρο και μαγγάνιο) μαζί με ένα πρωτόνιο στο εσωτερικό των κυττάρων. Μεταλλάξεις στο γονίδιο του DMT1 σε ποντίκια ευθύνονται για την ανάπτυξη μικροκυτταρικής αναιμίας. Ο DMT1 βρίσκεται και στην επιφάνεια των ενδοσωμάτιων όλων των κυττάρων και εμπλέκεται επίσης στην επαναπορρόφηση του Fe^{2+} στο νεφρό και στη μεταφορά του σιδήρου στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Ο ρόλος του στη μεταφορά ανόργανου σιδήρου είναι καθοριστικός και είναι ο μόνος έως τώρα γνωστός εισαγωγέας ανόργανου σιδήρου στον οργανισμό (Hentze, 2004)



Εικόνα 1.2: Απορρόφηση του σιδήρου από το εντεροκύτταρο. Ο ανόργανος σίδηρος απορροφάται μέσω του υποδοχέα DMT1 και εξάγεται από στο πλάσμα μέσω της φερροπορτίνης. Η αίμη εισάγεται στο κυτταρόπλασμα πιθανόν μέσω του HPC1 (heme carrier protein 1) και ο σίδηρος απελευθερώνεται μέσω της δράσης της οξυγενάσης της αίμης (Walczyk and Blanckenburg, 2005).

Στη συνέχεια, ο ανόργανος σίδηρος είτε μεταφέρεται στο πλάσμα για να χρησιμοποιηθεί σύμφωνα με τις ανάγκες του οργανισμού, είτε αποθηκεύεται στη φερριτίνη. Οι ακριβείς μηχανισμοί μέσω των οποίων ο σίδηρος μεταφέρεται εντός του κυτταροπλάσματος δεν έχουν πλήρως διευκρινισθεί. Η έξοδος του σιδήρου στο πλάσμα γίνεται μέσω μιας πρωτεΐνης-μεταφορέα που βρίσκεται στη βασικοτελική μεμβράνη των εντεροκυττάρων, της φερροπορτίνης. Η φερροπορτίνη (Ferroportin, FPN1 ή Iron regulatory protein 1, IREG1) είναι ο μόνος γνωστός εξαγωγέας σιδήρου

και ανήκει και αυτή στην οικογένεια των πρωτεϊνικών μεταφορέων SLC (SLX40A1) (Donovan et al., 2000; McKie et al., 2000). Εκτός από τα εντεροκύτταρα, η φερροπορτίνη ανευρίσκεται και στα μακροφάγα, τα ηπατοκύτταρα και τους τροφοβλάστες του πλακούντα. Η εξάλειψη σε ποντίκια και των δύο αλληλίων που κωδικοποιούν για τη φερροπορτίνη οδηγεί σε εμβρυικό θάνατο (Donovan et al., 2005). Επομένως, η φερροπορτίνη είναι απαραίτητη για την πρόσληψη του σιδήρου στον οργανισμό.

Για την έξοδο του σιδήρου από τα εντεροκύτταρα μέσω της φερροπορτίνης και την πρόσληψή του από την αποτρανσφερρίνη στο πλάσμα απαραίτητη είναι η οξειδωσή του από Fe^{2+} σε Fe^{3+} . Υπεύθυνη για την οξειδωση αυτή είναι η ηφαιστίνη (Hephaestin, Heph), μια οξειδοαναγωγάση της βασικοτελικής μεμβράνης των εντεροκυττάρων. Ποντίκια στα οποία έχει εξαλειφθεί το γονίδιο που κωδικοποιεί την ηφαιστίνη παρουσιάζουν σιδηροπενική αναιμία, με αυξημένο σίδηρο στα επιθηλιακά εντερικά κύτταρα (Vulpe et al., 1999). Ομόλογη της ηφαιστίνης στο πλάσμα είναι η πρωτεΐνη σερουλοπλασμίνη (Ceruloplasmin, Cp) (Harris et al., 1999). Ο ρόλος της είναι η οξειδωση του σιδήρου που εξάγεται από τη φερροπορτίνη των ηπατοκυττάρων, των μακροφάγων και των τροφοβλαστών του πλακούντα για να προσληφθεί από την αποτρανσφερρίνη. Μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί τη σερουλοπλασμίνη οδηγούν σε αναστολή της σύνθεσής της με αποτέλεσμα την εναπόθεση σιδήρου στα μακροφάγα, στα ηπατοκύτταρα και στα κύτταρα του κεντρικού νευρικού συστήματος. Άνθρωποι και ποντίκια με ασερουλοπλασμιναιμία παρουσιάζουν σιδηροπενική αναιμία και σοβαρές νευροεκφυλιστικές εκδηλώσεις (Hentze et al., 2004).

Ο μηχανισμός απορρόφησης του σιδήρου που είναι συνδεδεμένος με την αίμη δεν έχει ακόμα πλήρως διευκρινισθεί. Η αιμοσφαιρίνη διασπάται ενζυμικά στον εντερικό αυλό και στη συνέχεια εισέρχεται στα εντεροκύτταρα μέσω ενός ειδικού μεμβρανικού μεταφορέα της αίμης. Το ρόλο αυτό παίζει πιθανότατα η πρωτεΐνη HCP1 (heme carrier protein 1) (Shayeghi et al., 2005), η οποία όμως λειτουργεί και ως μεταφορέας του φυλλικού οξέος, αφού μεταλλάξεις στο γονίδιο HCP1 οδηγούν σε μεγαλοβλαστική αναιμία λόγω έλλειψης φυλλικού οξέος (Qiu et al., 2006). Η απορρόφηση της αίμης από τα

επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου γίνεται είτε άμεσα μέσω της ψηκτροειδούς μεμβράνης είτε με ενδοκύτωση μέσω πρόσδεσής της με υποδοχείς της μεμβράνης. Στο εσωτερικό των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων η αίμη διασπάται από το ένζυμο οξυγενάση της αίμης (heme oxygenase, HO1), οπότε ο σίδηρος αποσπάται από την αίμη και ακολουθεί την οδό απορρόφησης του ανόργανου σιδήρου, που ήδη περιγράφηκε. Είναι εξίσου πιθανό, ότι το μόριο της αίμης μεταφέρεται αδιάσπαστο μέσω ενός εξαγωγέα της αίμης (FLVCR- feline leukemia virus, subgroup C receptor) στη βασικοτελική μεμβράνη των εντεροκυττάρων και αποδίδεται στο πλάσμα, όπου συνδέεται με την αιμοπεξίνη (hemopexin-Hpx) (Gkouvatsos et al., 2012). Ο FLVCR έχει εντοπιστεί και στη μεμβράνη των ερυθροβλαστών. Ποντίκια που δεν εκφράζουν τον FLVCR αναπτύσσουν σοβαρή μακροκυτταρική αναιμία, λόγω αναστολής της ωρίμανσης της ερυθράς σειράς στο στάδιο του προερυθροβλάστη (Keel et al., 2008).

1.1.3.2 Διακίνηση του σιδήρου στο πλάσμα

Ο σίδηρος μεταφέρεται στο πλάσμα προσδεμένος στην τρανσφερρίνη, μια γλυκοπρωτεΐνη 80kDa που συντίθεται κυρίως στο ήπαρ. Κάθε μόριο αποτρανσφερρίνης προσλαμβάνει δύο άτομα τρισθενούς σιδήρου (Fe^{3+}) και μετατρέπεται σε τρανσφερρίνη, η οποία, με τη σειρά της, αποδίδει το σίδηρο στα κύτταρα μέσω των υποδοχέων της τρανσφερρίνης. Η τρανσφερρίνη, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, διατηρεί τον τρισθενή σίδηρο σε διαλυτή μορφή στο πλάσμα και συμβάλλει στη ρύθμιση της μεταφοράς και πρόσληψης του σιδήρου από τα κύτταρα. Επιπλέον, προσλαμβάνει τον ελεύθερο σίδηρο στο πλάσμα, αποτρέποντας τη δημιουργία ελευθέρων ριζών. Ο κορεσμός της τρανσφερρίνης (το ποσοστό της κυκλοφορούσας τρανσφερρίνης που είναι συνδεδεμένη με Fe^{3+}) είναι δείκτης των αποθηκών σιδήρου του οργανισμού, και συγχρόνως αντανακλά τη σχέση μεταξύ του σιδήρου που απελευθερώνεται από το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα και της πρόσληψής του από το μυελό των οστών για τις ανάγκες της ερυθροποίησης. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο κορεσμός τρανσφερρίνης στον άνθρωπο είναι περίπου 30%. Τιμές μικρότερες του 15% υποδηλώνουν σιδηροπενία, ενώ η

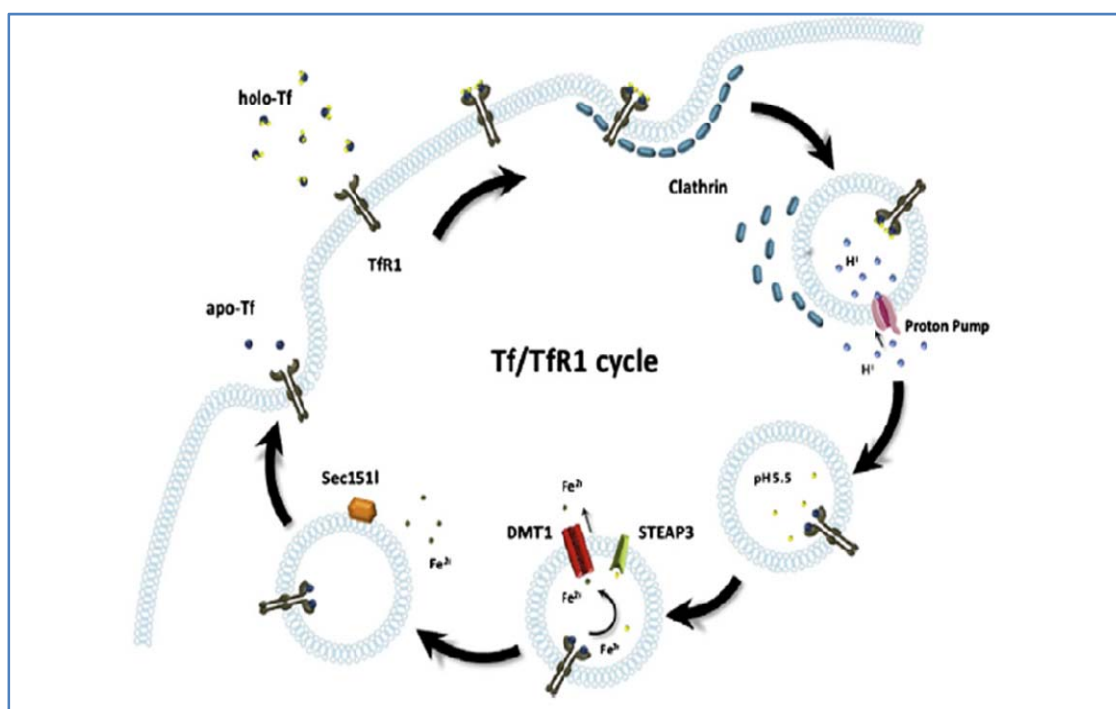
αύξηση πάνω από 45% σημειώνεται σε καταστάσεις υπερφόρτωσης σιδήρου (Hentze et al., 2004; Hentze et al., 2010).

1.1.3.3 Πρόσληψη του σιδήρου από τα κύτταρα των ιστών

Η πρόσληψη του σιδήρου από τα κύτταρα της ερυθράς σειράς και λοιπά κύτταρα πραγματοποιείται μέσω της πρόσδεσης του συμπλόκου σιδήρου-τρανσφερρίνης ($[\text{Fe}^{3+}]_2 - \text{Tf}$) στους υποδοχείς τρανσφερρίνης που βρίσκονται στην επιφάνειά τους. Λόγω της δυσκολίας αποσύνδεσης του σιδήρου από το μόριο της τρανσφερρίνης, το σύμπλοκο προσδένεται στους υποδοχείς και ενδοκυττώνεται αυτούσιο. Ο βασικός υποδοχέας που μετέχει σε αυτή τη διαδικασία είναι ο TfR1 (Transferrin Receptor 1), που είναι και ο καλύτερα μελετημένος υποδοχέας (Pnka, 1999; Cheng et al., 2004; Aisen, 2004). Πρόκειται για ένα διμερή διαμεμβρανικό υποδοχέα που αποτελείται από δύο όμοιες υπομονάδες. Το κάθε μόριο του TfR1 συνδέεται με δύο μόρια τρανσφερρίνης. Η συγγένεια με την οποία συνδέεται η τρανσφερρίνη αυξάνει ανάλογα με τα άτομα σιδήρου που είναι προσδεμένα με αυτήν. Έτσι η ολοτρανσφερρίνη ($[\text{Fe}^{3+}]_2 - \text{Tf}$) έχει έως και 500 φορές μεγαλύτερη συγγένεια για τον TfR1 σε σχέση με την αποτρανσφερρίνη (μη συνδεδεμένη με σίδηρο τρανσφερρίνη) (Gkouvatsos et al., 2012). Ο TfR1 εκφράζεται στα περισσότερα ευκαρυωτικά κύτταρα και η έκφρασή του αυξάνεται ανάλογα με τις ανάγκες για σίδηρο, όπως παρατηρείται στα κύτταρα του πλακούντα, τα εντεροκύτταρα, τα καρκινικά κύτταρα και, κυρίως, στους ερυθροβλάστες (erythroid precursors). Η εξάλειψη του TfR1 σε ποντίκια οδηγεί σε βαριά αναιμία, νευρολογικές διαταραχές και τελικά σε θάνατο κατά την εμβρυϊκή ηλικία, γεγονός που υπογραμμίζει τη σημασία του στην πρόσληψη του σιδήρου. Ετεροζυγωτία για τον TfR1 σε ποντίκια οδηγεί σε βαριά υπόχρωμη μικροκυτταρική αναιμία (Levy et al., 1999).

Όταν το σύμπλοκο ($[\text{Fe}^{3+}]_2 - \text{Tf}$) προσδεθεί στον TfR1, υποδοχέας και σύμπλοκο ενδοκυττώνονται μέσα σε κυστίδια που καλύπτονται με κλαθρίνη. Στη συνέχεια, το pH των κυστιδίων μειώνεται μέσω αντλίας πρωτονίων που βρίσκεται στην επιφάνειά τους και το όξινο περιβάλλον (pH 5,5) επιφέρει την

απελευθέρωση του Fe^{3+} από την τρανσφερρίνη. Η μεταφορά του σιδήρου στο κυτταρόπλασμα γίνεται και εδώ μέσω του DMT1 στην επιφάνεια των κυστιδίων (Fleming et al., 1998). Για τη διακίνηση αυτή, ο τρισθενής σίδηρος πρέπει να αναχθεί σε δισθενή. Στην αναγωγή αυτή συμβάλλει η σιδηροαναγωγάση STEAP3 (six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 3) (Ohgami et al., 2005). Έπειτα, το σύμπλοκο της αποτρανσφερρίνης με τον TfR1 επανέρχεται στην κυτταρική μεμβράνη, όπου η αποτρανσφερρίνη αποδεσμεύεται και επιστρέφει στο πλάσμα για να επαναχρησιμοποιηθεί.



Εικόνα 1.3: Πρόσληψη του σιδήρου μέσω του συμπλόκου σιδήρου-τρανσφερρίνης – Ο κύκλος της τρανσφερρίνης. Το σύμπλοκο σιδήρου-τρανσφερρίνης προσδένεται στον υποδοχέα TfR1, ενδοκυττώνεται και μέσω της δημιουργίας όξινου περιβάλλοντος εντός των κυστιδίων κλαθρίνης, ο σίδηρος (Fe^{3+}) απελευθερώνεται από την τρανσφερρίνη. Ανάγεται σε Fe^{2+} μέσω της δράσης της STEAP3 και εισάγεται στο κυτταρόπλασμα μέσω του DMT1. Η αποτρανσφερρίνη και ο TfR1 ανακυκλώνονται για να χρησιμοποιηθούν στον επόμενο κύκλο τρανσφερρίνης (Gkouvatsos et al., 2012).

Ο δεύτερος γνωστός υποδοχέας της τρανσφερρίνης, ο TfR2, εκφράζεται κυρίως στα ηπατοκύτταρα. Η συγγένεια της ολοτρανσφερρίνης για τον TfR2 είναι τουλάχιστον 25 φορές μικρότερη από αυτή για τον TfR1 (Kawabata et al., 1999). Ο ρόλος του TfR2 στην πρόσληψη σιδήρου από τα κύτταρα δε φαίνεται να είναι τόσο σημαντικός. Ωστόσο, μεταλλάξεις στο γονίδιο του TfR2 δεν επηρεάζουν την πρόσληψη σιδήρου, αντίθετα οδηγούν σε υπερφόρτωση του οργανισμού με σίδηρο (Camaschella et al., 2000). Το γεγονός ότι ο μεταλλαγμένος TfR2 προκαλεί αιμοχρωμάτωση υποδηλώνει το σημαντικό ρόλο του υποδοχέα αυτού στη ρύθμιση της ομοιοστασίας του σιδήρου.

Μοριακές και γενετικές μελέτες υποστηρίζουν την ύπαρξη και άλλων ανεξάρτητων οδών πρόσληψης σιδήρου από τα κύτταρα, εκτός από τον κύκλο της τρανσφερρίνης. Τα μακροφάγα προσλαμβάνουν μεγάλες ποσότητες σιδήρου μέσω φαγοκύτωσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων, ενώ στην ενδαγγειακή αιμόλυση η αιμοσφαιρίνη συνδέεται με τις απτοσφαιρίνες και η ελεύθερη αίμη από την αιμοπεξίνη, που στη συνέχεια προσλαμβάνονται από τα μακροφάγα (Hentze et al., 2004; Gkounatsos et al., 2012). Σε καταστάσεις υπερφόρτωσης σιδήρου, ο ελεύθερος σίδηρος (NTBI - non transferrin bound iron) μεταφέρεται στα παρεγχυματικά κύτταρα μέσω οδών ανεξαρτήτων της τρανσφερρίνης. Παρόλο που οι ακριβείς μηχανισμοί δεν έχουν ακόμα περιγραφεί, είναι πιθανό ότι σημαντικό ρόλο στη μεταφορά αυτή παίζουν ο μεταφορέας ψευδαργύρου Zip 14 στο ήπαρ (Zhao et al., 2010), οι δίαυλοι ασβεστίου LVD (LVDCCL-type voltage-dependent calcium channels) στα καρδιομυοκύτταρα (Oudit et al., 2003), η λιποκαλίνη 2 (Lcn2) και ο υποδοχέας 24p3R στο νεφρό (Devireddy et al., 2005). Έχει, επίσης, περιγραφεί η πρόσληψη μέσω ενδοκύτωσης μορίων φερριτίνης συνδεδεμένα με σίδηρο, κυρίως σε παθολογικές καταστάσεις όπου υπάρχει ιστική και κυτταρική καταστροφή (Chen et al., 2005; Li et al., 2009).

1.1.4 Ομοιοστασία του σιδήρου στον οργανισμό – Ο ρόλος της εψιδίνης

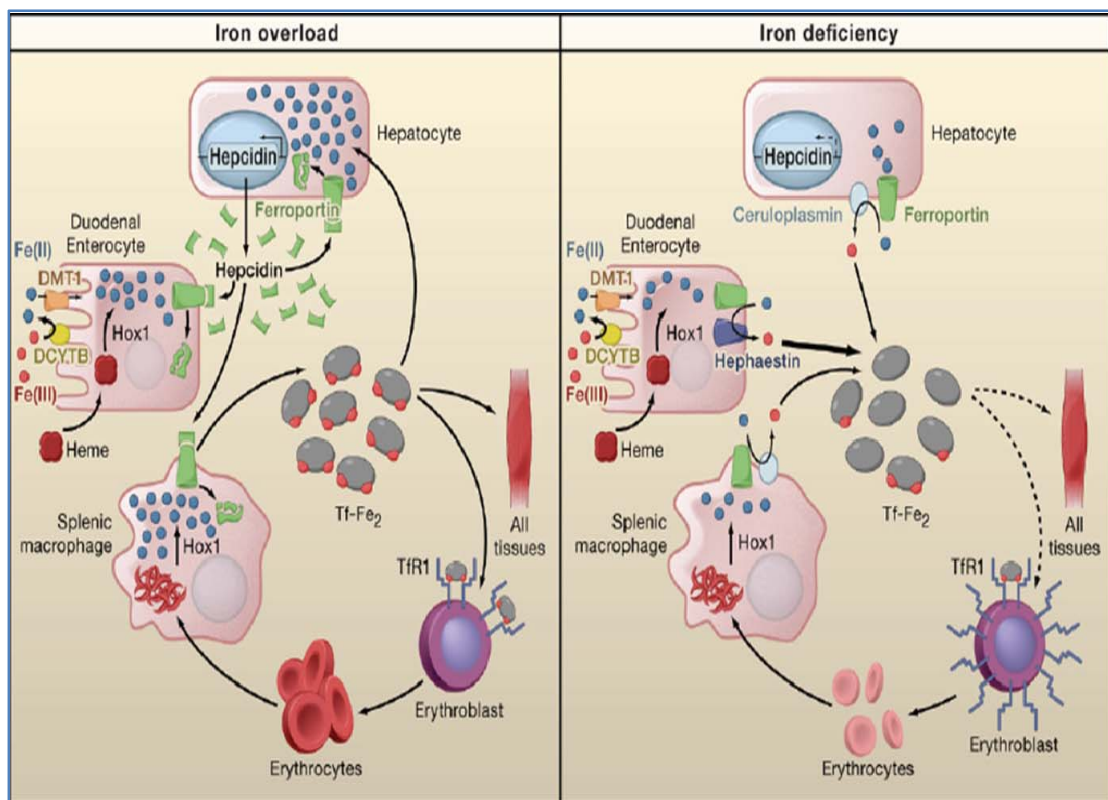
Η ρύθμιση των επιπέδων του σιδήρου στον άνθρωπο είναι απαραίτητη προκειμένου να καλύπτονται οι ανάγκες του οργανισμού, αλλά συγχρόνως να προλαμβάνεται η τοξική του δράση όταν αυτός βρίσκεται σε περίσσεια. Τόσο η ένδεια σιδήρου, όσο και η περίσσειά του οδηγούν σε παθολογικές καταστάσεις, όπως η αναιμία και η αιμοχρωμάτωση αντίστοιχα. Η ομοιοστασία του σιδήρου εξασφαλίζεται με έναν πολύπλοκο μηχανισμό ρύθμισης που δέχεται και επεξεργάζεται σήματα από τα κύτταρα και τους ιστούς σε συνδυασμό με ερεθίσματα από το μικροπεριβάλλον.

Στο μηχανισμό αυτό κεντρικό ρόλο έχει η εψιδίνη, μια πεπτιδική ορμόνη που ανακαλύφθηκε την τελευταία δεκαετία. Η εψιδίνη (hepcidin) είναι ένα πεπτίδιο αποτελούμενο από 25 αμινοξέα. Εκκρίνεται από τα ηπατοκύτταρα και κυκλοφορεί στο πλάσμα προσδεμένη στην α2-μακροσφαιρίνη. Η απέκκριση της γίνεται μέσω του νεφρού. Η εψιδίνη παράγεται σαν ένα πρόδρομο πεπτίδιο 84 αμινοξέων και στη συνέχεια διασπάται για να δώσει δύο ισομορφές 20 και 25 αμινοξέων, από τις οποίες μόνο η δεύτερη είναι βιολογικά δραστική. Το πεπτίδιο δημιουργεί μια δομή φουρκέτας και περιέχει τέσσερις διαμοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς (Krause et al., 2000; Park et al., 2001; Pigeon et al., 2001).

Η εψιδίνη δρα ρυθμίζοντας την ποσότητα της διαθέσιμης φερροπορτίνης. Με τη σύνδεση των δύο αυτών πρωτεϊνών και την ενδοκυττάρια ενεργοποίηση της κινάσης Janus 2 (Jak2), η φερροπορτίνη φωσφορυλιώνεται, μετατοπίζεται στο εσωτερικό του κυττάρου και στη συνέχεια αποδομείται με προτεόλυση (Nemeth et al., 2004; De Domenico et al., 2009). Με τον τρόπο αυτό η έξοδος του σιδήρου προς το πλάσμα αναστέλλεται και ο σίδηρος παραμένει μέσα στα εντεροκύτταρα για να αποπέσει με αυτά, ή μέσα στα μακροφάγα και τα ηπατοκύτταρα όπου αποθηκεύεται. Επομένως, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, η εψιδίνη δρα αντιστρόφως ανάλογα με τις ανάγκες του οργανισμού για σίδηρο, ως αρνητικός ρυθμιστής της απελευθέρωσης του σιδήρου. Η περίσσεια σιδήρου

προάγει την έκφρασή της, ενώ σε έλλειψη σιδήρου τα επίπεδά της μειώνονται δραστικά. Μελέτες σε υγιείς εθελοντές δείχνουν στενή συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της επιδίνης και του κορεσμού της τρανσφερρίνης (Lin et al., 2007).

Εκτός από τα επίπεδα σιδήρου, η έκφραση της επιδίνης ρυθμίζεται και από την υποξία, τη φλεγμονή και της ανάγκες του οργανισμού για ερυθροποίηση (Fleming et al., 2008). Οι ακριβείς μηχανισμοί με τους οποίους αναστέλλεται ή επάγεται η έκφραση της επιδίνης στις καταστάσεις αυτές δεν έχουν ακόμα πλήρως διευκρινισθεί.



Εικόνα 1.4: Η ρύθμιση της συστηματικής ομοιοστασίας του σιδήρου από την επιδίνη. Η συσσώρευση σιδήρου επάγει την έκφραση της επιδίνης, η οποία αναστέλλει τη δράση της φερροπορτίνης και την εξαγωγή σιδήρου από το εντεροκύτταρο, το μακροφάγο και το ηπατοκύτταρο. Σε ένδεια σιδήρου, ο σίδηρος εξάγεται μέσω της φερροπορτίνης για να καλύψει τις ανάγκες του οργανισμού. Η έκφραση της επιδίνης αναστέλλεται (Hentze et al., 2010).

1.1.4.1 Η ρύθμιση της έκφρασης της επιδίνης

Σε μοριακό επίπεδο η έκφραση της επιδίνης ρυθμίζεται από ένα πολύπλοκο σύστημα μιας ομάδας πρωτεϊνών που εκφράζονται και δρουν στο ηπατοκύτταρο. Σε αυτές περιλαμβάνονται η πρωτεΐνη της κληρονομικής αιμοχρωμάτωσης HFE, η αιμοτζουβελίνη (Hjv), ο υποδοχέας TfR2, οι πρωτεΐνες BMP, και κυρίως η BMP-6, η ματριπτάση-2, η νεογενίνη και η τρανσφερρίνη (Tf) (Zhang et al., 2010). Μεταλλάξεις στα αντίστοιχα γονίδια επηρεάζουν τη φυσιολογική έκφραση της επιδίνης, με αποτέλεσμα την υπερφόρτωση με σίδηρο ή την ανάπτυξη αναιμίας (Gkounatsos et al., 2012).

Σύμφωνα με τα όσα είναι μέχρι σήμερα γνωστά, η Hjv παίζει βασικό ρόλο στη ρύθμιση της επιδίνης. Η Hjv είναι μια πρωτεΐνη που αγκυρώνει στη μεμβράνη των ηπατοκυττάρων μέσω μιας ομάδας φωσφατιδιλοϊνοσιτόλης (GPI anchor) (Zhang et al., 2005). Κωδικοποιείται από το γονίδιο *HFE2* στο χρωμόσωμα 1q21 και εκφράζεται στα ηπατοκύτταρα, το μυοκάρδιο και τους σκελετικούς μυς (Paranikolaou et al., 2004). Μεταλλάξεις στο γονίδιο *HFE2* προκαλούν νεανική αιμοχρωμάτωση, μια κατάσταση που χαρακτηρίζεται από μεγάλη εναπόθεση σιδήρου σε παρεγχυματικά όργανα, όπως το ήπαρ, το μυοκάρδιο και το πάγκρεας, και από πολύ χαμηλή επιδίνη σε σχέση με το φορτίο σιδήρου (De Gobbi et al., 2002; Lanzara et al., 2004). Παρόμοια κλινική εικόνα παρατηρείται τόσο σε ανθρώπους όσο και σε ποντίκια που δεν εκφράζουν Hjv ή επιδίνη (λόγω μεταλλάξεων στα αντίστοιχα γονίδια) (Huang et al., 2005), γεγονός που αναδεικνύει την Hjv ως κύριο διαβιβαστή σήματος στο ηπατοκύτταρο για την παραγωγή επιδίνης. Μελέτες σε ποντίκια έδειξαν ότι τα επίπεδα του mRNA της Hjv δεν επηρεάζουν την έκφραση της επιδίνης, και αρκούν έως και 15% των φυσιολογικών επιπέδων Hjv mRNA για την παραγωγή της (Zhang et al., 2010). Η έκφραση της Hjv είναι ανεξάρτητη των επιπέδων σιδήρου (Krijt et al., 2004) και μεταλλάξεις στο ένα από τα δύο αλληλίου του γονιδίου *HFE2* (Paranikolaou et al., 2004) ή εξάλειψη του ενός αλληλίου σε ποντίκια δεν επηρεάζουν την ομοιοστασία του σιδήρου (Huang et al., 2005).

Η Hjv επάγει την έκφραση της επιδίνης μέσω της δράσης της ως συνυποδοχέας για τις οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες (BMP) στην

επιφάνεια των ηπατοκυττάρων και ενεργοποιώντας την οδό μεταγωγής του σήματος τους (Fleming, 2008). Οι πρωτεΐνες BMP προσδένονται στους αντίστοιχους υποδοχείς (bone morphogenetic protein receptors-BMPR) στην επιφάνεια των κυττάρων και τους ενεργοποιούν, και αυτοί με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν τις πρωτεΐνες SMAD1,5,8 στο εσωτερικό του κυττάρου. Οι φωσφορυλιωμένες SMAD (pSMAD) δημιουργούν διμερή με τη SMAD4, τα οποία εισέρχονται στον πυρήνα, προσδένονται στον εκκινητή του γονιδίου της επιδίνης και επάγουν τη μεταγραφή της (Zhang and Enns, 2009; Gkouvatsos et al., 2012). Χαρακτηριστικά, σε ποντίκια τα οποία δεν εκφράζουν τη SMAD4, η έκφραση της επιδίνης μειώνεται δραστικά και παρατηρείται βαριά υπερφόρτωση σιδήρου (Wang et al., 2005).

Η Hjn δρα ως συνυποδοχέας των BMP2, 4, 5, 6, φαίνεται όμως ότι η BMP6 παίζει το σημαντικότερο ρόλο στην ομοιοστασία του σιδήρου και τη ρύθμιση της επιδίνης. Μελέτες σε ποντίκια δείχνουν ότι τα επίπεδα του BMP6 mRNA έχουν άμεση συσχέτιση με τα επίπεδα σιδήρου και επιδίνης (Kautz et al., 2008), ενώ σε ποντίκια που έχει εξαλειφθεί το γονίδιο της BMP6 παρατηρείται έλλειψη επιδίνης και βαριά υπερφόρτωση σιδήρου, δηλαδή φαινότυπος παρόμοιος με αυτόν της απουσίας λειτουργικής Hjn ή επιδίνης (Andriopoulos et al., 2009; Meynard et al., 2009). Επομένως, η BMP 6 έχει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση παραγωγής της επιδίνης και, αντίθετα με άλλες BMP πρωτεΐνες και τη Hjn, η έκφραση της BMP6 επηρεάζεται άμεσα από τα επίπεδα σιδήρου στο ηπατοκύτταρο, ανεξάρτητα από την παρουσία ή μη Hjn. Η παρουσία Hjn είναι απαραίτητη για τη σύνθεση της επιδίνης. Σε ποντίκια που δεν εκφράζουν Hjn, παρά την αύξηση του BMP6 mRNA, δεν παρατηρήθηκε ανάλογη αύξηση των επιπέδων της επιδίνης με το φορτίο του σιδήρου τους (Zhang et al., 2010).

Εκτός από τη μεμβρανική της μορφή, η Hjn υπάρχει και ως διαλυτή πρωτεΐνη στο πλάσμα (soluble Hjn- sHjn). Παράγεται μέσω της δράσης της πρωτεάσης φουρίνης και είναι πιθανό να εκκρίνεται από τα σκελετικά μυϊκά κύτταρα, χωρίς αυτό να έχει πλήρως αποδειχθεί. Η sHjn ανταγωνίζεται τη σύνδεση των BMP με τη μεμβρανική Hjn, και επομένως δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της έκφρασης της επιδίνης. Συγχρόνως, η έκφραση της φουρίνης ρυθμίζεται από τα επίπεδα σιδήρου και την υποξία, γεγονός που ενισχύει τη

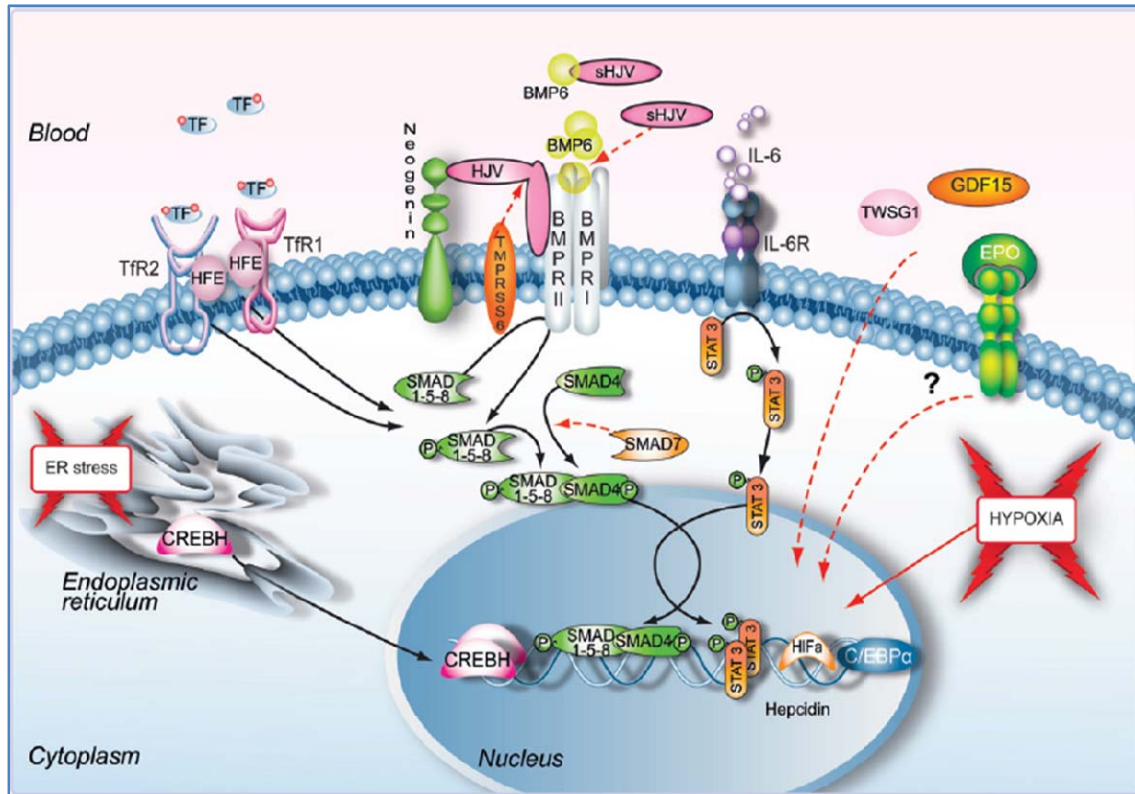
δράση της sHjn σε καταστάσεις αυξημένων αναγκών του οργανισμού για σίδηρο (Hentze et al., 2010; Zhang et al., 2010).

Μια άλλη πρωτεΐνη που εκφράζεται στο ήπαρ και παίζει σημαντικό ρόλο στην ομοιοστασία του σιδήρου είναι η ματριπτάση-2 (Babitt et al., 2007). Πρόκειται για μια πρωτεάση που κωδικοποιείται από το γονίδιο *TMPRSS6* και αναστέλλει τη σύνθεση της εψιδίνης, τροποποιώντας τη λειτουργία της μεμβρανικής Hjn. Έτσι, η έκφραση της ματριπτάσης-2 αυξάνει στην υποξία και στην έλλειψη σιδήρου, ενώ όταν χορηγήθηκε BMP6 ή σίδηρος σε ποντίκια παρατηρήθηκε αύξηση της ματριπτάσης-2 (Gkounatsos et al., 2012). Μεταλλάξεις στο γονίδιο *TMPRSS6* προκαλούν τη σιδηροπενική σιδηροανθεκτική αναιμία γνωστή ως IRIDA (iron-refractory iron deficiency anemia) (Finberg et al., 2008).

Η νεογενίνη, μια πρωτεΐνη που εκφράζεται από τα ηπατοκύτταρα και ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών που εξαλείφονται στον ορθοκολικό καρκίνο, μετέχει στην ομοιοστασία του σιδήρου ως σταθεροποιητής της Hjn. Με τον τρόπο αυτό επάγει έμμεσα την έκφραση της εψιδίνης (Hentze et al., 2010; Zhang et al., 2010). Ποντίκια στα οποία δεν εκφράζεται η νεογενίνη έχουν υψηλό φορτίο σιδήρου, χαμηλή εψιδίνη και χαμηλή μεταγωγή σήματος μέσω των BMP (Lee et al., 2010).

Σύμφωνα με τα όσα είναι μέχρι σήμερα γνωστά, τα επίπεδα σιδήρου στην κυκλοφορία ρυθμίζουν την έκφραση της εψιδίνης μέσω των πρωτεϊνών HFE και των υποδοχέων της τρανσφερρίνης TfR1 και TfR2. Ανάλογα με τον κορεσμό της τρανσφερρίνης, η HFE προσδένεται είτε με τον TfR1 είτε με τον TfR2. Όταν η συγκέντρωση της τρανσφερρίνης είναι χαμηλή, η HFE συνδέεται με τον TfR1 και η σηματοδοτική οδός της εψιδίνης δεν ενεργοποιείται. Με την αύξηση της ολοτρανσφερρίνης και την πρόσδεσή της στον TfR1, ο HFE αποδεσμεύεται και προσδένεται στον TfR2. Το σύμπλοκο HFE/TfR2 επάγει την έκφραση της εψιδίνης, αλλά οι ακριβείς ενδοκυττάρειες οδοί μέσω των οποίων επιτελείται αυτή η ενεργοποίηση δεν είναι γνωστοί. Είναι πιθανό ότι οι πρωτεΐνες HFE και TfR2 μετέχουν στην ενεργοποίηση των πρωτεϊνών SMAD, χωρίς να επηρεάζουν την έκφραση της BMP6. Έχει επίσης προταθεί ότι

χρησιμοποιούν και τη σηματοδοτική οδό ERK/MAPK, ανεξάρτητα από αυτή των SMAD (Fleming et al., 2008; Gkouvatsos et al., 2012).



Εικόνα 1.5: Οι σηματοδοτικές οδοί και οι παράγοντες ρύθμισης της έκφρασης της επιδίνης (*HAMP*) (Pietrangelo, 2011)

Η ερυθροποίηση ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση της επιδίνης προκειμένου η απαραίτητη ποσότητα σιδήρου να είναι διαθέσιμη για την παραγωγή των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Μέχρι σήμερα οι μηχανισμοί με τους οποίους η ερυθροποίηση ρυθμίζει την παραγωγή της επιδίνης δεν έχουν πλήρως διαλευκανθεί. Η υποξία δρα επίσης κατασταλτικά στην έκφραση της επιδίνης. Και εδώ οι ακριβείς μηχανισμοί δεν είναι ακόμα γνωστοί. Παράγοντες όπως οι HIF1 και HIF2 (hypoxia inducible factor 1 and 2) φαίνεται ότι αναστέλλουν την έκφραση του mRNA της επιδίνης, ενώ συγχρόνως η υποξία επάγει τη σύνθεση της ερυθροποιητίνης και την ερυθροποίηση και με αυτόν τον τρόπο αναστέλλει έμμεσα την παραγωγή επιδίνης (Zhang and Enns, 2009; Hentze et al., 2010).

Η φλεγμονή επηρεάζει τη σύνθεση της εψιδίνης μέσω της ενεργοποίησης του εκκινητή του γονιδίου της. Η ιντερλευκίνη 1 (IL-1) και 6 (IL-6) ενεργοποιούν την κινάση JAK (Janus kinase), η οποία στη συνέχεια ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι STAT (signal transducer and activator of transcription), με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του εκκινητή του γονιδίου της εψιδίνης και την έκφρασή της. Στο μηχανισμό μπορεί να συμμετέχει και η σηματοδοτική οδός BMP/SMAD. Τα σήματα από τα δύο μονοπάτια δρουν συγχρόνως στον εκκινητή της εψιδίνης, αλλά ανεξάρτητα το ένα από το άλλο. Η σημασία της επαγωγής της εψιδίνης μέσω της IL6 έχει ιδιαίτερη κλινική σημασία, η οποία και διαπιστώνεται στην αναιμία της χρόνιας νόσου (ACD-anemia of chronic disease) (Fleming 2008; Zhang and Enns, 2009; Gkouvatsos et al., 2012).

1.1.5 Η ενδοκυττάρια ομοιοστασία του σιδήρου

1.1.5.1 Διακίνηση, χρήση και αποθήκευση του σιδήρου μέσα στα κύτταρα

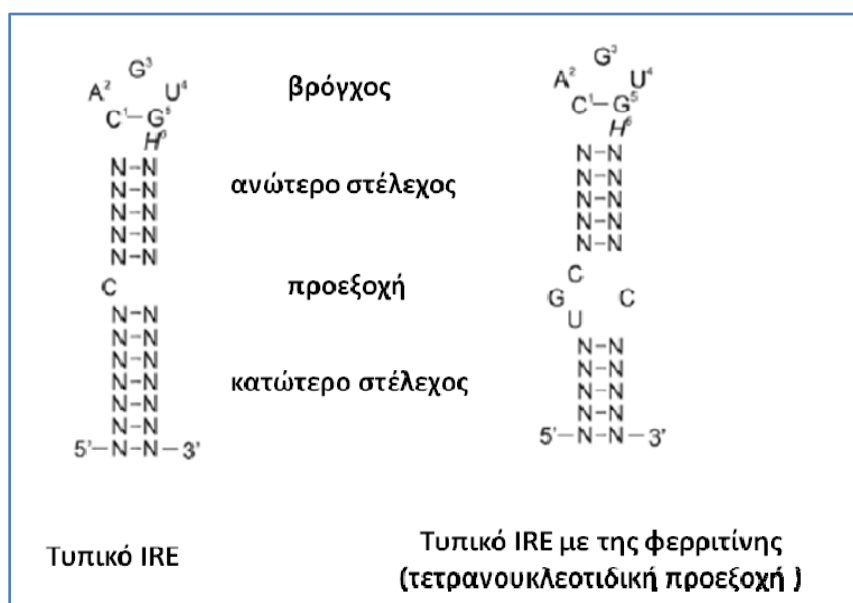
Με την έξοδό του από τα ενδοσωμικά κυστίδια μέσω του DMT1, ο σίδηρος εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα και μετέχει στην ασταθή δεξαμενή σιδήρου του κυττάρου (labile iron pool- LIP). Η LIP αποτελεί το 3-5% του συνολικού κυτταρικού σιδήρου (Gkounatsos et al., 2012) και είναι αντιπροσωπευτική αυτού. Αποτελείται από σίδηρο ο οποίος είναι οξειδοαναγωγικά ενεργός και ο οποίος πιθανότατα βρίσκεται συνδεδεμένος με χαμηλού μοριακού βάρους χηλικά μόρια, όπως π.χ. το ATP, το AMP, πεπτίδια, ή κιτρικό οξύ. Η αυξομείωση των επιπέδων της LIP ενεργοποιεί τους ενδοκυττάριους ομοιοστατικούς μηχανισμούς.

Ο σίδηρος από το κυτταρόπλασμα εισέρχεται στα μιτοχόνδρια, το βασικό εργαστήριο του κυττάρου, όπου χρησιμοποιείται κυρίως για την παραγωγή της αίμης και τη δημιουργία σιδηροθειούχων συμπλόκων (Fe-S clusters). Παρά την πληθώρα μελετών, ακόμα δεν είναι γνωστός ο τρόπος με τον οποίο ο σίδηρος διακινείται μέσα στο κύτταρο. Φαίνεται ότι για την εισαγωγή του στα μιτοχόνδρια σημαντικό ρόλο παίζει ο μεταφορέας της μιτοφερρίνης (Mfrn ή SLC25A37). Σε άλλες μελέτες, και κυρίως στα κύτταρα της ερυθράς σειράς, φαίνεται ότι υπάρχει και άμεση διακίνηση του σιδήρου μεταξύ των ενδοσωμικών κυστιδίων και των μιτοχονδρίων ("kiss and run" hypothesis). Ο σίδηρος που είναι σε περίσσεια αποθηκεύεται σαν αδρανής στα μόρια της φερριτίνης (βλ. Κεφάλαιο 1.2). Το κάθε μόριο φερριτίνης αποτελείται από 24 υπομονάδες ελαφρών (L-light) και βαριών (H-heavy) αλύσων. Στα μιτοχόνδρια υπάρχει ένα διαφορετικό ισομερές της φερριτίνης. Ο ρόλος της μιτοχονδριακής φερριτίνης έγκειται στην προστασία του οργανιδίου από την υπερσυσσώρευση σιδήρου και τις τοξικές της συνέπειες (Hentze et al., 2010).

1.1.5.2 Ρύθμιση της ομοιοστασίας του σιδήρου στο κύτταρο: Το σύστημα IRE / IRP

Οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην πρόσληψη, τη χρησιμοποίηση, την αποθήκευση και την εξαγωγή του σιδήρου από το κύτταρο πρέπει να ρυθμίζονται με ένα συντονισμένο τρόπο, προκειμένου να επιτυγχάνεται η ομοιοστασία του σιδήρου στο κύτταρο. Η ρύθμιση της συστηματικής ομοιοστασίας του σιδήρου στον οργανισμό γίνεται κυρίως σε μεταγραφικό (έκφραση της επιδίνης) και σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο (δράση της επιδίνης στη λειτουργία της φερροπορτίνης), όπως αναλυτικά περιγράφηκε παραπάνω. Η ενδοκυττάρια ομοιοστασία του σιδήρου βασίζεται κυρίως σε μετα-μεταγραφικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς, και κυρίως στην αλληλεπίδραση μεταξύ των σιδηρορυθμιστικών πρωτεϊνών IRP1 (Iron regulatory protein 1) και IRP2 (Iron regulatory protein 2) με τα σιδηροαποκριτικά στοιχεία (IRE – Iron responsive elements) των mRNA που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη μεταφορά, την αποθήκευση και τη χρήση του σιδήρου στο κύτταρο. Τα IRE είναι καλά συντηρημένες περιοχές στα μη μεταφραζόμενα τμήματα του mRNA των γονιδίων στόχων και παρουσιάζουν εξαιρετικά μεγάλη δομική ομοιότητα μεταξύ τους (Piccinelli and Samuelsson, 2007). Ένα IRE ορίζεται τόσο από τη δομή του όσο και από την αλληλουχία των βάσεων του RNA, και μπορεί να βρίσκεται είτε στην 5' είτε στην 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (UTR-untranslated region) του mRNA. Έχει δομή φουρκέτας και αποτελείται από τον εξανουκλεοτιδικό βρόγχο και το στέλεχος. Ο βρόγχος σχηματίζεται από τη συντηρημένη αλληλουχία βάσεων 5'-CAGUGN-3', ενώ το στέλεχος αποτελείται από 5 συζευγμένες βάσεις στο ανώτερο τμήμα του και ένα κομμάτι ποικίλου μεγέθους στο κατώτερο τμήμα (Hentze et al., 1988). Στο στέλεχος υπάρχει μια μικρή ασύμμετρη προεξοχή με μια μη συζευγμένη κυτοσίνη στο 5' άκρο ή μια ασύμμετρη προεξοχή τεσσάρων νουκλεοτιδίων, όπως συμβαίνει με το IRE της φερριτίνης (Εικόνα 1.6). Η αλληλουχία των βάσεων του στελέχους ποικίλει σημαντικά μεταξύ των IRE. Κάποια IRE, όπως αυτά του HIF2α (Hypoxia inducible factor 2α) και του DMT1 εμφανίζουν μη τυπική δομή, με μια πρόσθετη προεξοχή στο 3' άκρο του στελέχους (Muckenthaler et al., 2008). Η μεγάλη ειδικότητα και συγγένεια της αλληλεπίδρασης μεταξύ του IRE και της IRP1 είναι αποτέλεσμα των

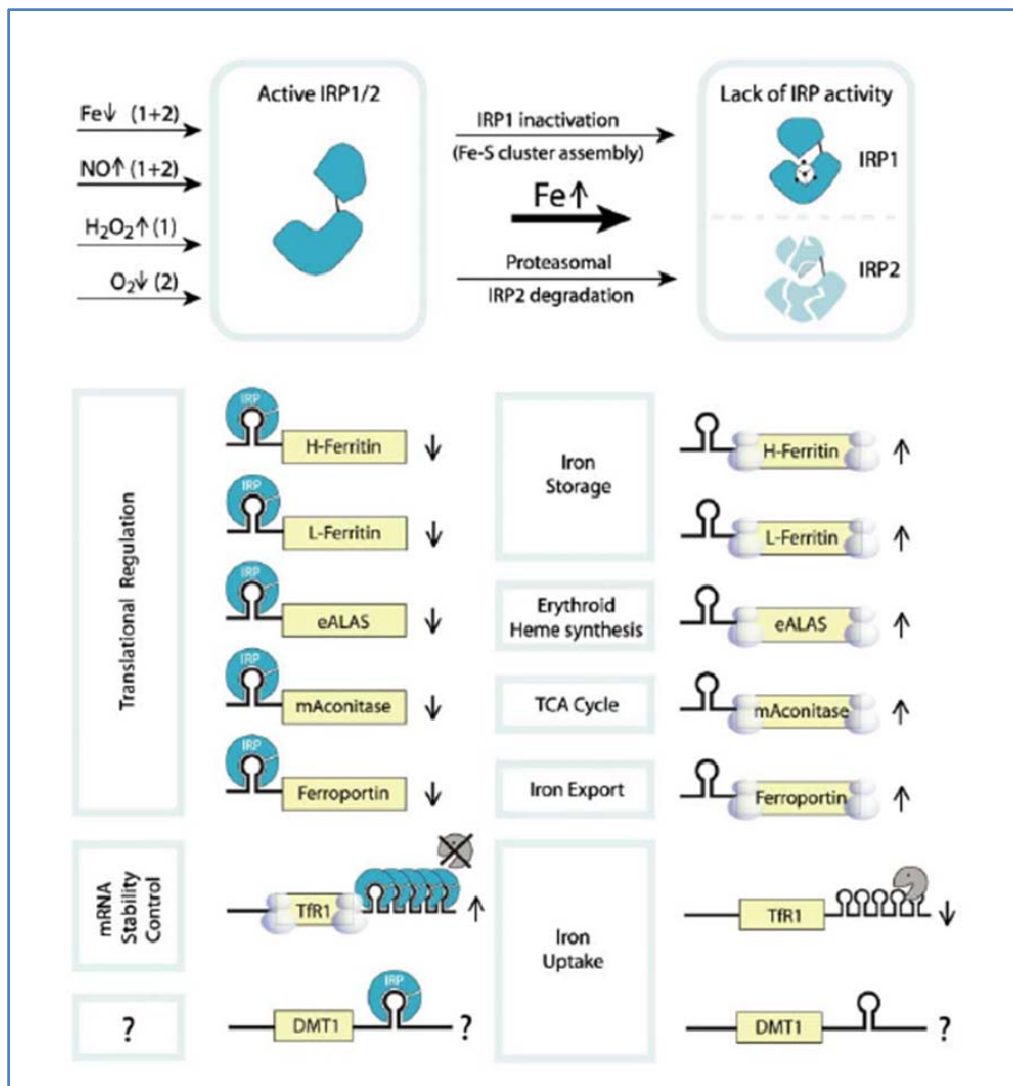
δεσμών που αναπτύσσονται μεταξύ RNA και πρωτεΐνης στα σημεία του εξανουκλεοτιδικού βρόγχου και της προεξοχής του στελέχους του IRE (Walden et al., 2006).



Εικόνα 1.6: Σχηματική απεικόνιση ενός τυπικού IRE. Διακρίνεται ο εξανουκλεοτιδικός βρόγχος, το ανώτερο και κατώτερο τμήμα του στελέχους και η ασύμμετρη προεξοχή.

Οι IRP προσδένονται στα IRE και ρυθμίζουν τον ενδοκυττάριο μεταβολισμό του σιδήρου αναστέλλοντας ή επάγοντας τη μετάφραση του mRNA γονιδίων στόχων. Η πρόσδεση της IRP στο IRE αναστέλλει την έναρξη της μετάφρασης, όταν το IRE εδράζεται στην 5' UTR του mRNA, όπως συμβαίνει στις περιπτώσεις της φερριτίνης (ελαφρά-L- και βαριά-H- άλυσσ), της φερροπορτίνης, της συνθετάσης του αμιλολεβουλικού οξέος (ALAS2), της μιτοχονδριακής ακονιτάσης και του HIF2α (Hentze et al., 2004) (Εικόνα 1.7). Αντίθετα, η παρουσία πολλαπλών IRE στην 3' UTR του mRNA του TfR1 (transferrin receptor 1) δρα σταθεροποιητικά για το mRNA με την πρόσδεση των IRP, αποτρέποντας τον αποδόμησή του (Muckenthaler et al., 2008). Ένα μοναδικό IRE έχει αναγνωρισθεί στην 3'UTR του mRNA του DMT1. Φαίνεται να έχει σταθεροποιητική δράση στο mRNA του συγκεκριμένου μεταφορέα, ο ακριβής όμως μοριακός μηχανισμός ρύθμισης δεν είναι γνωστός, ενώ φαίνεται να επηρεάζεται και από την παρουσία ενός εκκινητή στο 5'UTR, που

επίσης αλληλεπιδρά με το IRE (Hubert and Hentze, 2002). Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωρισθεί λειτουργικά IRE σε mRNA που κωδικοποιούν πολλές διαφορετικές πρωτεΐνες που σχετίζονται όχι μόνο με την ομοιοστασία του σιδήρου, αλλά και με τον κυτταρικό μεταβολισμό, τη ρύθμιση της υποξίας, τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, την οργάνωση του κυτταρικού σκελετού και τη λειτουργία των νευρώνων (Wang and Pantopoulos, 2011).



Εικόνα 1.7: Το σύστημα IRE/IRP. Όταν ο σίδηρος είναι χαμηλός, οι πρωτεΐνες IRP προσδένονται στο IRE. Η αύξηση του σιδήρου προκαλεί την αποδόμηση της IRP2 και μετατρέπει την IRP1 σε ακονιτάση, μη επιτρέποντας την πρόσδεσή τους στο IRE (Hentze et al., 2004)

Η πρόσδεση της IRP1 και της IRP2 στο IRE εξαρτάται από τα επίπεδα του ενδοκυττάρου σιδήρου, και συγκεκριμένα από τα επίπεδα της LIP (labile iron pool). Όταν ο ενδοκυττάριος σίδηρος είναι χαμηλός, οι IRP προσδένονται με μεγάλη συγγένεια στα IRE. Το σύμπλεγμα IRE/IRP σταθεροποιεί το mRNA του TfR1 και του DMT1, ενώ αναστέλλει τη σύνθεση της φερριτίνης, της φερροπορτίνης, της ALAS2, του HIF2α και της μιτοχονδριακής ακονιτάσης (Wang and Pantopoulos, 2011). Με τον τρόπο αυτό, τα αυξημένα επίπεδα του TfR1 διεγείρουν την πρόσληψη του σιδήρου μέσω της τρανσφερρίνης και τη μεταφορά του μέσω του DMT1, ενώ με την αναστολή της σύνθεσης της φερριτίνης και της φερροπορτίνης μειώνονται τα ενδοκυττάρια επίπεδά της πρώτης προκειμένου να μην αποθηκευτεί σίδηρος, και συγχρόνως περιορίζεται η έξοδος του σιδήρου από το κύτταρο μέσω της φερροπορτίνης. Αντίθετα, σε περίσσεια σιδήρου, η διαθεσιμότητα τόσο της IRP1, όσο και της IRP2 μειώνεται δραστικά μέσω μηχανισμών που θα συζητηθούν παρακάτω. Ως αποτέλεσμα, η πρόσληψη σιδήρου μειώνεται μέσω αποδόμησης του mRNA του TfR1, ενώ με την αύξηση της φερριτίνης και της φερροπορτίνης ο πλεονάζων σίδηρος αποθηκεύεται ή εξέρχεται του κυττάρου, προκειμένου να αποφευχθούν οι τοξικές συνέπειες της υπερσυσώρευσής του.

Σε κάποιες περιπτώσεις, το σύστημα IRE/IRP παρακάμπτεται προκειμένου να εξυπηρετηθούν αποτελεσματικότερα οι ανάγκες του οργανισμού για σίδηρο. Μελέτες σε κύτταρα του βλεννογόνου του δωδεκαδακτύλου και σε ερυθροβλάστες έχουν δείξει την παραγωγή ισομερών mRNA της φερροπορτίνης και του DMT1 τα οποία δεν περιέχουν IRE και επομένως δεν υπόκεινται σε μετα-μεταγραφική ρύθμιση μέσω των IRP (Zhang et al., 2009; Hubert and Hentze, 2002). Σε καταστάσεις ένδειας σιδήρου, η παράκαμψη του συστήματος IRE/IRP συμβάλλει πιθανότατα στην ομοιοστατική προσαρμογή των κυττάρων αυτών προκειμένου να απορροφηθεί σίδηρος από το έντερο, και συγχρόνως να περιοριστεί η ερυθροποίηση με την εξαγωγή σιδήρου από τους ερυθροβλάστες και τη χρήση του από άλλα κύτταρα.

Το ρυθμιστικό σύστημα IRE/IRP επιτρέπει τη γρήγορη ανταπόκριση των κυττάρων στα επίπεδα του κυτταροπλασματικού σιδήρου,

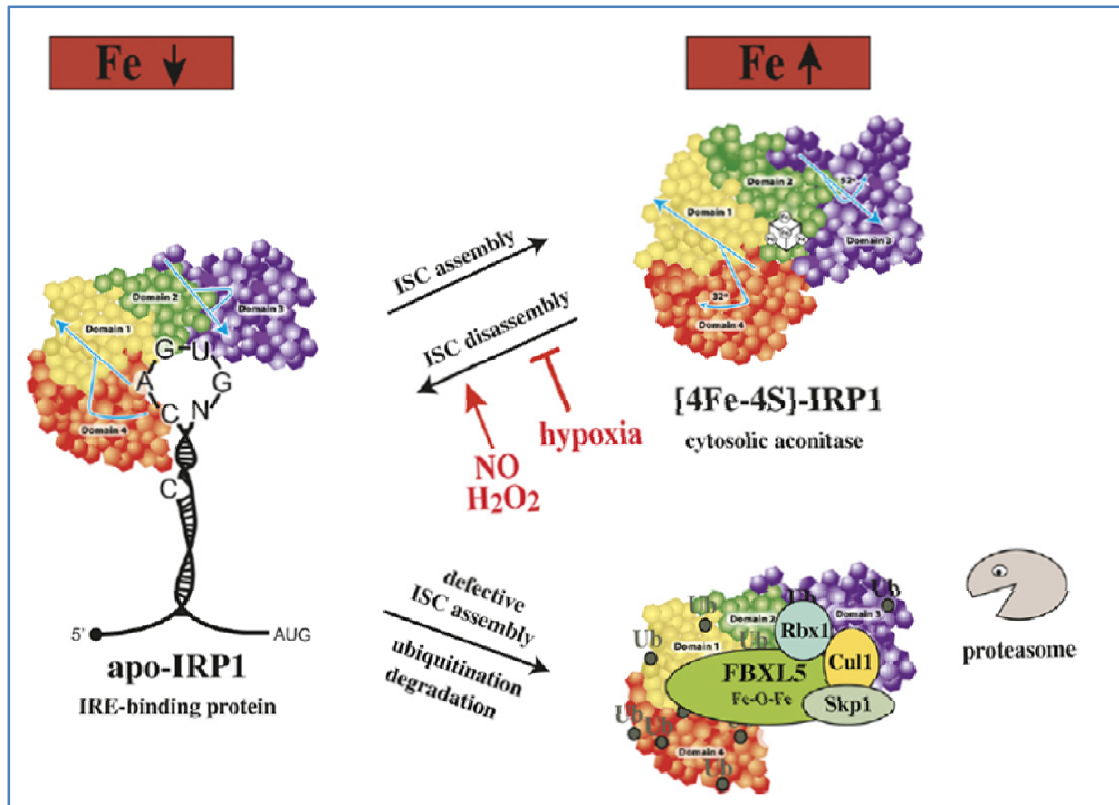
επιτυγχάνοντας έτσι τη βέλτιστη λειτουργία των γονιδίων που συμμετέχουν στην ομοιοστασία του σιδήρου σε κυτταρικό επίπεδο (Roualt, 2006).

Η παθοφυσιολογική σημασία του συστήματος IRE/IRP τονίζεται ιδιαίτερα στο κληρονομικό σύνδρομο υπερφερριτταϊναιμίας καταρράκτη (HHCS – hereditary hyperferritinemia cataract syndrome). Πρόκειται για ένα σπάνιο σύνδρομο που κληρονομείται με τον επικρατούντα αυτοσωμικό τρόπο και χαρακτηρίζεται από υψηλές τιμές φερριτίνης, απουσία υπερφόρτωσης σιδήρου και αμφοτερόπλευρους νεανικούς καταρράκτες. Η υπερφερριτταϊναιμία οφείλεται στην ανεξέλεγκτη παραγωγή L φερριτίνης, ανεξαρτήτως των επιπέδων σιδήρου, λόγω μεταλλάξεων στο IRE του mRNA της, οι οποίες εμποδίζουν την πρόσδεση των IRP (Roetto et al., 2002). Το HHCS θα συζητηθεί λεπτομερώς στο τελευταίο μέρος της Εισαγωγής.

1.1.5.3 Δομή, ρόλος και ρύθμιση των σιδηρορυθμιστικών πρωτεϊνών

Η IRP1 και η IRP2 είναι ορθόλογες πρωτεΐνες που προσδένονται στο RNA και ανήκουν στην οικογένεια των ισομερασών που σχετίζονται με σιδηροθειούχα σύμπλοκα. Οι δύο πρωτεΐνες εμφανίζουν 56% ομολογία στην αλληλουχία των αμινοξέων τους (Roualt, 2006), η IRP2 όμως διαφοροποιείται με την προσθήκη 73 αμινοξέων στο N άκρο της. Η αλληλουχία αυτή είναι πλούσια σε αμινοξέα κυστεΐνης και προλίνης, κωδικοποιείται από ξεχωριστό εξόνιο και φαίνεται να μην έχει συγκεκριμένη δομή (Wang and Pantopoulos, 2011)

Η IRP1 απαντάται σε δύο μορφές ανάλογα με τα επίπεδα του ενδοκυττάριου σιδήρου. Σε περίσσεια σιδήρου, η IRP1 συνδέεται με ένα κυβοειδές σιδηροθειούχο σύμπλοκο [4Fe-4S] (holo-IRP1), το οποίο εμποδίζει την πρόσδεση της στο IRE, ενώ συγχρόνως τη μετατρέπει σε κυτταροπλασματική ακονιτάση, η οποία έχει παρόμοια δράση με την αντίστοιχη μιτοχονδριακή (Hentze et al., 2010). Όταν ο ενδοκυττάριος σίδηρος είναι χαμηλός, το σιδηροθειούχο σύμπλοκο αποδεσμεύεται από την IRP1, μετατρέποντάς την σε apo-IRP1, η οποία προσδένεται στο IRE.

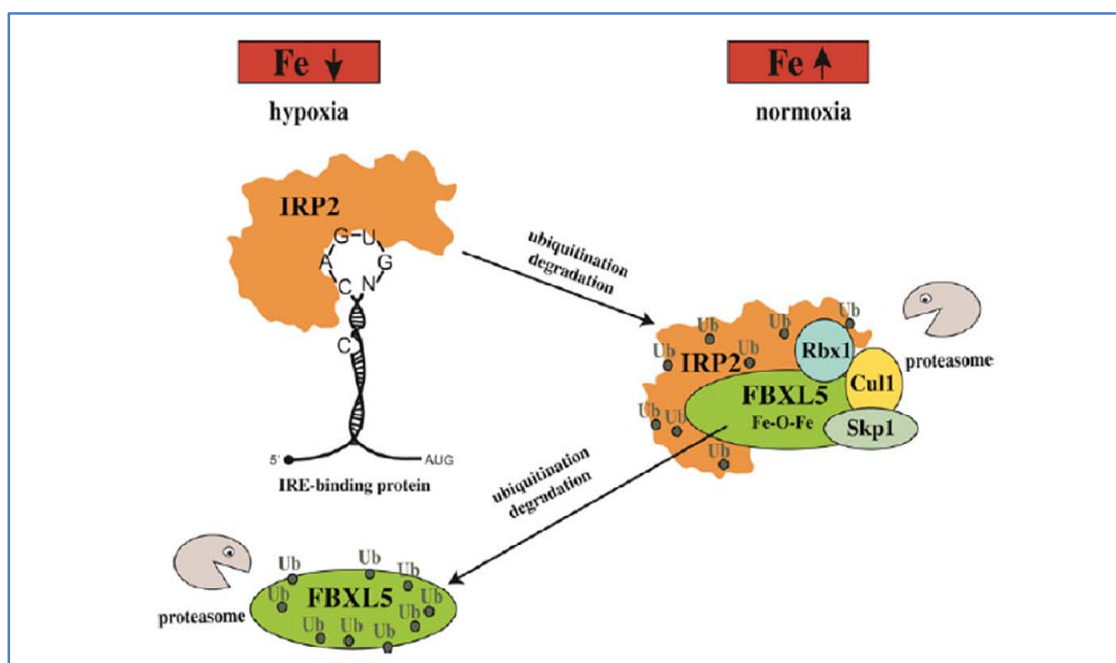


Εικόνα 1.8: Δομή και ρύθμιση της IRP1. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες η IRP1 ρυθμίζεται από την αναστρέψιμη πρόσδεση των σιδηροθειούχων συμπλόκων (Wang and Pantopoulos, 2011)

Αντίθετα, η IRP2 δεν έχει διπλό ρόλο και η δράση της περιορίζεται σε αυτή της πρόσδεσης στο IRE. Σε ένδεια ενδοκυττάριου σιδήρου, η IRP2 συνδέεται με το IRE. Με την αύξηση όμως των επιπέδων του σιδήρου, ενεργοποιούνται μηχανισμοί μέσω των οποίων η IRP2 αποσταθεροποιείται, ουβικουτινιώνεται, για να αποδομηθεί στη συνέχεια από το πρωτεόσωμα (Salahudeen et al., 2009, Vashisht et al., 2009). Φαίνεται λοιπόν ότι η IRP2 ρυθμίζεται κυρίως από τα επίπεδα του κυτταροπλασματικού σιδήρου, ενώ η IRP1 εξαρτάται από τα επίπεδα σιδήρου στο μιτοχόνδριο και τη σύνθεση των σιδηροθειούχων συμπλόκων, που λειτουργεί ως «διακόπτης» μεταξύ της IRP1 και της κυτταροπλασματικής ακονιτάσης. Η ρύθμιση της IRP2 είναι μη αναστρέψιμη, ενώ η τελική έκφραση της IRP1 εξαρτάται από το λόγο της ολοπρος την apo-IRP1.

Η ρύθμιση των IRP επηρεάζεται και από άλλους παράγοντες εκτός του σιδήρου, σύμφωνα με μελέτες σε κυτταρικές σειρές και ποντίκια. Η υποξία

σταθεροποιεί την IRP2 και προάγει την έκφραση της holo-IRP1 (Meyron-Holtz et al., 2004), ενώ οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου ενεργοποιούν την IRP1 μέσω της αποδιάταξης των σιδηροθειούχων συμπλόκων (Pantopoulos and Hentze, 1998). Το μονοξείδιο του αζώτου (NO) σταθεροποιεί την IRP2 και επάγει την πρόσδεση της IRP1 στο IRE., ενώ η φωσφορυλίωση και των δύο IRP παίζει ρόλο στην έκφρασή τους. (Hentze et al., 2010). Η αίμη δρα επίσης αποσταθεροποιητικά και επάγει την αποδόμηση του IRP2 (Ishikawa et al., 2005). Φαίνεται ότι ο ρόλος των IRP επεκτείνεται πέρα από την ομοιοστασία του σιδήρου, συμβάλλοντας και σε άλλες κυτταρικές λειτουργίες, όπως π.χ. η αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες.



Εικόνα 1.9: Δομή και ρύθμιση της IRP2 ανάλογα με τα επίπεδα σιδήρου και οξυγόνου (Wang and Pantopoulos, 2011)

1.1.5.4 Φυσιολογικές λειτουργίες της IRP1 και της IRP2 – Μελέτες σε ποντίκια

Η σύγχρονη εξάλειψη και των δύο γονιδίων που κωδικοποιούν για τις IRP1 και IRP2 δεν είναι συμβατή με τη ζωή και οδηγεί σε εμβρυϊκό θάνατο (Smith et al., 2006), υπογραμμίζοντας τη σημασία των πρωτεϊνών στα αρχικά

στάδια της ανάπτυξης. Ποντίκια στα οποία έγινε στοχευμένη εξάλειψη των IRP σε συγκεκριμένους ιστούς παρουσίασαν διαφορετικούς φαινοτύπους ανάλογα με τον ιστό στόχο. Στα εντεροκύτταρα, η απουσία IRP οδήγησε σε αναπτυξιακές ανωμαλίες, δυσσπορρόφηση, αφυδάτωση, απώλεια βάρους και θάνατο στις 4 εβδομάδες (Gally et al., 2008). Η απώλεια των IRP στα ηπατοκύτταρα προκάλεσε πρόωρο θάνατο λόγω ηπατικής ανεπάρκειας, μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας και μεταβολών στη σύνθεση της αίμης και των σιδηροθειούχων συμπλόκων (Gally et al., 2010).

Ποντίκια στα οποία έχει εξαλειφθεί είτε η IRP1 ή η IRP2 είναι βιώσιμα και γόνιμα, γεγονός που υποδεικνύει τον πλεονάζοντα ρόλο των δύο πρωτεϊνών. Φαίνεται όμως ότι η IRP2 παίζει καθοριστικότερο ρόλο απ' ότι η IRP1 στην *in vivo* ρύθμιση. Ποντίκια με γονότυπο *IRP1^{-/-}* είναι ασυμπτωματικά κάτω από συνθήκες εργαστηρίου (Meyron-Holtz et al., 2004), ενώ εκείνα με γονότυπο *IRP2^{-/-}* αναπτύσσουν υπόχρωμη μικροκυτταρική αναιμία, έχουν αυξημένη εναπόθεση σιδήρου στα εντεροκύτταρα του δωδεκαδακτύλου και στο ήπαρ και σιδηροπενία στο σπλήνα (Cooperman et al., 2005; Galy et al., 2005). Επίσης, εμφανίζουν νευροεκφυλιστικές διαταραχές, πιθανότατα λόγω εναπόθεσης σιδήρου σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου.

Πρόσφατα δημιουργήθηκε ένα ποντίκι το οποίο εκφράζει μόνιμα ενεργοποιημένη IRP1 (Casarrubea et al., 2013). Η ενεργοποίηση της IRP1 επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν και για τις δύο IRP, ενώ τα ποντίκια εμφανίζουν μακροκυτταρική ερυθροπενία, με την ανάπτυξη αναιμίας και μειωμένη κυτταρική διαφοροποίηση. Οι συγγραφείς καταλήγουν ότι η αυξημένη δραστηριότητα της IRP1 οδηγεί σε ελαττωματική κατανομή και χρήση του σιδήρου από τον οργανισμό.

Τα πειράματα στα ποντίκια ενισχύουν τη σημασία του συστήματος IRE/IRP για την ομοιοστασία του σιδήρου στον οργανισμό. Περαιτέρω μελέτες και χαρακτηρισμός των συγκεκριμένων ζώων θα βελτιώσουν την κατανόηση των ρυθμιστικών μηχανισμών και του ρόλου του συστήματος IRE/IRP, τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις (Wang and Pantopoulos, 2011).

1.2 Φερριτίνη : Ο ρόλος της στον οργανισμό

1.2.1 Εισαγωγή

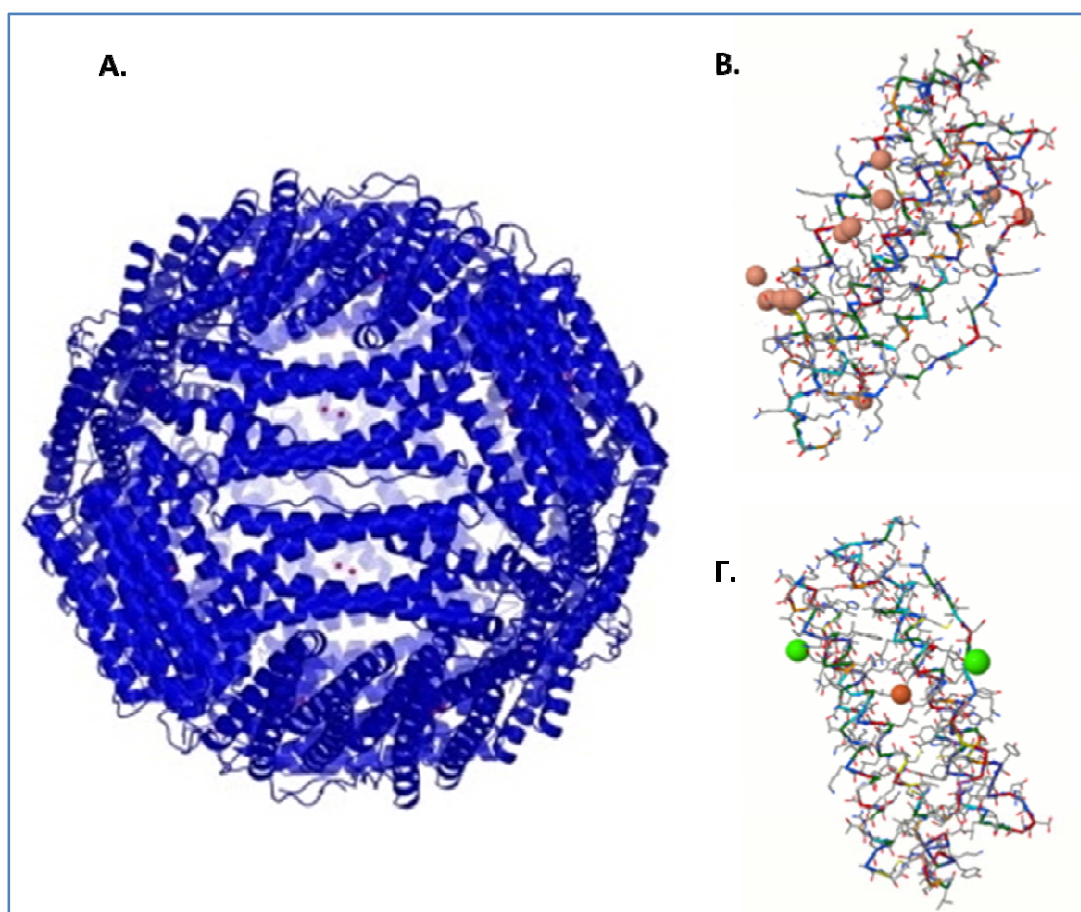
Η φερριτίνη είναι μια πρωτεΐνη που απαντάται σε όλους σχεδόν τους οργανισμούς, διατηρείται μεταξύ των ειδών και αποτελεί ένα από τα πιο αρχαία μόρια της ομοιοστασίας του σιδήρου. Περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1937, μετά από κρυστάλλωση με άλατα καδμίου (Laufberger et al., 1937). Ο βασικός ρόλος της φερριτίνης σχετίζεται με τη δέσμευση και αποθήκευση του σιδήρου. Συγχρόνως, όμως, η φερριτίνη φαίνεται να συμμετέχει και σε άλλες φυσιολογικές και παθολογικές λειτουργίες του κυττάρου, όπως π.χ. στο οξειδωτικό στρες.

1.2.2 Δομή της φερριτίνης

Το μόριο της φερριτίνης αποτελείται από 24 υπομονάδες οι οποίες δημιουργούν το κέλυφος της αποφερριτίνης (Εικόνα 1.10). Το κάθε μόριο της αποφερριτίνης μπορεί να δεσμεύσει περίπου 4500 άτομα σιδήρου στην κοιλότητα που δημιουργείται από τη σφαιρική διάταξη των 24 υπομονάδων (Harrison and Arosio, 1996). Οι δεσμοί που δημιουργούνται μεταξύ των υπομονάδων προσδίδουν στο μόριο της φερριτίνης μεγάλη σταθερότητα (δεν αποδιατάσσεται ακόμα και σε θερμοκρασίες $> 80^{\circ}\text{C}$), ενώ συγχρόνως το μόριο διατηρεί ευελιξία και δυναμικότητα στη δομή του, επιτρέποντας την ελεγχόμενη ροή σιδήρου, οξειδωτικών, αναγωγικών και χηλικών μορίων μέσα και έξω από το κέλυφος της φερριτίνης (Liu and Theil, 2005).

Το μόριο της φερριτίνης αποτελείται από δύο λειτουργικά και γενετικά διαφορετικές πρωτεΐνες, τη βαριά (Η φερριτίνη, 21.000 kDa) και την ελαφρά (L φερριτίνη, 19.000 kDa). άλυσσο της φερριτίνης. Η Η φερριτίνη έχει δράση σιδηροξειδάσης και είναι απαραίτητη για τη γρήγορη οξείδωση του σιδήρου

από Fe^{2+} σε Fe^{3+} , ενώ η L φερριτίνη συμβάλλει στην ενσωμάτωση του οξειδωμένου σιδήρου στον πυρήνα του μορίου, αυξάνοντας συγχρόνως το ρυθμό ανανέωσης της θέσης της σιδηροξείδωσης προκειμένου να οξειδωθούν και άλλα άτομα σιδήρου (Bou-Abdallah, 2010). Ο λόγος έκφρασης της L προς την Η φερριτίνη ποικίλει μεταξύ των ιστών, ενώ συγχρόνως επηρεάζεται και από ερεθίσματα που δέχονται τα κύτταρα (π.χ. σε καταστάσεις φλεγμονής ή λοίμωξης). Έτσι λοιπόν, σε ιστούς που έχουν ανάγκη από αυξημένη δραστηριότητα της σιδηροξείδωσης, έως και 70% της φερριτίνης αποτελείται από Η υπομονάδες, όπως π.χ. στην καρδιά και τον εγκέφαλο. Οι ιστοί, όπως το ήπαρ και ο σπλήνας, που έχουν κυρίως αποθηκευτικούς ρόλους και λιγότερο οξειδωτικές δραστηριότητες, μπορεί να έχουν έως και 90% περιεκτικότητα σε L φερριτίνη (Arosio et al., 2008).



Εικόνα 1.10: Δομή του μορίου της φερριτίνης. **A.** Το κέλυφος της αποφερριτίνης αποτελείται από 24 υπομονάδες εντός του οποίου αποθηκεύονται έως και 4500 άτομα σιδήρου. **B.** Η ελαφρά αλυσος της φερριτίνης – L υπομονάδα. **Γ.** Η βαριά αλυσος της φερριτίνης – Η υπομονάδα.

Τα μιτοχόνδρια εκφράζουν τη μιτοχονδριακή φερριτίνη (FtMt). Κωδικοποιείται από ένα διαφορετικό γονίδιο απ' ότι οι Η και η L φερριτίνες. Συντίθεται στο κυτταρόπλασμα ως ένα πρόδρομο πολυπεπτίδιο και στη συνέχεια εισάγεται στο μιτοχόνδριο όπου δημιουργείται η ώριμη πρωτεΐνη η οποία έχει δράση σιδηροξίδασης. Η μιτοχονδριακή φερριτίνη εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα και δε φαίνεται να έχει κάποιο βασικό ρόλο στη φυσιολογική χρήση του μιτοχονδριακού σιδήρου. Η έκφρασή της όμως επάγεται σημαντικά στους παθολογικούς σιδηροβλάστες (ερυθροβλάστες υπερφορτωμένοι με σίδηρο στη σιδηροβλαστική αναιμία), πιθανότατα για να προστατευτεί το μιτοχόνδριο από τον πλεονάζοντα τοξικό σίδηρο (Cazzola et al., 2003).

Η φερριτίνη εκκρίνεται στον ορό σε μικρές ποσότητες και είναι φτωχή σε σίδηρο. Αποτελείται από L καθώς και από γλυκοζυλιωμένα (G) ισομερή (G φερριτίνη), τα οποία προέρχονται από την L φερριτίνη. Η G φερριτίνη δε φαίνεται να παίζει κάποιο σημαντικό ρόλο στη διακίνηση και την αποθήκευση του σιδήρου, χρησιμοποιείται όμως ως ένας κλινικός δείκτης για τις αποθήκες σιδήρου του οργανισμού. Εκκρίνεται από τα μακροφάγα και από τα κύτταρα του εγγύς σωληναρίου του νεφρού (Cohen et al., 2010).

1.2.3 Ο ρόλος και η λειτουργία της φερριτίνης

Ο βασικός ρόλος της φερριτίνης είναι η ασφαλής αποθήκευση του πλεονάζοντος σιδήρου, προκειμένου να μη γίνει τοξικός για το κύτταρο, αλλά και για να είναι άμεσα διαθέσιμος για τις ανάγκες του οργανισμού για ερυθροποίηση. Ο κυτταροπλασματικός σίδηρος εισάγεται στη φερριτίνη με τη βοήθεια της πρωτεΐνης PCBP1 (poly-rC binding protein) (Shi et al., 2008). Στη συνέχεια, με τη δράση της ως σιδηροξίδαση, η Η φερριτίνη μετατρέπει το δισθενή σίδηρο σε τρισθενή, για να τον αποθηκεύσει η L φερριτίνη στον πυρήνα της [Fe(O)OH] (Levi et al., 1992). Η κινητοποίηση του αποθηκευμένου σιδήρου σε καταστάσεις σιδηροπενίας έχει ως αποτέλεσμα την αποδόμηση της φερριτίνης μέσω του λυσοσώματος και του

πρωτεοσώματος. Φαίνεται ότι για την ενεργοποίηση των οδών μέσω των οποίων η φερριτίνη αποδομείται, απαραίτητη προϋπόθεση είναι η μείωση του ενδοκυττάρου σιδήρου (De Domenico et al., 2006). Ο τρόπος με τον οποίο ο τρισθενής σίδηρος της φερριτίνης ανάγεται σε δισθενή και αποδεσμεύεται για να χρησιμοποιηθεί στα μιτοχόνδρια δεν είναι απόλυτα ξεκάθαρος (Arosio et al., 2009).

Η σημασία του ρόλου της φερριτίνης έγκειται όχι μόνο στην ομοιοστασία του σιδήρου και στη διασφάλιση της ερυθροποίησης, αλλά και στην αντιοξειδωτική της δράση. Η φερριτίνη προλαμβάνει τη δημιουργία ελεύθερων ριζών, μειώνοντας τη διαθεσιμότητα του δισθενή σιδήρου στην αντίδραση Fenton (Arosio et al., 2009). Σύμφωνα με την αντίδραση Fenton, ο ελεύθερος σίδηρος οξειδώνεται και παράγονται ιδιαίτερα τοξικές ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και αζώτου, οι οποίες καταστρέφουν το DNA, τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια του κυττάρου. Η δράση της φερριτίνης ως αντιοξειδωτικό είναι καίριας σημασίας για το κύτταρο. Ποντίκια στα οποία έχει εξαλειφθεί το γονίδιο που κωδικοποιεί για την Η φερριτίνη πεθαίνουν σε εμβρυϊκή ηλικία (Ferreira et al., 2000), ενώ η υπό όρους εξάλειψή του προκαλεί μεγάλη ηπατική βλάβη λόγω του οξειδωτικού στρες (Darshan et al., 2009). Μελέτες σε δροσόφylla έδειξαν ότι τόσο η Η όσο και η L φερριτίνη εκφράζονται κατά την εμβρυογένεση και είναι και οι δύο απαραίτητες για την εμβρυϊκή ανάπτυξη (Missirlis et al., 2007).

Εκτός από τους δύο βασικούς ρόλους ως αποθήκη σιδήρου και ως αντιοξειδωτικό για τα κύτταρα, η φερριτίνη φαίνεται να εμπλέκεται και σε πολλές άλλες κυτταρικές λειτουργίες. Αναφέρονται συνοπτικά στον Πίνακα 1.1.

Πίνακας 1.1 . Προτεινόμενες λειτουργίες της φερριτίνης (Arosio et al., 2009)

| Σημείο δράσης | Προτεινόμενη λειτουργία | Άλυσος φερριτίνης |
|--------------------|--|-------------------|
| Κυτταρόπλασμα | Ρύθμιση και αποθήκευση σιδήρου | H / L |
| | Ρύθμιση παραγωγής ROS | H |
| | Ρύθμιση της μετάφρασης | H / L |
| | Ρύθμιση της απόπτωσης | H |
| | Σηματοδότηση υποδοχέα χημοκινών | H |
| | Ρύθμιση της έκκρισης της απολιποπρωτεΐνης Β | H / L |
| | Πρόσδεση μικροσωληνίσκων | H / L |
| | Πρόσδεση αναισθητικών ουσιών | H |
| | Ρύθμιση της ανάπτυξης του μετ. μελανώματος | L |
| | Ωρίμανση της τυροσινάσης | L |
| Πυρήνας | Προστασία από τη UV ακτινοβολία | H |
| | Καταστολή της έκφρασης της β σφαιρίνης | H |
| Έκκριση φερριτίνης | Δότης σιδήρου στους ερυθροβλάστες | H |
| | Μεταφορέας σιδήρου σε όργανα (π.χ. εγκεφάλος) | H |
| | Καταστολή της μυελοποίησης | H |
| | Προ-αποπτωτικός παράγοντας | H |
| Μιτοχόνδριο | Αντιοξειδωτική δράση Προστασία από τη συσσώρευση σιδήρου στη σιδηροβλαστική αναιμία | FtMt FtMt |

1.2.4 Τα γονίδια της φερριτίνης

Τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις διαφορετικές αλυσούς της φερριτίνης είναι καλά συντηρημένα μεταξύ των ειδών, γεγονός που υπογραμμίζει το σημαντικό ρόλο της φερριτίνης για όλους τους οργανισμούς.

Στα σπονδυλωτά, η δομή των γονιδίων που κωδικοποιούν για την κυτταροπλασματική φερριτίνη εμφανίζει 3 εσώνια και 4 εξώνια, τα οποία οριοθετούνται σε παρόμοια σημεία (Torti and Torti, 2002). Η Η φερριτίνη κωδικοποιείται από το γονίδιο *FTH* και η L από το *FTL*, τα οποία εδράζονται στα χρωμοσώματα 11q12-q13 και 19q13.3-q13.4 αντίστοιχα. Και στα δύο γονίδια πολύ καλά συντηρημένες αλληλουχίες κωδικοποιούν για το μοναδικό IRE της 5' μη μεταφραζόμενης περιοχής του mRNA, το οποίο παίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση της φερριτίνης (βλ. Κεφάλαιο 1.1.5.2).

Η σημασία του IRE στη ρύθμιση της φερριτίνης υπογραμμίζεται στο κληρονομικό σύνδρομο υπερφερριτιναιμίας καταρράκτη (HHCS), όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω. Μεταλλάξεις στο IRE της L φερριτίνης οδηγούν στην ανεξέλεγκτη παραγωγή της, ανεξαρτήτως των επιπέδων του ενδοκυττάριου σιδήρου, λόγω αδυναμίας πρόσδεσης των IRP στο μεταλλαγμένο IRE (Beaumont et al., 1995).

Επικρατούσες μεταλλάξεις που έχουν περιγραφεί στο IRE της Η φερριτίνης αυξάνουν τη συγγένεια του IRP για το IRE, με αποτέλεσμα τη μείωση στην παραγωγή Η φερριτίνης και την υπερφόρτωση του οργανισμού με σίδηρο (Kato et al., 2001).

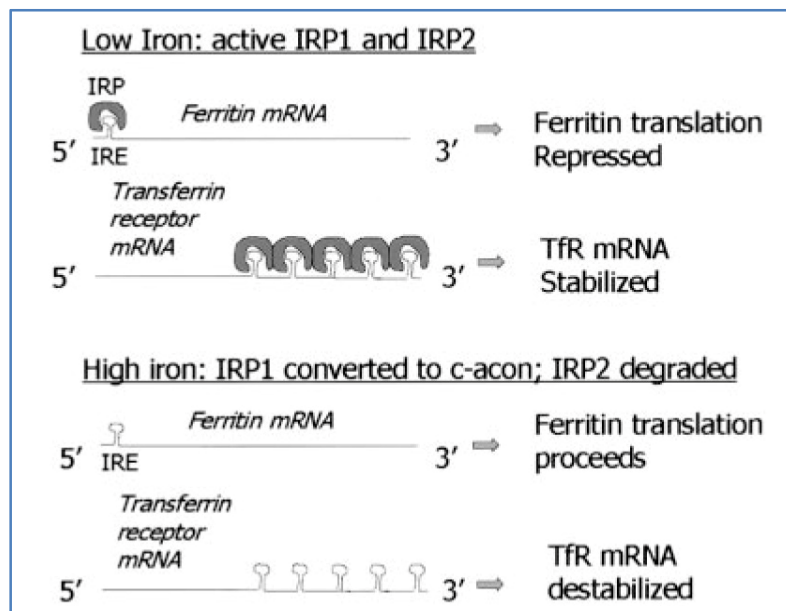
Μια άλλη επικρατούσα μετάλλαξη στο τελευταίο εξώνιο του *FTL* σχετίζεται με υποφερριτιναιμία και διαταραγμένη εναπόθεση σιδήρου και φερριτίνης στα βασικά γάγγλια. Η νόσος που προκύπτει είναι γνωστή ως «νευροφερριτινοπάθεια» (neuroferritinopathy) και χαρακτηρίζεται από κινητικές διαταραχές (Curtis et al., 2001).

Παρανοηματικές μεταλλάξεις (missense mutations) στο *FTL* προκαλούν αύξηση της γλυκοζυλίωσης της L φερριτίνης. Η κατάσταση είναι γνωστή ως καλοήθης υπερφερριτιναιμία (BH-Benign Hypoferferritinemia) και χαρακτηρίζεται από υπεργλυκοζυλιωμένη L φερριτίνη (>90%) στον ορό (φ.τ. 50-81%) (Thurlow et al., 2012).

1.2.5 Η ρύθμιση της φερριτίνης

1.2.5.1 Ρύθμιση της φερριτίνης ανάλογα με τα επίπεδα του σιδήρου

Η ρύθμιση της φερριτίνης είναι κυρίως μετα-μεταγραφική και συντελείται με την κινητοποίηση αποθηκευμένων μορίων mRNA Η και L φερριτίνης από τα μονοσώματα στα πολυσώματα. υπό την παρουσία σιδήρου (Rogers et al., 1987). Η μετα-μεταγραφική ρύθμιση γίνεται μέσω του συστήματος IRE (iron responsive element) / IRP (iron regulatory proteins) και ανάλογα με τα επίπεδα του ενδοκυττάριου σιδήρου, και συγκεκριμένα του ελεύθερου σιδήρου της LIP (labile iron pool). Όπως ήδη αναφέρθηκε, και τα δύο γονίδια *FTH* και *FTL* κωδικοποιούν mRNA με μοναδικά IRE στο 5' μη μεταφραζόμενο άκρο τους. Οι δομές των IRE της Η και της L φερριτίνης έχουν πολύ μικρές διαφορές μεταξύ τους, ενώ βρέθηκε ότι το IRE του *FTL* είναι πολύ πιο ευαίσθητο στο σίδηρο υπό συνθήκες υποξίας, γεγονός που πιθανόν υπογραμμίζει ότι ο σίδηρος ασκεί εντονότερη επίδραση στη ρύθμιση της L απ' ότι της Η φερριτίνης (Sammarco et al., 2008).



Εικόνα 1.11: Η ρύθμιση της φερριτίνης ανάλογα με τα ενδοκυττάρια επίπεδα σιδήρου μέσω του συστήματος IRE/IRP. Απεικονίζεται και η ρύθμιση του TfR1 (Torti and Torti, 2002).

Σε ένδεια σιδήρου, οι IRP (IRP1 και IRP2) προσδένονται στο IRE της φερριτίνης, αναστέλλοντας την πρόσδεση του ριβοσώματος στο mRNA και επομένως τη μετάφραση. Σε περίσσεια σιδήρου, δεν είναι δυνατή η δέσμευση των IRP στο IRE, το mRNA μεταφράζεται και η φερριτίνη αυξάνει για να ανταποκριθεί στον πλεονάζοντα σίδηρο (Εικόνα 1.11). Ο τρόπος δράσης του συστήματος IRE/IRP, καθώς και η ρύθμιση και λειτουργία των IRP έχουν περιγραφεί αναλυτικά σε προηγούμενο κεφάλαιο της Εισαγωγής (βλ. Κεφάλαια 1.1.5.2 και 1.1.5.3).

1.2.5.2 Ρύθμιση της φερριτίνης στη φλεγμονή

Η έκκριση κυταροκινών, όπως ο TNF α (Tumor necrosis factor α) και η IL-1 α (Ιντερλευκίνη 1 α), σε φλεγμονώδεις καταστάσεις, επάγει τη μεταγραφική ρύθμιση της Η φερριτίνης (Torti et al., 1988). Φαίνεται ότι οι σηματοδοτικές οδοί της φλεγμονής και του στρες επηρεάζουν τόσο τη συγκέντρωση της ολικής φερριτίνης, όσο και το λόγο των Η προς L υπομονάδων. Ενώ ο σίδηρος επάγει εντονότερα την L φερριτίνη, η παρουσία TNF α και IL-1 β με ή χωρίς σίδηρο σε πειράματα σε κύτταρα είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της Η φερριτίνης και την αυξημένη απορρόφηση σιδήρου (Smirnov et al., 1999).

Οι κυταροκίνες επηρεάζουν την έκφραση της φερριτίνης και μετα-μεταγραφικά, με αύξηση της σύνθεσης της πρωτεΐνης, αλλά όχι του mRNA της. Η ρύθμιση αυτή δε γίνεται μέσω του συστήματος IRE/IRP, αλλά με την πρόσδεση πρωτεϊνών σε άλλη περιοχή του mRNA (Rogers et al., 1994).

Τέλος, η φλεγμονή επάγει την έκκριση της φερριτίνης από τα κύτταρα. Φαίνεται μάλιστα από πειράματα σε κυτταρικές σειρές ότι η αύξηση είναι και ανάλογη των ερεθισμάτων, με την επίδραση δύο κυταροκινών να επάγει τουλάχιστον διπλάσια έκκριση φερριτίνης απ' ό,τι η μία μόνη της. Συγχρόνως, η παρουσία σιδήρου συμβάλλει στην έκκρισή της (Tran et al., 1997).

1.2.5.3 Ρύθμιση της φερριτίνης στο οξειδωτικό στρες

Ο αντιοξειδωτικός ρόλος της φερριτίνης μέσω της δράσης της ως φερροξίδαση (Η φερριτίνη) έχει ήδη αναλυθεί παραπάνω (βλ. Κεφάλαιο 1.2.3) Δεν είναι λοιπόν τυχαίο ότι το οξειδωτικό στρες ενεργοποιεί πολλές οδούς μέσω των οποίων ρυθμίζεται η φερριτίνη. Η φερριτίνη δρα προστατευτικά για το κύτταρο ενάντια του οξειδωτικού στρες και σύμφωνα με πειράματα σε κυτταρικές σειρές η μείωση της φερριτίνης αυξάνει την κυτταροτοξικότητα, η υπερέκφρασή της μειώνει τα οξειδωτικά στοιχεία, ενώ η αύξησή της μειώνει το σίδηρο της LIP (Torti and Torti, 2002).

Η ρύθμιση της φερριτίνης από οξειδωτικά στοιχεία γίνεται σε μεταγραφικό και σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Η μεταγραφική ρύθμιση της Η αλλά και της L φερριτίνης συνδέεται με μια καλά συντηρημένη περιοχή του DNA τους, το ARE (antioxidant responsive element), το οποίο φαίνεται να ενεργοποιείται από χημειοπροστατευτικές ουσίες που εκκρίνονται σε απάντηση στο οξειδωτικό στρες (Iwasaki et al., 2006). Σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, τα οξειδωτικά στοιχεία (π.χ. ROS, NO) δρουν απενεργοποιώντας τις IRP, είτε άμεσα, είτε έμμεσα επάγοντας την απελευθέρωση σιδήρου από κυτταρικές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένης της φερριτίνης και της IRP1, και ενεργοποιώντας μέσω της αύξησης του σιδήρου το σύστημα IRE/IRP (Torti and Torti, 2002). Μελέτες έχουν δείξει ότι η UV ακτινοβολία, η μεναδιόνη (συνθετική βιταμίνη K), οι οξειδωμένες λιποπρωτεΐνες (LDL) επάγουν τη σύνθεση της φερριτίνης, προκειμένου να ανταποκριθεί ο οργανισμός στο οξειδωτικό στρες.

1.2.5.4 Ρύθμιση της φερριτίνης στην υποξία και την ισχαιμία

Η υποξία και η ισχαιμία επάγουν τη σύνθεση της φερριτίνης, μέσω τροποποιήσεων των IRP. Σε ποντίκια η οξεία υποξία / ισχαιμία, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της φερριτίνης, και κυρίως της Η αλύσου (Cheepsunthorn et al., 2001). Σε άλλα παρόμοια πειράματα, η συνολική αύξηση της Η και της L φερριτίνης υπό συνθήκες υποξίας / ισχαιμίας ήταν ίση, όμως η κατανομή των αλύσων στις περιοχές του εγκεφάλου των υποξικών

ποντικιών ήταν τελείως διαφορετική (Chi et al., 2000). Κατά την περίοδο της επαναιμάτωσης, η φερριτίνη φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη μείωση της οξειδωτικής βλάβης στους ιστούς. Σύμφωνα με πειραματικά μοντέλα, η ρύθμισή της κατά την επαναιμάτωση που ακολουθεί την ισχαιμία γίνεται προ-μεταφραστικά και μεταφραστικά (Yeh et al., 1998).

1.2.5.5 Ρύθμιση της φερριτίνης στον καρκίνο

Είναι γνωστό εδώ και πολλά χρόνια ότι η φερριτίνη αυξάνει σε πολλές νεοπλασματικές καταστάσεις (Hazard et al., 1977). Νεότερες μελέτες αποκάλυψαν μια πιο περίπλοκη εικόνα, με τη ρύθμιση της φερριτίνης να διαφέρει ανάλογα με το είδος της νεοπλασίας. Έτσι, στον καρκίνο του μαστού, του παχέος εντέρου και στο σεμίνωμα του όρχεως παρατηρείται αύξηση της φερριτίνης, ενώ στον καρκίνο του ήπατος έχει σε κάποιες περιπτώσεις διαπιστωθεί μείωση (Torti and Torti, 2002). Λόγω της επαγωγής της έκφρασης της από ένα μεγάλο αριθμό νεοπλασματικών κυττάρων, υπάρχουν ενδείξεις για τη χρήση της φερριτίνης ως καρκινικού δείκτη σε κάποια είδη καρκίνου, όπως π.χ. το νευροβλάστωμα (Riley et al., 2004). Ο πιθανός ρόλος της ως καρκινικό αντιγόνο οδήγησε στη χρήση αντιφερριτινικών αντισωμάτων στο πλαίσιο ανοσοθεραπείας στο λέμφωμα Hodgkin, στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα και στον καρκίνο κεφαλής-τραχήλου (Arosio et al., 2009).

1.2.5.6 Ρύθμιση της φερριτίνης από άλλους παράγοντες

Πληθώρα άλλων παραγόντων έχουν αναγνωριστεί ως ρυθμιστές της φερριτίνης. Οι ακριβείς μηχανισμοί ρύθμισης δεν είναι σε πολλές περιπτώσεις πλήρως διευκρινισμένοι. Κάποιοι βασικοί παράγοντες είναι οι παρακάτω.

Η αίμη επάγει την έκφραση της φερριτίνης. Δρα τόσο σε μεταγραφικό επίπεδο, μέσω μεταγραφικών παραγόντων όπως ο Bach1, όσο και σε μετα-μεταγραφικό μέσω σύνδεσης με το IRP2 (Hintze et al., 2007, Hintze et al., 2006). Η τριωδοθυρονίνη (T3), η ινσουλίνη και ο IGF-1 (insulin growth factor 1) εμπλέκονται στη ρύθμιση της φερριτίνης σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Η T3 φαίνεται να δρα μέσω φωσφορυλίωσης των IRP. Η ινσουλίνη και ο IGF-1

επάγουν τη μετάφραση τόσο της L όσο και της H φερριτίνης (Torti and Torti, 2002). Η καλύτερη κατανόηση του τρόπου ρύθμισης της φερριτίνης και η αιτιολόγηση της υπερφερριτιναιμίας που χαρακτηρίζει πληθώρα νοσημάτων θα βοηθήσει στην αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση και θεραπεία τους.

1.2.6 Η κλινική σημασία της φερριτίνης

Η μέτρηση της φερριτίνης στον ορό αποτελεί μια από τις πιο συχνά ζητούμενες εργαστηριακές εξετάσεις και στην καθημερινή κλινική πράξη είναι η πιο διαδεδομένη μέτρηση για τον προσδιορισμό των επιπέδων σιδήρου στον οργανισμό. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, τα επίπεδα της φερριτίνης στον ορό σχετίζονται με τα επίπεδα των αποθηκών σιδήρου και η μέτρησή της είναι ένας εύκολος τρόπος εκτίμησης των αποθηκών σιδήρου. Οι φυσιολογικές τιμές της φερριτίνης (50-200 μg/L) παρουσιάζουν διακυμάνσεις ανάλογα με την ηλικία και το φύλο, με τους άντρες και τους ενήλικες να έχουν υψηλότερες τιμές από τις γυναίκες και τα παιδιά.

Χαμηλές τιμές φερριτίνης είναι απόλυτη ένδειξη μειωμένων αποθηκών σιδήρου (Zanella et al., 1989). Τιμές χαμηλότερες από 15μg/L αντιστοιχούν σε άδειες αποθήκες. Η υποφερριτιναιμία είναι ένδειξη απώλειας / ελλείψεως σιδήρου και η αντιμετώπισή της, εκτός από χορήγηση σιδήρου, έγκειται στην ανεύρεση και αντιμετώπιση του εκλυτικού αιτίου.

Τα αυξημένα επίπεδα φερριτίνης δεν είναι παθογνωμονικά υπερφόρτωσης σιδήρου. Η φερριτίνη είναι πρωτεΐνη οξείας φάσεως, που σημαίνει ότι η συγκέντρωσή της αυξάνει τουλάχιστον 25% σε φλεγμονώδεις καταστάσεις (Kushner et al., 1982). Όπως διαπιστώνεται και από την πληθώρα των παραγόντων που ρυθμίζουν την έκφραση της φερριτίνης (βλ. Κεφάλαιο 1.2.5), η υπερφερριτιναιμία είναι αποτέλεσμα πολυπαραγοντικών διαδικασιών που δρουν σε μεταγραφικό (γονίδια - DNA), μετα-μεταγραφικό (mRNA) και μεταφραστικό (πρωτεΐνη) επίπεδο. Η ανεύρεση μετρίως αυξημένης φερριτίνης (300-1000 μg/L) είναι πολύ συχνή στην καθημερινή κλινική πράξη και στην πλειονότητα των περιπτώσεων (ακόμα και σε σοβαρή

υπερφερριτιναιμία) δε σχετίζεται με υπερφόρτωση σιδήρου και αιμοχρωμάτωση. Αντίθετα πολύ πιο συχνά αίτια υπερφερριτιναιμίας στο γενικό πληθυσμό είναι το δυσμεταβολικό σύνδρομο, η χρόνια κατανάλωση οينوπνεύματος, οι χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις, οι λοιμώξεις, τα αυτοάνοσα νοσήματα και τα νεοπλάσματα.

Η ασυμπτωματική υπερφερριτιναιμία είναι συχνή αιτία παραπομπής ασθενών σε τριτοβάθμια κέντρα υγείας, κυρίως για τη διερεύνηση πιθανής αιμοχρωμάτωσης. Όπως διαπιστώνεται σε πληθώρα μελετών, στις περισσότερες περιπτώσεις ασθενών με υπερφερριτιναιμία θα πρέπει να αναζητηθούν άλλα αίτια πέραν της αιμοχρωμάτωσης. Οι διάφοροι συγγραφείς καταλήγουν και τονίζουν ιδιαίτερα τη σημασία του αναλυτικού ιστορικού, της κλινικής εξέτασης και της διενέργειας απλών εργαστηριακών εξετάσεων πριν από την τέλεση μοριακού ελέγχου για αναζήτηση πιθανής αιμοχρωμάτωσης ή την τέλεση βιοψίας ήπατος (Adams et al., 2005; Wong and Adams, 2006; Beaton and Adams, 2012).

Κεντρικό ρόλο στη διερεύνηση της υπερφερριτιναιμίας παίζει ο κορεσμός τρανσφερρίνης, ο οποίος υπολογίζεται από το λόγο του σιδήρου ορού προς τη συνολική σιδηροδεσμευτική ικανότητα ορού (TIBC) [σίδηρος ορού / TIBC]. Η αύξηση του κορεσμού τρανσφερρίνης είναι στις περισσότερες περιπτώσεις εύρημα συμβατό με την υπερφόρτωση σιδήρου, είτε πρωτοπαθούς είτε δευτεροπαθούς αιτιολογίας. Παρόλο που οι τιμές του κορεσμού τρανσφερρίνης παρουσιάζουν ευρεία διακύμανση, και για το λόγο αυτό είναι σημαντικό να υπολογίζονται πάντα βάσει πρωινού δείγματος αίματος νηστείας και σε μη οξεία φάση φλεγμονής, ο υπολογισμός της παραμένει ένας χρήσιμος δείκτης για τη διερεύνηση της υπερφερριτιναιμίας (Adams and Burton, 2011), και κυρίως για τη διάγνωση της κληρονομικής αιμοχρωμάτωσης με ομοζυγωτία στη μετάλλαξη C282Y στο γονίδιο *HFE* (Wong and Adams, 2006). Η παρουσία αυξημένης φερριτίνης με φυσιολογικές ή χαμηλές τιμές κορεσμού τρανσφερρίνης οφείλεται σε χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα, νεοπλασία, κυτταρόλυση (π.χ. ηπατίτιδες), χρόνια κατανάλωση αλκοόλ, δυσμεταβολικό σύνδρομο, νόσο της φερροπορτίνης (κληρονομική αιμοχρωμάτωση τύπου 4α) ή κληρονομικό σύνδρομο υπερφερριτιναιμία καταρράκτη (HHCS).

Ο Πίνακας 1.2 συνοψίζει τα βασικά αίτια υπερφερριτιναιμίας και τους μηχανισμούς μέσω των οποίων η φερριτίνη αυξάνει.

Πίνακας 1.2 . Μηχανισμοί αύξησης της φερριτίνης και βασικά αίτια υπερφερριτιναιμίας (Beaton and Adams, 2012)

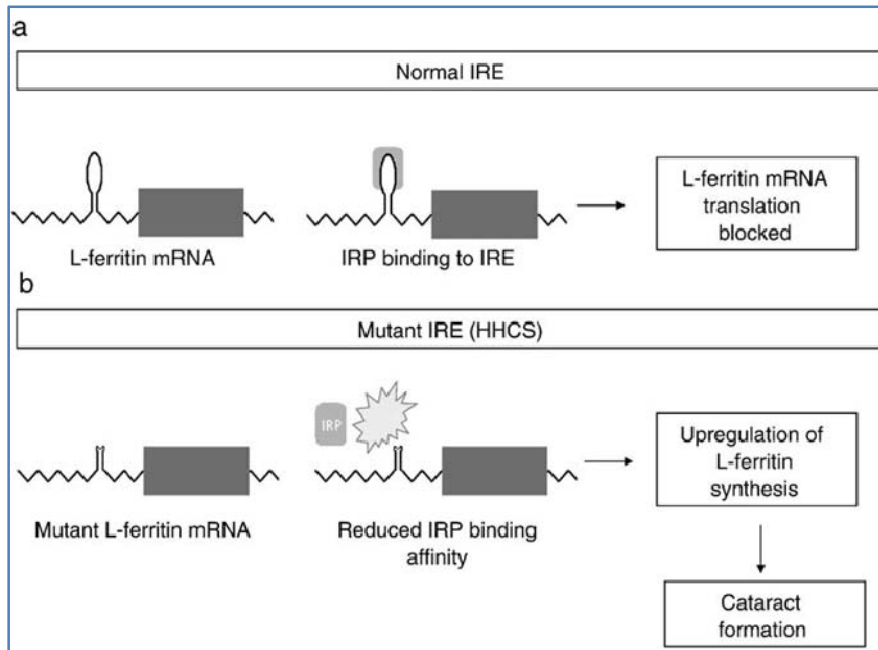
| | |
|---|--|
| <p>Αύξηση της σύνθεσης της φερριτίνης λόγω υπερφόρτωσης σιδήρου</p> | <ul style="list-style-type: none"> • Κληρονομική αιμοχρωμάτωση • Δυσερυθροποιητικές αναιμίες • Ασερουλοπλασμιναιμία • Δευτεροπαθής υπερφόρτωση σιδήρου από μεταγγίσεις ή από του στόματος λήψη σιδήρου |
| <p>Απελευθέρωση της φερριτίνης λόγω κυτταρικής βλάβης (φλεγμονή – οξειδωτικό στρες – υποξία/ισχαιμία)</p> | <ul style="list-style-type: none"> • Ηπατική στεάτωση και στεατοηπατίτιδα (αλκοολική και μη αλκοολική) • Χρόνια ιογενής ηπατίτιδα • Μαζική ηπατική νέκρωση • Αυτοάνοσα και ρευματολογικά νοσήματα • Οξείες και χρόνιες λοιμώξεις • Σπληνικό έμφρακτο – οξύ έμφρακτο του μυοκαρδίου • Αιμοφαγοκυτταρικό σύνδρομο |
| <p>Αύξηση της σύνθεσης ή της έκκρισης της αποφερριτίνης ή της L φερριτίνης</p> | <ul style="list-style-type: none"> • Χρόνια κατανάλωση αιθανόλης • Νεοπλασία • Νόσος του Gaucher • Ιστιοκυττάρωση • ΗΗCS (Κληρονομικό σύνδρομο υπερφερριτιναιμίας καταρράκτη) |

1.3 Κληρονομικό Σύνδρομο Υπερφερριτιναιμίας Καταρράκτη (HHCS)

Το κληρονομικό σύνδρομο υπερφερριτιναιμίας καταρράκτη (hereditary hyperferritinemia cataract syndrome - HHCS – OMIM #600886) είναι μια σπάνια νόσος που οφείλεται στην απορύθμιση των μετα-μεταγραφικών ρυθμιστικών μηχανισμών στην παραγωγή της φερριτίνης, λόγω μεταλλάξεων στο σιδηροαποκριτικό στοιχείο (IRE) στο mRNA της ελαφράς αλυσού της (L φερριτίνη). Χαρακτηρίζεται από αυξημένη φερριτίνη ορού, ανεξαρτήτως των επιπέδων σιδήρου, και εμφάνιση αμφοτερόπλευρου καταρράκτη σε νεαρή ηλικία. Περιγράφεται πρώτη φορά το 1995 στη Γαλλία και την Ιταλία (Beaumont et al., 1995; Girelli et al., 1995). Από τότε έχουν ακολουθήσει αναφορές περιστατικών με HHCS σε πολλούς διαφορετικούς πληθυσμούς. Στην Ελλάδα τα πρώτα περιστατικά περιγράφονται το 2006 (Paranikolaou et al., 2006).

1.3.1 Παθογένεια του HHCS

Το HHCS οφείλεται σε μεταλλάξεις στο IRE του γονιδίου *FTL*, που έχουν ως αποτέλεσμα την απώλεια της μετα-μεταγραφικής ρύθμισης στην παραγωγή της L φερριτίνης μέσω του συστήματος IRE / IRP. Οι IRP (σιδηρορυθμιστικές πρωτεΐνες) έχουν μειωμένη συγγένεια για το μεταλλαγμένο IRE και η αδυναμία (ή η μειωμένη) πρόσδεσής τους σε αυτό οδηγεί στην ανεξέλεγκτη παραγωγή L φερριτίνης ανεξαρτήτως των επιπέδων σιδήρου (Εικόνα 1.3.1). Οι μεταλλάξεις στο IRE προκαλούν δομικές και στερεοτακτικές αλλαγές, διαταράσσοντας τα σημεία πρόσδεσης των IRP (Cao et al., 2010). Η δομή της φερριτίνης, του IRE της L φερριτίνης, οι φυσιολογικοί μηχανισμοί ρύθμισής της μέσω του συστήματος IRE / IRP, καθώς και ο τρόπος δράσης του συστήματος αυτού έχουν περιγραφεί αναλυτικά σε προηγούμενα κεφάλαια της Εισαγωγής (βλ. 1.1.5.2, 1.2.4, 1.2.5.1).



Εικόνα 1.12: Στο HHCS το σύστημα IRE/IRP χάνει τη ρυθμιστική του ικανότητα **a**. Παρουσία χαμηλού ενδοκυττάριου σιδήρου, το IRP προσδένεται στο IRE και αναστέλλεται η σύνθεση της L-φερριτίνης. Όταν ο ενδοκυττάριος σίδηρος αυξηθεί το IRE διαχωρίζεται από το IRP και η L-φερριτίνη μεταφράζεται. **b**. Παρουσία μεταλλάξεων στο IRE, το IRP χάνει την προσδετική του συγγένεια προς το IRE και η L-φερριτίνη υπερπαράγεται. (Papanikolaou et al., 2006)

Παρά την απώλεια των κατασταλτικών μηχανισμών στην παραγωγή της L φερριτίνης, η ομοιοστασία του σιδήρου δεν επηρεάζεται στο HHCS (Beaumont et al., 1995). Η παραγωγή της H φερριτίνης παραμένει φυσιολογική, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται πολυμερή φερριτίνης ιδιαίτερα πλούσια σε L υπομονάδες. Στον ορό, το ποσοστό της G φερριτίνης (γλυκοζυλιωμένη φερριτίνη – βλ. Κεφάλαιο 1.2.2) μειώνεται (20-42%) (Crook, 2012). Συγχρόνως υπάρχει ενδοκυττάρια συσσώρευση ομοπολυμερών L φερριτίνης (H_0L_{24}), τα οποία δεν έχουν λειτουργική σημασία (Levi et al., 1998). Τα ομοπολυμερή δεν έχουν την ικανότητα να αποθηκεύουν σίδηρο γιατί δεν έχουν σιδηροξειδωτική δράση, την οποία έχει μόνο η H φερριτίνη (Santambrogio et al. 1996, Corsi et al., 1998). Η παθογένεια του καταρράκτη στο HHCS δεν είναι απολύτως εξακριβωμένη. Θα συζητηθεί αναλυτικά σε παρακάτω κεφάλαιο.

Το HHCS αποτελεί ένα μοναδικό ανθρώπινο μοντέλο για τη μελέτη του ρόλου της φερριτίνης. Το γεγονός ότι ο ενδοκυττάριος μεταβολισμός του σιδήρου δεν επηρεάζεται, παρά τη μεγάλη αύξηση της L φερριτίνης, ενισχύει τον ξεχωριστό ρόλο των δύο υπομονάδων της φερριτίνης, με την L να έχει καθαρά αποθηκευτική δραστηριότητα, η οποία όμως καθορίζεται από την σιδηροξειδωτική δράση της H φερριτίνης. Η εμμένουσα υπερφερριτιναιμία στο HHCS ακόμα και σε ένδεια σιδήρου (Girelli et al., 2001), υπογραμμίζει τη σημασία της μετα-μεταγραφικής ρύθμισής της μέσω του συστήματος IRE / IRP στην ομοιοστασία του ενδοκυττάριου σιδήρου.

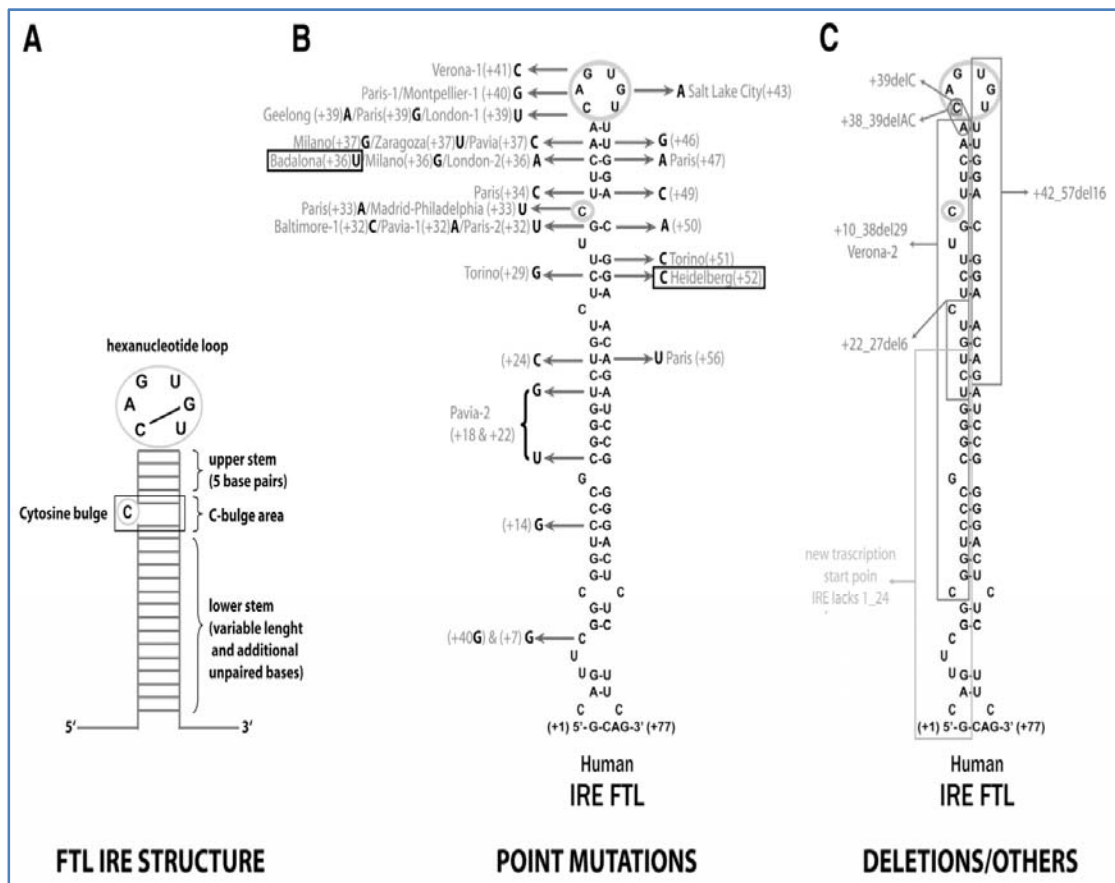
1.3.2 Μεταλλάξεις στο HHCS

Το HHCS κληρονομείται με επικρατούντα αυτοσωμικό τρόπο. Το γονίδιο *FTL* εδράζεται στο χρωμόσωμα 19q13.3-q13.4, και όπως έχει ήδη αναφερθεί αποτελείται από 4 εξώνια, 3 εσώνια, τον εκκινητή και την περιοχή του μοναδικού IRE στο 5' μη μεταφραζόμενο άκρο (5'UTR). Οι μεταλλάξεις στο HHCS είναι ετερογενείς και από την πρώτη περιγραφή το 1995 έως και σήμερα έχουν περιγραφεί 37 διαφορετικές μεταλλάξεις, από τις οποίες οι 31 είναι σημειακές μεταλλάξεις, ενώ οι 6 είναι εξαλείψεις βάσεων ποικίλων μεγεθών. Οι περισσότερες μεταλλάξεις εντοπίζονται στον εξανουκλεοτιδικό βρόγχο του IRE, λιγότερες στην ασύμμετρη τετρανουκλεοτιδική προεξοχή, και ακόμα λιγότερες στο ανώτερο και κατώτερο τμήμα του στελέχους (Εικόνα 1.13).

Οι πλειονότητα των μεταλλάξεων είναι οικογενείς, με τα περισσότερα περιστατικά που περιγράφονται στη βιβλιογραφία να έχουν θετικό οικογενειακό ιστορικό. Αναφέρονται όμως και λίγες περιπτώσεις *de novo* μεταλλάξεων (Arosio et al., 1999; Girelli et al., 2001; McLeod et al., 2002; Craig et al., 2003; Hetet et al., 2003).

Οι μεταλλάξεις στο HHCS είναι επικρατείς και ανιχνεύονται σε ετερόζυγη κατάσταση. Ομόζυγες μεταλλάξεις είναι πολύ σπάνιες και μέχρι

σήμερα έχουν περιγραφεί 3 μόνο περιπτώσεις στη βιβλιογραφία (Alvarez-Coca-Gozalez et al., 2010; Giansily-Blaizot et al., 2013; Luscieti et al., 2013). Η ομόζυγη κατάσταση σε επικρατούσες μεταλλάξεις δεν είναι συνήθως βιώσιμη, στις περιπτώσεις όμως της ομοζυγωτίας των μεταλλάξεων στο IRE, ο φαινότυπος δεν επηρεάστηκε σημαντικά σε σχέση με την ετερόζυγη κατάσταση.

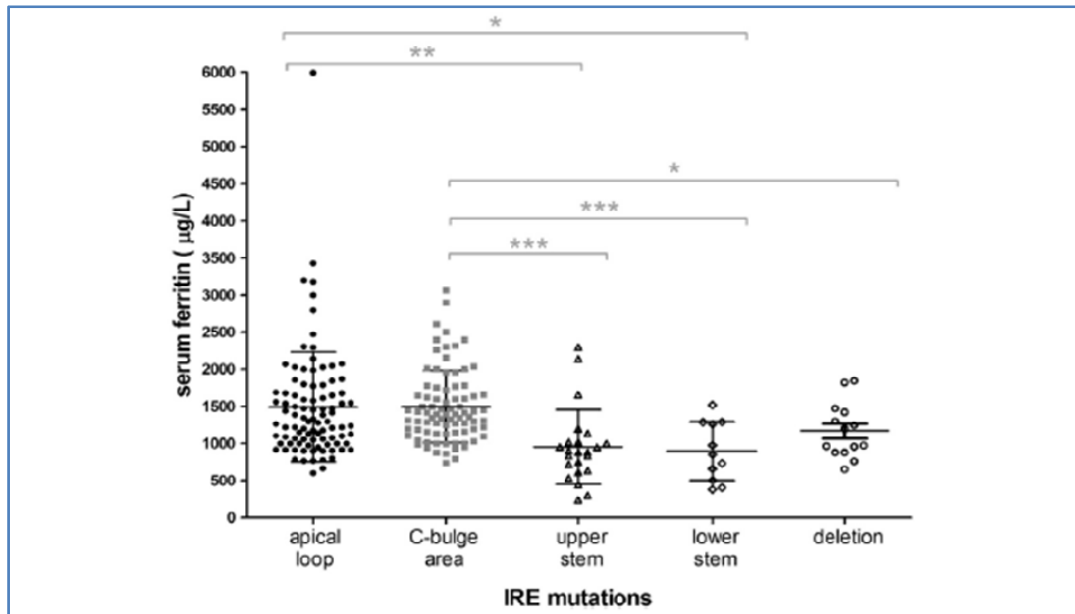


Εικόνα 1.13: Σχηματική απεικόνιση του IRE του FTL (A) και απεικόνιση όλων των γνωστών σημειακών μεταλλάξεων (B) και των εξαλείψεων βάσεων (C) στο HHCS (Luscieti et al., 2013)

1.3.3 Συσχέτιση μεταξύ γονοτύπου και φαινοτύπου στο HHCS

Πολλοί μελετητές μέχρι σήμερα προσπάθησαν να συσχετίσουν τη θέση της μετάλλαξης στο IRE με την κλινική εικόνα του συνδρόμου. Μέσω θερμοδυναμικής ανάλυσης, μετρήθηκε η συγγένεια με την οποία προσδένονται οι IRP σε IRE με διαφορετικές μεταλλάξεις, και βρέθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων φερριτίνης στον ορό και του βαθμού μείωσης της συγγένειας πρόσδεσης των IRP για τα μεταλλαγμένα IRE (Allerson et al., 1999). Μεταλλάξεις που αφορούν το βρόγχο του IRE σχετίζονται με υψηλότερου βαθμού υπερφερριτιναιμία (>1000 μg/L) και εμφάνιση καταρράκτη σε μικρότερες ηλικίες, σε σχέση με τις μεταλλάξεις που βρίσκονται στα στελέχη του IRE (Ferrante et al., 2005). Σε μια πρόσφατη ανάλυση όλων των γνωστών από τη βιβλιογραφία περιπτώσεων HHCS, μελετήθηκε η συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων φερριτίνης και του σημείου της μετάλλαξης στη δομή του IRE (Εικόνα 1.14). Οι συγγραφείς καταλήγουν ότι μεταλλάξεις που αφορούν τις δομές του IRE που συμμετέχουν ενεργά στην πρόσδεση με τις IRP (εξανουκλεοτιδικός βρόγχος, τετρανουκλεοτιδική προεξοχή) ανιχνεύονται σε ασθενείς με υψηλότερες τιμές φερριτίνης, ενώ οι ασθενείς με μεταλλάξεις στο ανώτερο και κατώτερο τμήμα του στελέχους του IRE έχουν μετρίου βαθμού υπερφερριτιναιμία (Luscieti et al., 2013).

Συγχρόνως όμως με τα παραπάνω στοιχεία, σε πολλές περιπτώσεις διαπιστώθηκε μεγάλη κλινική ετερογένεια σε άτομα με την ίδια μετάλλαξη είτε προέρχονται από την ίδια οικογένεια είτε όχι (Girelli et al., 2001; Craig et al., 2003). Επομένως, η καθαρή συσχέτιση μεταξύ φαινοτύπου και γονοτύπου δεν είναι εφικτή. Φαίνεται λοιπόν, ότι η κλινική εικόνα του HHCS επηρεάζεται και από άλλους παράγοντες, όπως η ηλικία, το φύλο, η παρουσία άλλων παθολογικών καταστάσεων και η διεισδυτικότητα άλλων γονιδίων. Θα μπορούσε κανείς να καταλήξει ότι υπάρχει μια τάση συσχέτισης των επιπέδων της φερριτίνης με τη θέση της μετάλλαξης στη δομή του IRE.



Εικόνα 1.14: Συσχέτιση γονοτύπου-φαινοτύπου σε όλους τους ασθενείς με HHCS. Το γράφημα δείχνει τη σχέση μεταξύ των επιπέδων φερριτίνης ορού και θέσης της μετάλλαξης στο IRE. Μεταλλάξεις στο βρόγχο (apical loop) και στην προεξοχή (C bulge) σχετίζονται με μεγαλύτερου βαθμού υπερφερριτιναιμία [* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$] (Luscieti et al., 2013).

1.3.4 Κλινικά χαρακτηριστικά του HHCS

1.3.4.1 Υπερφερριτιναιμία χωρίς υπερφόρτωση σιδήρου

Το HHCS χαρακτηρίζεται από αυξημένη φερριτίνη ορού και αμφοτερόπλευρο καταρράκτη. Παρά την αύξηση της φερριτίνης μέχρι και 20 φορές του φυσιολογικού, δεν παρατηρούνται στοιχεία υπερσυσσώρευσης σιδήρου (Cazzola et al., 2002). Ο σίδηρος ορού, η συνολική σιδηροδεσμευτική ικανότητα ορού (TIBC - total iron binding capacity) και ο κορεσμός τρανσφερρίνης (σίδηρος ορού / TIBC) παραμένουν εντός φυσιολογικών ορίων, εφόσον δε συνυπάρχει άλλη παθολογική κατάσταση (π.χ. σιδηροπενία, χρόνια φλεγμονή). Στις περιπτώσεις που διενεργήθηκαν βιοψία ήπατος, οστεομυελική βιοψία ή μαγνητική τομογραφία, δε διαπιστώθηκαν στοιχεία ιστικής εναπόθεσης σιδήρου (Cicilano et al., 1999; Mohn et al., 2005; Rufer et al., 2011). Τα επίπεδα της επιδίνης ορού σε ασθενείς με HHCS βρέθηκαν να είναι παρόμοια με αυτά του υγιή πληθυσμού (Arnold et al., 2010). Στη συγκεκριμένη μελέτη, οι συγγραφείς καταλήγουν ότι

η L φερριτίνη δεν επηρεάζει την παραγωγή της εψιδίνης και δεν παίζει ενεργό ρόλο στους μηχανισμούς μέσω των οποίων το ηπατοκύτταρο διαχειρίζεται το σίδηρο.

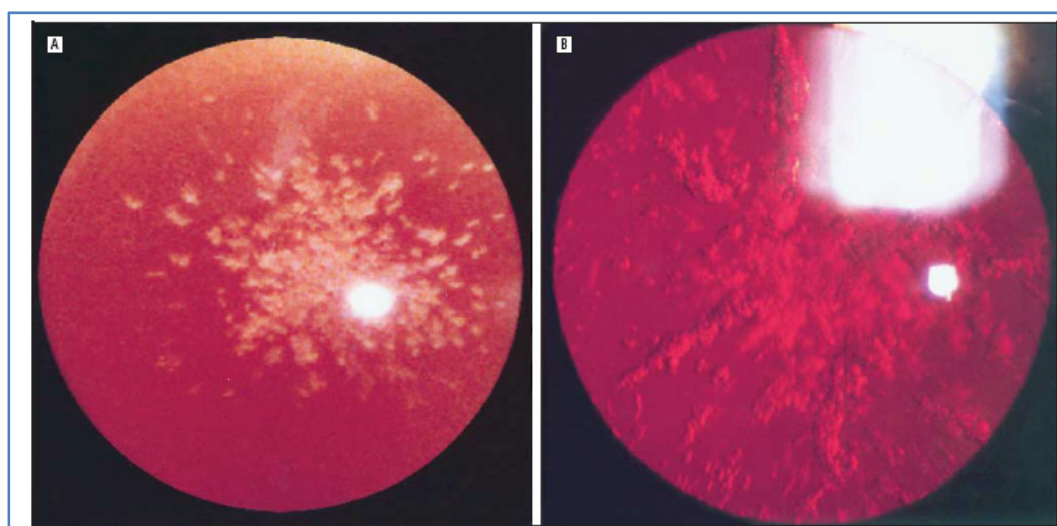
Η υπερφερριτιναιμία στο HHCS διατηρείται ακόμα και σε καταστάσεις σιδηροπενίας (Cicilano et al., 1999; Meneses et al., 2011). Στις περιπτώσεις αυτές, η αυξημένη φερριτίνη συνοδεύεται από χαμηλό σίδηρο ορού και χαμηλό κορεσμό τρανσφερρίνης. Παρόμοια εργαστηριακή εικόνα παρουσιάζουν οι ασθενείς με χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα (αναιμία χρόνιας νόσου) και νόσο της φερροπορτίνης (βλ. Εισαγωγή 1.1.3) (Rufert et al., 2011). Οι πρώτοι έχουν αυξημένους δείκτες φλεγμονής, ενώ οι δεύτεροι έχουν υπερφόρτωση σιδήρου στα μακροφάγα (Hetet et al., 2003). Και οι δύο ομάδες ασθενών έχουν αυξημένη εψιδίνη και δεν αναπτύσσουν καταρράκτη σε νεαρή ηλικία (Camaschella and Poggiali, 2009).

1.3.4.2 Ο καταρράκτης στο HHCS

Ο αμφοτερόπλευρος καταρράκτης είναι το μόνο κλινικό εύρημα στο HHCS. Αρχικά είχε χαρακτηριστεί ως συγγενής (Bonneau et al., 1995; Girelli et al., 1995; Cazzola et al., 1997), στη συνέχεια όμως η ανάδειξη περιπτώσεων με HHCS χωρίς εγκατεστημένο καταρράκτη έθεσε υπό αμφισβήτηση την αρχική παρατήρηση. Φαίνεται ότι ο καταρράκτης στο HHCS είναι επίκτητος και εμφανίζεται στην πλειοψηφία του πριν την ηλικία των 40 ετών (Ferrante et al., 2005). Σε πολλές μελέτες αναφέρεται η διάγνωση του καταρράκτη από την παιδική και βρεφική ηλικία (Girelli et al., 2001; Campagnoli et al., 2002; McLeod et al., 2002; Craig et al., 2003). Χαρακτηριστικά σε μια μελέτη από τη Γερμανία αναφέρεται αμφοτερόπλευρος καταρράκτης σε βρέφος 12 μηνών (Rochow et al., 2009), ενώ σε άλλη περίπτωση αρχόμενες αλλαγές στο φακό έχουν περιγραφεί ακόμα και σε ηλικία 9 εβδομάδων (Craig et al., 2003). Η πλειονότητα των περιστατικών με HHCS παρουσιάζει μείωση της οπτικής οξύτητας και εμφάνιση καταρράκτη κατά τη δεύτερη και τρίτη δεκαετία της ζωής. Αρχικά οι διαταραχές της όρασης είναι συνήθως άτυπες με σταδιακή εμφάνιση, ενώ αναφέρονται και περιστατικά που παραμένουν ασυμπτωματικά, παρά τη διαπίστωση

εγκατεστημένου καταρράκτη (Craig et al., 2003). Οι περισσότεροι ασθενείς αναφέρουν θάμβος οράσεως, το οποίο επιδεινώνεται με το έντονο φως, με κάποιους από αυτούς να παρουσιάζουν φωτοφοβία κατά την οφθαλμολογική εξέταση.

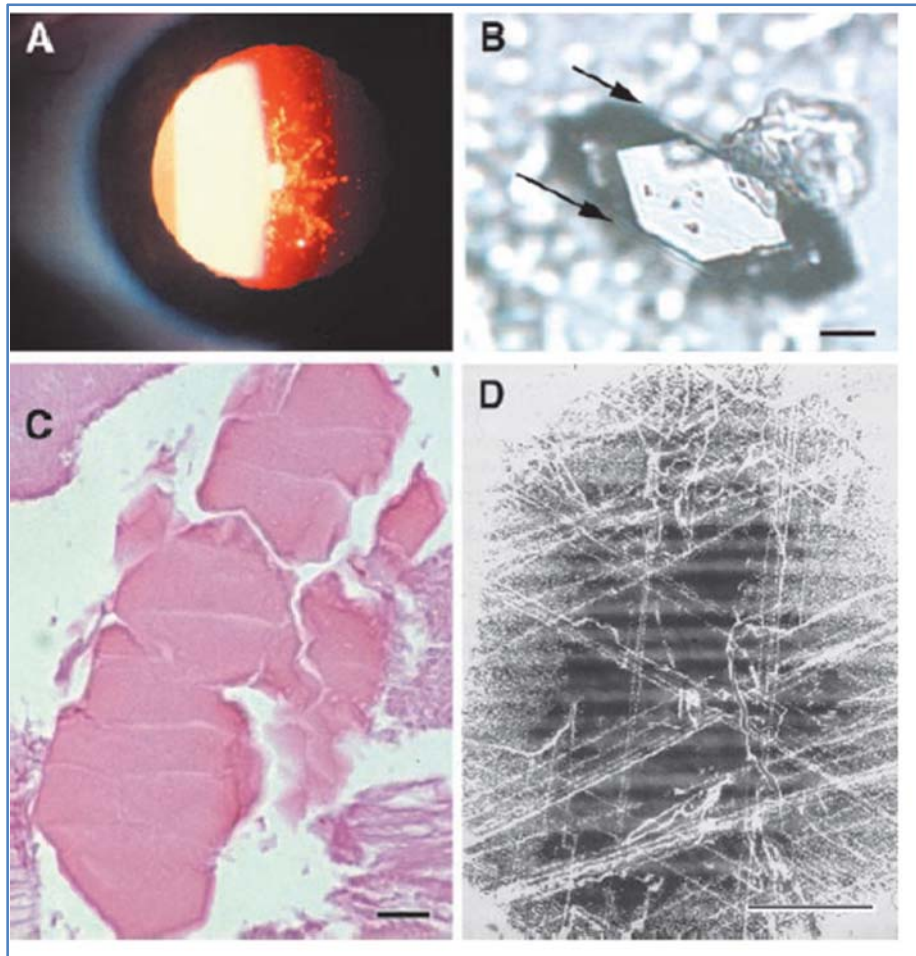
Ο καταρράκτης στο HHCS αρχικά περιγράφηκε ως πυρηνικός (Cazzola et al., 1997). Στη συνέχεια, περιγράφηκε ως μια κεντρική περιοχή θολερότητας στον πυρήνα του φακού, με άλλες παρόμοιες περιοχές να αναπτύσσονται ακτινωτά στο φλοιό (Mumford et al., 2000). Ο Girelli αναφέρει δύο μορφολογίες καταρράκτη, μια κονιοποιημένου και μια δίκην ηλιοτροπίου (Girelli et al., 2001), ενώ ο Chang-Godinich περιγράφει σπικτικές περιοχές θολερότητας στον πυρήνα και το φλοιό του φακού (Chang-Godinich et al., 2001). Δίνεται πλέον η εντύπωση ότι πρόκειται για χαρακτηριστική εικόνα διάχυτων κυστικών και κρυσταλλικών εναποθέσεων στο φλοιό και στον πυρήνα του φακού, οι οποίες εμφανίζονται αρχικά στην περιφέρεια και στη συνέχεια προσβάλλουν κεντρικότερα σημεία (Craig et al., 2003). Η καλή μυδρίαση και η ενημέρωση του οφθαλμιάτρου για τη χαρακτηριστική κατανομή των εναποθέσεων είναι σημαντικά για τη σωστή εκτίμηση των περιστατικών με HHCS (Εικόνα 1.15).



Εικόνα 1.15. Χαρακτηριστικός καταρράκτης ατόμου με HHCS. Διακρίνονται οι διάχυτες κυστικές και κρυσταλλικές εναποθέσεις στο φλοιό και τον πυρήνα του φακού. Η αριστερή φωτογραφία τραβήχτηκε σε ηλικία 3 ετών και η δεξιά 13 χρόνια μετά. Φαίνεται η σταδιακή επιδείνωση του καταρράκτη (Craig et al., 2003).

Ο ακριβής παθογενετικός μηχανισμός που οδηγεί στη δημιουργία καταρρακτών στο HHCS δεν είναι γνωστός. Η ανάλυση των φακών ασθενών με HHCS που χειρουργήθηκαν για καταρράκτη, έδειξε συγκεντρώσεις L φερριτίνης τουλάχιστον 10 φορές μεγαλύτερες από εκείνες στους φακούς άλλων ασθενών (Levi et al., 1998; Mumford et al., 2000; Girelli et al., 2001). Είναι πιθανό να δημιουργούνται κρυσταλλικές δομές πλούσιες σε L φερριτίνη (ομοπολυμερή ή ετεροπολυμερή), λόγω της αυξημένης συγκέντρωσής της στο φακό. Λόγω της μειωμένης καταβολικής του δραστηριότητας, ο φακός αδυνατεί να απαλλαχθεί από τα ομοπολυμερή ή τα ετεροπολυμερή γρήγορα, με αποτέλεσμα η αύξηση της συγκέντρωσής τους να οδηγεί τελικά στην εναπόθεσή τους στον πυρήνα και το φλοιό (Goralska et al., 2003). Συγχρόνως, πειράματα σε επιθηλιακά κύτταρα από φακό έδειξαν ότι με την υπερέκφραση της L φερριτίνης, τα επιθηλιακά κύτταρα ήταν πιο ευαίσθητα στη UV ακτινοβολία, γνωστό παράγοντα κινδύνου στη δημιουργία καταρράκτη (Goralska et al., 2001).

Ο καταρράκτης στο HHCS δεν είναι σταθερός, αλλά εμφανίζει σταδιακή επιδείνωση, όπως φαίνεται από διαδοχικές φωτογραφίες στο πλαίσιο παρακολούθησης ασθενών με HHCS (Craig et al., 2003) (Εικόνα 1.15), επιβεβαιώνοντας τη σταδιακή εναπόθεση κρυστάλλων L φερριτίνης, που πιθανότατα επηρεάζει τη διαλυτότητα και άλλων πρωτεϊνών στο φακό (Levi et al., 1998). Το γεγονός ότι άλλες καταστάσεις χρόνιας υπερφερριτιναιμίας, όπως π.χ. η νόσος της φερροπορτίνης, δε σχετίζονται με καταρράκτες, πιθανότατα οφείλεται στην αύξηση και των δύο υπομονάδων της φερριτίνης, και στο γεγονός ότι η H φερριτίνη δε συσσωρεύεται στο φακό (Ferrante et al., 2005).



Εικόνα 1.16. Στοιχεία του καταρράκτη και των κρυσταλλικών εναποθέσεων στο HHCS. A. Εξέταση με σχισμοειδή λυχνία – Διακρίνονται οι περιοχές θολερότητας στο φακό. B. Κρυσταλλικές δομές σε διάλυμα από φακό ασθενή με HHCS. C. Κρυσταλλικές δομές μήκους 150μm σε φακό που έχει ενσωματωθεί σε κύβο παραφίνης. D. Φωτογραφίες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου από φακό ασθενή με HHCS (Brooks et al., 2002).

1.3.4.3 Φαινοτυπική ετερογένεια στο HHCS

Το HHCS χαρακτηρίζεται από μεγάλη φαινοτυπική ετερογένεια. Τα επίπεδα της φερριτίνης, καθώς και η ηλικία εμφάνισης, ο χρόνος εξέλιξης και η μορφολογία του καταρράκτη, εμφανίζουν μεγάλες διακυμάνσεις, οι οποίες παρατηρούνται τόσο μεταξύ ασθενών με διαφορετικές μεταλλάξεις, όσο και μεταξύ ατόμων με την ίδια μετάλλαξη, είτε ανήκουν στην ίδια οικογένεια, είτε όχι. (Girelli et al., 2001). Όπως αναφέρεται και παραπάνω, η φαινοτυπική ετερογένεια δεν μπορεί να αποδοθεί αποκλειστικά στις διαφορετικές μεταλλάξεις. Οι διακυμάνσεις στη φερριτίνη πιθανότατα οφείλονται σε συνυπάρχοντες ρυθμιστικούς παράγοντες, όπως η ηλικία, το φύλο, η

παρουσία φλεγμονής, οι αυξομειώσεις των επιπέδων σιδήρου. Η κλινική ετερογένεια του καταρράκτη υποδηλώνει ότι και άλλοι παράγοντες, περιβαλλοντικοί και γενετικοί, συμβάλλουν στη δημιουργία του (Roetto et al., 2002). Τέτοιοι παράγοντες είναι η UV ακτινοβολία, το κάπνισμα, η δίαιτα, τα οιστρογόνα, καθώς και γονίδια χαμηλής διεισδυτικότητας τα οποία εμπλέκονται στο γεροντικό καταρράκτη (Hammond et al., 2000).

1.3.5 Επιδημιολογία του HHCS

Το HHCS έχει παγκόσμια γεωγραφική κατανομή, αν και τα περισσότερα περιστατικά αναφέρονται στην Ευρώπη, στις Η.Π.Α. και την Αυστραλία, γεγονός που πιθανόν οφείλεται στην ύπαρξη εξειδικευμένων κέντρων και εργαστηρίων στις περιοχές αυτές (Millonig et al., 2010). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το HHCS είναι σπάνιο και η ακριβής παγκόσμια επίπτωσή του δεν είναι εύκολο να οριστεί και να υπολογιστεί. Προσπάθειες έχουν γίνει για τον υπολογισμό της επίπτωσης σε συγκεκριμένους πληθυσμούς.

Το 2000 στην Ελβετία, εξετάστηκαν 3000 περιπτώσεις με καταρράκτη που χειρουργήθηκαν εντός μιας περιόδου 4 ετών. Δεκαεννέα (19) από τους ασθενείς χειρουργήθηκαν για αμφοτερόπλευρο καταρράκτη πριν την ηλικία των 51 ετών και μόνο 2 από τους 19 είχαν ήπια υπερφερριταιμία και θετικό οικογενειακό ιστορικό για την παρουσία καταρράκτη. Ο μοριακός έλεγχος δεν ανέδειξε μεταλλάξεις στο IRE του γονιδίου *FTL*. Οι συγγραφείς καταλήγουν ότι το HHCS είναι εξαιρετικά σπάνιο στο συγκεκριμένο πληθυσμό (Rosochova et al., 2000).

Στην Αυστραλία η ελάχιστη επίπτωση του συνδρόμου υπολογίστηκε στη 1 / 200000 του γενικού πληθυσμού (Craig et al., 2003). Η ίδια ομάδα εξέτασε αναδρομικά περιπτώσεις συγγενούς και παιδικού καταρράκτη για διάστημα 25 ετών. Μια περίπτωση στις 342 με μη οικογενή συγγενή καταρράκτη και άλλη μια από τις 30 οικογένειες με θετικό ιστορικό για

καταρράκτη διαγνώστηκαν με HHCS. Συγχρόνως, εξέτασαν το ρόλο της υπερφερριτιναιμίας σε περιπτώσεις επικρατούντα αυτοσωμικού καταρράκτη. Σε μετρήσεις που έγιναν σε 5 οικογένειες με ιστορικό επικρατούντα αυτοσωμικού καταρράκτη με εμφάνιση σε μικρή ηλικία, δεν διαπιστώθηκε υπερφερριτιναιμία.

Στην Ιταλία, εξετάστηκαν 3249 αιμοδότες και 12916 ασθενείς με καταρράκτη χωρίς να βρεθεί ούτε ένα περιστατικό με HHCS (Bozzini et al., 2003). Σε δείγμα 1100 ασθενών που παραπέμφθηκαν με πιθανή διάγνωση αιμοχρωμάτωσης αναγνωρίστηκαν 14 περιπτώσεις HHCS (Bosio et al., 2004).

Είναι πιθανό ότι περιπτώσεις με HHCS περνούν απαρατήρητες, χωρίς ποτέ να τεθεί διάγνωση. Ο ένας λόγος είναι το γεγονός ότι η φερριτίνη δεν αποτελεί εξέταση ρουτίνας κατά την οφθαλμολογική εκτίμηση ασθενή με συγγενή, παιδικό ή νεανικό καταρράκτη, και επομένως κάποιοι ασθενείς θα χειρουργηθούν χωρίς ποτέ να διαγνωστεί το υποκείμενο HHCS. Επίσης, κάποιοι γονότυποι του HHCS σχετίζονται με πολύ ηπιότερους φαινοτύπους. Αυτές είναι οι περιπτώσεις με μεταλλάξεις στο κατώτερο τμήμα του στελέχους του IRE, οι οποίες δεν επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την πρόσδεση των IRP (Girelli et al., 2001). Ένας ασθενής με ήπια υπερφερριτιναιμία και υποκλινικό καταρράκτη μπορεί να μη γίνει ποτέ κλινικά αντιληπτός.

1.3.6 Διάγνωση και θεραπεία του HHCS

1.3.6.1 Διάγνωση του HHCS

Η διάγνωση του HHCS βασίζεται στην ανεύρεση υπερφερριτιναιμίας σε συνδυασμό με αμφοτερόπλευρο καταρράκτη, αρχόμενο από νεαρή ηλικία. Το οικογενειακό ιστορικό είναι συνήθως θετικό για την ύπαρξη αυξημένης φερριτίνης και καταρράκτη από νεαρή ηλικία, χωρίς όμως να αποκλείονται και οι *de novo* περιπτώσεις, όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω. Επομένως, η

απουσία θετικού οικογενειακού ιστορικού δε θα πρέπει να αποτρέπει τη διενέργεια μοριακού ελέγχου. Από τον εργαστηριακό έλεγχο δεν αναμένεται κάτι παθολογικό πέραν της υπερφερριταιμίας, ενώ οι δείκτες μεταβολισμού του σιδήρου (σίδηρος ορού, κορεσμός τρανσφερρίνης) είναι φυσιολογικοί (εκτός αν συνυπάρχει σιδηροπενία ή υπερφόρτωση σιδήρου).

Για την τελική διάγνωση του HHCS απαραίτητη είναι η ανάδειξη μεταλλάξεων στο IRE του γονιδίου *FTL*. Ο μοριακός έλεγχος για την ανεύρεση μεταλλάξεων στο HHCS βασίζεται κυρίως στην ανάγνωση της πρωτοταγούς ακολουθίας των βάσεων του DNA (sequencing) του IRE. Η μέθοδος είναι σχετικά εύκολη, εφόσον οι αντιδράσεις έχουν προτυπωθεί, αξιόπιστη και δίνει τη δυνατότητα ανίχνευσης όλων των πιθανών μεταλλάξεων. Μια άλλη μέθοδος είναι αυτή του πολυμορφισμού μήκους θραυσμάτων εκ περιορισμού (RFLP), η οποία ανιχνεύει για συγκεκριμένες μεταλλάξεις στην περιοχή του IRE. Δύο άλλες τεχνικές που έχουν αναπτυχθεί και αφορούν κυρίως σε ταυτόχρονη επεξεργασία πολλών διαφορετικών δειγμάτων, είναι η διπλά διαβαθμισμένη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (double-gradient denaturing gradient gel electrophoresis) και η πιο καινούρια μέθοδος της αποδιατακτικής υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (denaturing high-performance liquid chromatography). Η πρώτη μέθοδος επιτρέπει την ανίχνευση πολλών διαφορετικών μεταλλάξεων ταυτόχρονα (Giansily et al., 2001), ενώ η δεύτερη είναι πιο γρήγορη, πιο οικονομική και λιγότερο κοπιαστική (Cremonesi et al., 2003). Η ακρίβεια και η αξιοπιστία και των δύο αυτών τεχνικών είναι σχεδόν 100%. Τέλος, μια ομάδα από την Ιταλία κατασκεύασε ένα μικροηλεκτρονικό DNA chip για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο IRE σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων, με σκοπό τη χρήση του σε επιδημιολογικές μελέτες και πληθυσμιακές καταγραφές (Ferrari et al., 2006).

1.3.6.2 Θεραπευτικοί χειρισμοί στο HHCS

Το HHCS δε χρήζει θεραπείας, παρά μόνο οφθαλμολογικής παρακολούθησης και αποκατάστασης φακού (Paranikolaou et al., 2006). Οι αφαιμάξεις στους ασθενείς με HHCS οδηγούν στη γρήγορη ανάπτυξη

σιδηροπενικής αναιμίας (Cazzola et al., 1997; Craig et al., 2003). Η ενημέρωση του ασθενή και του συγγενικού περιβάλλοντός του σχετικά με την παθογένεια του ΗΗCS είναι απαραίτητη προκειμένου ο ασθενής να εφησυχάζεται και να αποφεύγονται περαιτέρω περιπτώσεις και επιβλαβείς εξετάσεις.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η παρούσα διατριβή εξελίχθηκε στο πλαίσιο της συμμετοχής μου στην Ομάδα Έρευνας Μεταβολισμού του Σιδήρου στο Εργαστήριο της Α΄ Παθολογικής Κλινικής και στο Ηπατολογικό Ιατρείο της ίδιας κλινικής του ΓΝΑ «Λαϊκό». Στόχος της μελέτης ήταν η διερεύνηση, φαινοτυπικά και γενετικά, των ασθενών με υπερφερριτιναιμία που προσήλθαν ή παραπέμφθηκαν το διάστημα 06.2005 έως 12.2012.

Η ανεύρεση υψηλής φερριτίνης ορού αποτελεί συχνό εύρημα σε εργαστηριακό έλεγχο ρουτίνας και η διερεύνηση της ασυμπτωματικής υπερφερριτιναιμίας είναι συχνή αιτία παραπομπής ασθενών σε τριτοβάθμια κέντρα υγείας, όπως είναι το Ηπατολογικό Ιατρείο της Α΄ Παθολογικής Κλινικής. Προκειμένου να διερευνηθούν τα αίτια της ασυμπτωματικής υπερφερριτιναιμίας, έγινε λεπτομερής καταγραφή του ιστορικού και της κλινικής εικόνας των ασθενών, καθώς και των εργαστηριακών ευρημάτων. Όπου κρίθηκε αναγκαίο βάσει των κλινικών πληροφοριών, διενεργήθηκε ο απαραίτητος μοριακός έλεγχος προκειμένου να τεθεί διάγνωση. Τα κλινικά στοιχεία, τα αποτελέσματα του μοριακού ελέγχου και οι τελικές διαγνώσεις των ασθενών συγκεντρώθηκαν και επεξεργάστηκαν προκειμένου να βγουν συμπεράσματα σχετικά με τη διαγνωστική προσέγγιση και αντιμετώπιση της ασυμπτωματικής υπερφερριτιναιμίας, σε σύγκριση πάντα με τα υπάρχοντα στοιχεία από τη διεθνή βιβλιογραφία.

Ένας σημαντικός αριθμός ατόμων που διερευνήθηκαν για υπερφερριτιναιμία εμφάνιζαν καταρράκτη σε νεαρή σχετικά ηλικία. Τα περιστατικά αυτά διερευνήθηκαν για την παρουσία του κληρονομικού συνδρόμου υπερφερριτιναιμίας καταρράκτη (Hereditary Hyperferritinemia Cataract Syndrome - HHCS), το οποίο περιγράφεται στη βιβλιογραφία τα τελευταία 18 χρόνια και αναγνωρίζεται ως σπάνιο αίτιο ασυμπτωματικής υπερφερριτιναιμίας. Στο δεύτερο και κύριο μέρος στην παρούσα μελέτη δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση στη φαινοτυπική καταγραφή Ελλήνων ασθενών που

εμφανίζουν υπερφερριτιναιμία και καταρράκτη, καθώς και στη διερεύνηση της γενετικής βάσης του συνδρόμου στον ελληνικό πληθυσμό. Στην Ελλάδα το HHCS αναφέρεται πρώτη φορά το 2006, με την περιγραφή των πρώτων περιστατικών. Η παρούσα εργασία αποτελεί παράλληλα μια πρώτη μεγάλη καταγραφή του κληρονομικού συνδρόμου υπερφερριτιναιμίας καταρράκτη στην Ελλάδα.

3. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Κλινικό υλικό - Ασθενείς

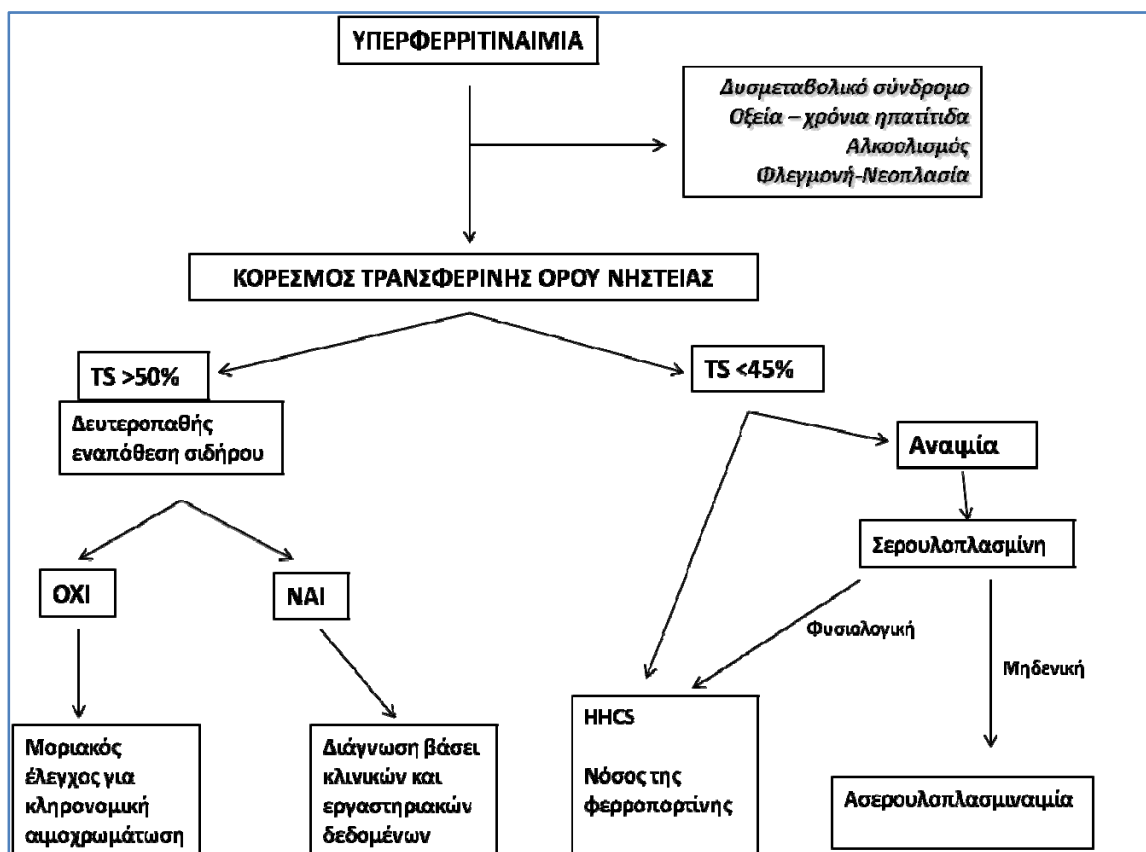
3.1.1 Καταγραφή και διαγνωστική προσέγγιση ασθενών με υπερφερριτιναιμία

Καταγράφηκαν οι ασθενείς με υπερφερριτιναιμία που προσήλθαν ή παραπέμφθηκαν στο Ηπατολογικό Ιατρείο της Α' Παθολογικής Κλινικής του ΓΝΑ «Λαϊκό» το διάστημα 06.2005 έως 12.2012. Συνολικά καταγράφηκαν 87 ασθενείς με αδιάγνωστη εμμένουσα υπερφερριτιναιμία, οι οποίοι προέρχονταν από διάφορα μέρη της Ελλάδας. Για όλους τους ασθενείς έγινε καταγραφή του ιατρικού ιστορικού, της κλινικής εξέτασης και διενεργήθηκε εργαστηριακός έλεγχος βάσει κλινικών ενδείξεων.

Το πρώτο στάδιο στη διερεύνηση της ασυμπτωματικής υπερφερριτιναιμίας περιλάμβανε την αξιολόγηση των στοιχείων του ιστορικού και της κλινικής εξέτασης σε συνδυασμό με το βασικό εργαστηριακό και απεικονιστικό έλεγχο. Στόχος ήταν να αποκλεισθούν επίκτητα αίτια υπερφερριτιναιμίας, όπως το δυσμεταβολικό σύνδρομο, η χρόνια κατανάλωση αιθανόλης, τα χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα, η οξεία και η χρόνια ηπατίτιδα, ο καρκίνος και η δευτεροπαθής υπερφόρτωση με σίδηρο. Σημαντικά στοιχεία από το ιστορικό ήταν το ατομικό αναμνηστικό, το οικογενειακό ιστορικό, η κατανάλωση αιθανόλης, η λήψη φαρμάκων (συμπεριλαμβανομένων των σκευασμάτων σιδήρου στο παρελθόν), οι μεταγγίσεις αίματος, ενώ στην κλινική εξέταση συμπεριλαμβανόταν η μέτρηση των ανθρωπομορφικών χαρακτηριστικών (για τον υπολογισμό του δείκτη μάζας σώματος – BMI) και της αρτηριακής πίεσης. Ο βασικός εργαστηριακός έλεγχος περιλάμβανε τη γενική αίματος (συμπεριλαμβανομένων των ΔΕΚ), τη μέτρηση δεικτών φλεγμονής (CRP, ΤΚΕ), βιοχημικές εξετάσεις (σάκχαρο, τρανσαμινάσες, γGT, τριγλυκερίδια – χοληστερίνη), τη μέτρηση της

φερριτίνης, του σιδήρου ορού, της συνολικής σιδηροδεσμευτικής ικανότητας του ορού (total iron binding capacity – TIBC), και κατά περίπτωση τους δείκτες ηπατίτιδας και τους καρκινικούς δείκτες. Όπου κρίθηκε απαραίτητο διενεργήθηκαν περαιτέρω αιματολογικές (π.χ. απτσοφαιρίνες, ανοσολογικός έλεγχος) ή απεικονιστικές εξετάσεις (π.χ. υπερηχογράφημα ήπατος, αξονική τομογραφία θώρακος, άνω-κάτω κοιλίας).

Το δεύτερο στάδιο στη διερεύνηση της υπερφερριτιναιμίας αφορούσε τους ασθενείς για τους οποίους δεν κατέστη δυνατή η διάγνωση βάσει των παραπάνω κλινικών στοιχείων. Κεντρικό ρόλο στη διερεύνηση είχε ο υπολογισμός του κορεσμού τρανσφερρίνης και ο μοριακός έλεγχος, όπως φαίνεται και στο διαγνωστικό αλγόριθμο που ακολουθεί και ο οποίος χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1. Διαγνωστικός αλγόριθμος υπερφερριτιναιμίας (TS: transferrin saturation – κορεσμός τρανσφερρίνης)

Ο κορεσμός τρανσφερρίνης υπολογίστηκε από το πηλίκο του σιδήρου ορού νηστείας προς τη συνολική σιδηροδεσμευτική ικανότητα ορού – TIBC [σίδηρος / TIBC]. Τιμές ανώτερες του 50% θεωρήθηκαν παθολογικές και οι ασθενείς διερευνήθηκαν για πρωτοπαθή ή δευτεροπαθή υπερφόρτωση σιδήρου. Για τους ασθενείς με τιμές κορεσμού τρανσφερρίνης χαμηλότερες του 45% διενεργήθηκε μοριακός έλεγχος ανάλογα με τα συνυπάρχοντα κλινικά δεδομένα.

Μοριακός έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε 32 από τους 87 υπερφερριταϊκούς ασθενείς. Στους 16 από αυτούς έγινε μοριακός έλεγχος για διερεύνηση πρωτοπαθούς αιμοχρωμάτωσης και στους υπόλοιπους για ανεύρεση μεταλλάξεων στο IRE του γονιδίου *FTL*.

3.1.2 Καταγραφή ασθενών με υπερφερριταϊμία και καταρράκτη

Από τους 87 ασθενείς με υπερφερριταϊμία αναγνωρίστηκαν 16 περιστατικά που εμφάνιζαν υπερφερριταϊμία σε συνδυασμό με καταρράκτη σε νεαρή ηλικία. Τα περιστατικά αυτά διερευνήθηκαν για την παρουσία του κληρονομικού συνδρόμου υπερφερριταϊμίας καταρράκτη (HHCS).

Για την καταγραφή των ασθενών αυτών συντάχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν προτυπωμένα ερωτηματολόγια, προκειμένου να επιτευχθεί ομοιογένεια στην καταγραφή των πληροφοριών. Δείγμα του ερωτηματολογίου παρατίθεται στο παράρτημα της διατριβής. Κάποιες περιπτώσεις εξετάστηκαν αναδρομικά και για το λόγο αυτό δεν ήταν δυνατή η πλήρης καταγραφή των κλινικών πληροφοριών. Μέσω γραπτής ή τηλεφωνικής επικοινωνίας έγινε προσπάθεια συλλογής των κλινικών στοιχείων των ασθενών και των οικογενειών που δεν παρακολουθούνταν από το Ηπατολογικό Ιατρείο.

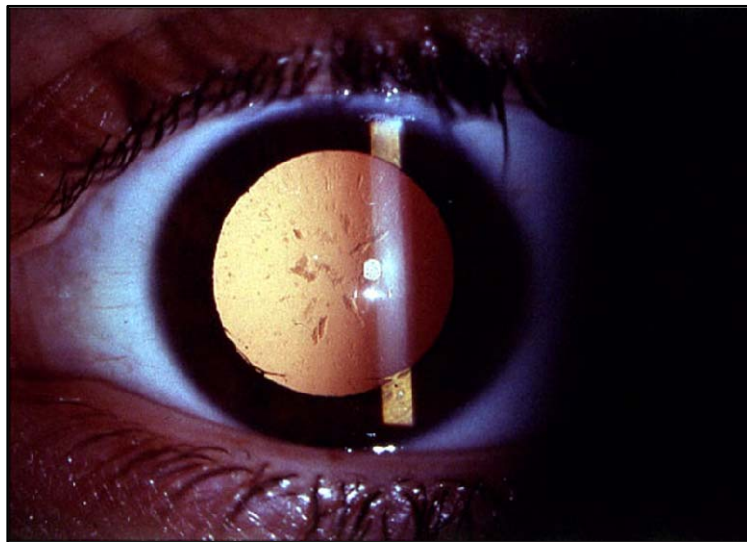
Για κάθε ασθενή στόχος ήταν:

- A) η λήψη του ατομικού και οικογενειακού ιστορικού
- B) η καταγραφή του οικογενειακού δέντρου

Γ) η κλινική εξέταση, συμπεριλαμβανομένης όπου ήταν απαραίτητο της οφθαλμολογικής με σχισμοειδή λυχνία μετά από καλή μυδρίαση (Εικόνα 3.1).

Δ) ο εργαστηριακός έλεγχος, ο οποίος συμπεριλάμβανε:

- τη φερριτίνη ορού
- το σίδηρο ορού
- τη συνολική σιδηροδεσμευτική ικανότητα ορού - TIBC
- τον υπολογισμό του κορεσμού τρανσφερίνης.



Εικόνα 3.2: Καταρράκτης σε ασθενή με κληρονομικό σύνδρομο υπερφερριτιναιμίας καταρράκτη - HHCS (άτομο δείκτης οικογενείας 5 της παρούσας μελέτης). Εξέταση με σχισμοειδή λυχνία μετά από μυδρίαση της κόρης.

3.1.3 Λήψη δειγμάτων ολικού αίματος

Για τους ασθενείς που υποβλήθηκαν σε μοριακό έλεγχο λήφθηκε δείγμα ολικού αίματος. Η λήψη έγινε σε φιαλίδιο γενικής αίματος με αντιπηκτικό EDTA και μετά από συγκατάθεση του ασθενή για τη διενέργεια διαγνωστικού μοριακού ελέγχου. Για τους ασθενείς που διερευνήθηκαν για

την παρουσία ΗΗCS, όπου κρίθηκε απαραίτητο και ήταν εφικτό, λήφθηκε δείγμα αίματος και από μέλη των οικογενειών τους.

3.2 Μέθοδοι για τη διεξαγωγή μοριακού ελέγχου

Προκειμένου να ανιχνευθούν οι μεταλλάξεις στην περιοχή του IRE του γονιδίου *FTL*, ενισχύθηκε τμήμα του γονιδίου *FTL* το οποίο περιλαμβάνει όλο το IRE. Ακολούθησε ανάγνωση της πρωτοταγούς ακολουθίας του DNA του ενισχυμένου τμήματος. Η ανεύρεση μετάλλαξης επαληθεύτηκε και με δεύτερη ανάγνωση της ακολουθίας. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος πολυμορφισμού μήκους θραυσμάτων εκ περιορισμού (Restriction Fragment Length Polymorphism-RFLP) για την ανίχνευση συγκριμένης σημειακής μετάλλαξης (C39G) στο IRE.

Ο μοριακός έλεγχος για τη διερεύνηση της πρωτοπαθούς αιμοχρωμάτωσης περιλαμβάνει την ανίχνευση 19 μεταλλάξεων των γονιδίων *HFE*, υποδοχέα τρανσφερίνης 2 (transferrin receptor 2 - *TfR2*), φερροπορτίνης (ferritin - *FPN1*) και αιμοτζουβελίνης (hemojuvelin - *HJV*). Οι μεταλλάξεις αυτές είναι οι πιο συχνές και καλύπτουν πάνω από το 85% των γνωστών μεταλλάξεων της αιμοχρωμάτωσης. Οι 18 μεταλλάξεις των γονιδίων *HFE*, *TfR2* και *FPN1* ανιχνεύτηκαν με τη χρήση της εμπορικά διαθέσιμης μεθόδου “Haemochromatosis StripAssay A” (ViennaLab, Vienna, Austria). Για την ανίχνευση της σημειακής μετάλλαξης G320V του γονιδίου *HJV* χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος RFLP).

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται αναλυτικά στη συνέχεια.

3.2.1 Απομόνωση γενωμικού DNA

Η απομόνωση γενωμικού DNA πραγματοποιήθηκε από τα εμπύρνηνα κύτταρα του αίματος. Για την απομόνωση χρησιμοποιήθηκε η εμπορικά διαθέσιμη μέθοδος NucleoSpin Blood QuickPure της εταιρίας Macherey Nagel, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Όλα τα αντιδραστήρια, που χρησιμοποιήθηκαν, εκτός του ολικού αίματος, περιλαμβάνονται στην εμπορικά διαθέσιμη συσκευασία.

Συνοπτικά, ένα διάλυμα με χαοτροπικά ιόντα, και υπό την παρουσία της πρωτεΐνης K, λύει τα κύτταρα, απελευθερώνει το DNA και δημιουργεί τις κατάλληλες συνθήκες για την προσρόφηση του στη μεμβράνη. Ακολουθούν διαδοχικές εκπλύσεις σε συνθήκες υψηλών συγκεντρώσεων αλάτων και αιθανόλης, προκειμένου άλατα, μεταβολίτες και άχρηστα κυτταρικά στοιχεία να απομακρυνθούν. Η έκλουση του καθαρού γενωμικού DNA πραγματοποιείται υπό συνθήκες χαμηλής ιονικής ισχύος στο διάλυμα έκλουσης.

Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκαν 200μL ολικού αίματος, τα οποία επώαστηκαν με 25μL πρωτεΐνης K και το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα στους 70°C προκειμένου να λυθούν τα εμπύρνηνα κύτταρα και να απελευθερωθεί το DNA. Ακολούθησε η προσρόφηση του γενωμικού υλικού στη μεμβράνη και 2 διαδοχικές εκπλύσεις με διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων αλάτων και αιθανόλης. Η έκπλυση του καθαρού γενωμικού DNA γίνεται με την προσθήκη 100 μL διαλύματος έκλουσης. Η παρουσία και η ποιότητα του γενωμικού υλικού ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (Για τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης βλ. 3.2.4).

3.2.2 Ποσοτικός προσδιορισμός DNA (φωτομετρικός προσδιορισμός)

Τα νουκλεϊκά οξέα απορροφούν την υπεριώδη ακτινοβολία και η ιδιότητά τους αυτή χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό τους σε διαλύματα. Η συγκέντρωση DNA σε διάλυμα προσδιορίζεται από τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (optic density- OD) στα 260nm. Μια μονάδα OD₂₆₀ (OD=1) αντιστοιχεί σε 50μg/mL δίκλωνου DNA και σε 33μg/mL μονόκλωνου DNA. Συγχρόνως, μπορεί να προσδιοριστεί και ο βαθμός καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων, ο οποίος δίδεται από το λόγο OD_{260nm} / OD_{280nm}. Η οπτική πυκνότητα στα 280nm αντιστοιχεί στη συγκέντρωση των πρωτεϊνών σε ένα διάλυμα, οι οποίες είναι και η κυριότερη πηγή προσμίξεων των νουκλεϊκών οξέων. Τιμές από 1,8 έως 2,0 υποδηλώνουν την παρουσία ελεύθερου προσμίξεων και καλής ποιότητας DNA.

Οι συγκεντρώσεις του γενωμικού DNA που απομονώθηκε προσδιορίστηκε από τον τύπο: OD₂₆₀ x 50μg/mL. Η καθαρότητα των διαλυμάτων των DNA από το λόγο των μετρήσεων στα 260 και τα 280 nm.

3.2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR)

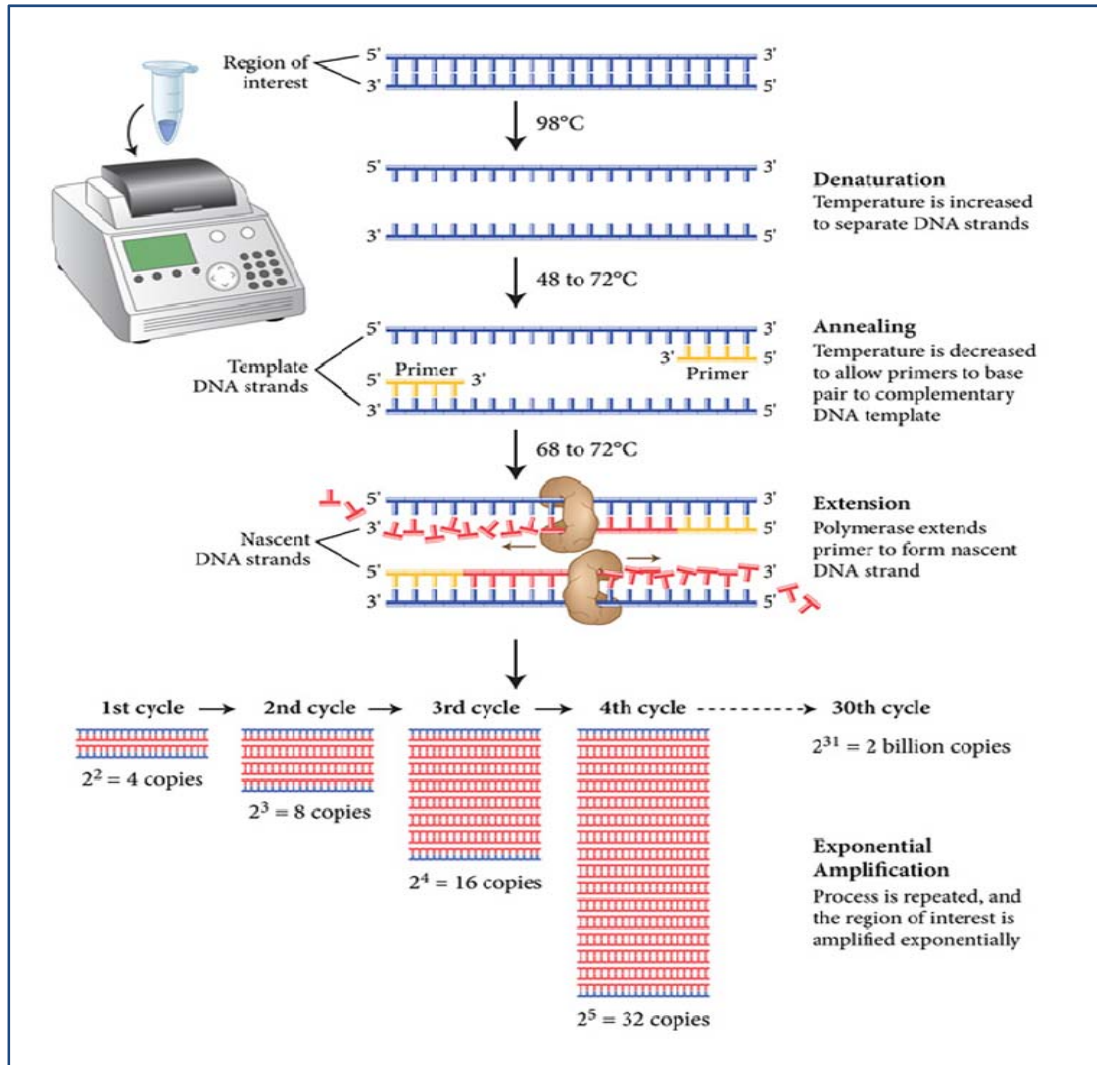
3.2.3.1 Αρχή της μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης είναι μια μέθοδος που επιτρέπει την εκλεκτική ενίσχυση ενός συγκεκριμένου τμήματος-στόχου του DNA. Προϋποθέτει ότι η αλληλουχία των βάσεων του τμήματος-στόχου είναι γνωστή. Ο πολλαπλασιασμός του επιλεγμένου τμήματος DNA βασίζεται στη δράση του ενζύμου DNA πολυμεράση και κυρίως στην ανακάλυψη θερμοανθεκτικών πολυμερασών, προϋπόθεση απαραίτητη για την εκτέλεση της αντίδρασης.

Το τμήμα του DNA προς ενίσχυση οριοθετείται από δύο ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες- τους εκκινητές (primers) - οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί ως προς την αλληλουχία-στόχο, στο 5' και στο 3' άκρο της. Το μέγεθος των εκκινητών είναι συνήθως μεταξύ 18 και 25 νουκλεοτιδικών βάσεων και ο σχεδιασμός τους προϋποθέτει, εκτός από την απόλυτη συμπληρωματικότητα ως προς το τμήμα του DNA προς ενίσχυση, να μην είναι συμπληρωματικοί μεταξύ τους και να μην παρουσιάζουν ομολογία με άλλες περιοχές του DNA. Η πολυμεράση αντιγράφει με κατεύθυνση 5' → 3' το τμήμα που ορίζεται από τους δύο εκκινητές, χρησιμοποιώντας ως μήτρα το μονόκλωνο τμήμα του DNA.

Η μέθοδος της PCR περιλαμβάνει τρεις βασικές αντιδράσεις οι οποίες επαναλαμβάνονται προκειμένου να παραχθούν μέσα σε λίγες ώρες εκατομμύρια αντιγράφων του τμήματος-στόχου του DNA. Αρχικά, το δίκλωνο DNA αποδιάσσεται σε υψηλή θερμοκρασία (93-95°C) και στη συνέχεια, ακολουθεί πτώση της θερμοκρασίας στους 55°C έως 65°C που επιτρέπει τον υβριδισμό των εκκινητών στο τμήμα-στόχο. Η τρίτη αντίδραση είναι η σύνθεση του DNA και πραγματοποιείται στους 72°C, υπό την παρουσία της θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης και των τεσσάρων τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dATP, dCTP, dGTC, dTTP). Τα τρία στάδια της αποδιάταξης- υβριδισμού- σύνθεσης πραγματοποιούνται 30-35 φορές και το παραγόμενο PCR προϊόν ενισχύεται εκθετικά σε κάθε κύκλο. Έτσι λοιπόν, στον πρώτο κύκλο παράγονται δύο δίκλινα μόρια DNA, στο δεύτερο

τέσσερα, στον τρίτο οκτώ, στον τέταρτο δεκαέξι. Μετά το πέρας των 30 κύκλων καταλήγουμε με 2^{31} αντίγραφα του ενισχυμένου τμήματος του DNA.



Εικόνα 3.3: Σχηματική απεικόνιση των σταδίων της PCR
<https://www.neb.com/applications/dna-amplification-and-pcr>)

3.2.3.2 Προτύπωση της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του IRE του γονιδίου *FTL*

Για την ενίσχυση του IRE του γονιδίου *FTL* χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές οι οποίοι ήταν ήδη γνωστοί από τη βιβλιογραφία (Hetet et al., 2003).

Πίνακας 3.1 . Εκκινητές για την ενίσχυση του IRE του γονιδίου *FTL*

| ΟΝΟΜΑ ΕΚΚΙΝΗΤΗ | ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΕΚΚΙΝΗΤΗ 5'→3' |
|-------------------|-------------------------------|
| FTL1F | CCG GCG CAC CAT AAA AGA AGC |
| FTL1R | TTA CCC GAC CGC ACA AAG AAG G |

Με τη χρήση των παραπάνω εκκινητών ενισχύεται τμήμα του γονιδίου *FTL* το οποίο περιλαμβάνει όλο το IRE και το αρχικό τμήμα του πρώτου εξωνίου. Το τελικό προϊόν της PCR αναμένεται να έχει μήκος 436 βάσεων.

Προτυπώθηκε η αντίδραση PCR για την ενίσχυση του IRE. Χρησιμοποιήθηκε η Taq πολυμεράση (Invitrogen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Σε κάθε αντίδραση τελικού όγκου 25μl χρησιμοποιήθηκαν 1μl DNA (50-100ng), ρυθμιστικό διάλυμα (1x), 2,5mM χλωριούχου μαγνησίου (MgCl₂), 12,5μmol από κάθε εκκινητή, 0,8mM μείγμα τριφωσφονουκλεοτιδίων (dNTPs), 1u Taq πολυμεράσης και αποστειρωμένο νερό (dd).

Σε τελικό όγκο 25μl αναμειγνύονται τα εξής:

- DNA 1μl
- Ρυθμιστικό διάλυμα 10x 2,5μl
- Διάλυμα MgCl₂ 0,8μl
- Μείγμα τριφωσφονουκλεοτιδίων (dNTPs) 0,75μl
- Εκκινητές (FTL1F, FTL1R) 0,75μl από τον καθένα
- Taq DNA πολυμεράση 0,35μl
- dd H₂O 18,1μl

Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν οι παρακάτω:

1. Αρχική αποδιάταξη: 95°C για 5min
2. Αποδιάταξη: 95 °C για 45sec
3. Υβριδισμός: 60 °C για 30sec
4. Επιμήκυνση: 72 °C για 45sec
5. Επανάληψη βημάτων 2-4 για 35 φορές
6. Τελική επιμήκυνση 72 °C για 5min.

Διατήρηση του προϊόντος της PCR στους -20 °C.

3.2.3.3 Multiplex PCR για την ανίχνευση μεταλλάξεων στα γονίδια *HFE*, *TfR2*, *FPN1* της κληρονομικής αιμοχρωμάτωσης

Για την ανίχνευση μεταλλάξεων των γονιδίων *HFE*, *TFR2* και *FPN1* χρησιμοποιήθηκε η εμπορικά διαθέσιμη μέθοδος “Haemochromatosis StripAssay A” (ViennaLab, Vienna, Austria). Η μέθοδος ανιχνεύει 18 μεταλλάξεις, και συγκεκριμένα 12 στο γονίδιο *HFE*, 4 στο *TfR2*, 2 στο *FPN1*, με τη χρήση της μεθόδου multiplex PCR. Η multiplex PCR βασίζεται στην ταυτόχρονη ενίσχυση πολλαπλών περιοχών στόχων του DNA σε μια μόνο PCR με τη χρήση πολλαπλών ζευγών εκκινητών. Το τελικό διάλυμα της αντίδρασης περιέχει όλα τα ενισχυμένα τμήματα του DNA, το οποία μπορούν εύκολα να ανιχνευτούν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (βλ. 3.2.4).

Η multiplex PCR στο “Haemochromatosis StripAssay A” πραγματοποιείται με 8 ζεύγη εκκινητών για την ενίσχυση τμημάτων των γονιδίων *HFE*, *TfR2*, *FPN1*. Με το πέρας της αντίδρασης τα ενισχυμένα τμήματα βιοτινυλιώνονται για να χρησιμοποιηθούν στο επόμενο στάδιο του υβριδισμού σε λωρίδες (test strips). Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν (εκτός από το DNA) συμπεριλαμβάνονται στην εμπορικά διαθέσιμη μέθοδο. Πριν από κάθε αντίδραση παρασκευάστηκε νέο διάλυμα Taq DNA πολυμεράσης με τελική συγκέντρωση 0,2 U/μl. Σε κάθε αντίδραση τελικού όγκου 25μl χρησιμοποιήθηκαν 1U Taq DNA πολυμεράσης και 25-200 ng DNA.

Σε τελικό όγκο 25μl αναμειγνύονται τα εξής:

- DNA 5μl
- Διάλυμα ενίσχυσης 15μl
- Διάλυμα Taq DNA πολυμεράσης 5μl

Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν οι παρακάτω:

1. Αρχική αποδιάταξη: 94°C για 2min
2. Αποδιάταξη: 94 °C για 15sec
3. Υβριδισμός: 58 °C για 30sec
4. Επιμήκυνση: 72 °C για 30sec
5. Επανάληψη βημάτων 2-4 για 35 φορές
6. Τελική επιμήκυνση 72 °C για 3min.

Διατήρηση του προϊόντος της PCR στους 2-8 °C.

Τα αναμενόμενα μήκη των τελικών προϊόντων της multiplex PCR είναι 118, 169, 183, 201, 247, 287, 310, 347 ζεύγη βάσεων (base pairs -bp). Μπορούν να ανιχνευτούν με ηλεκτοφόρηση σε πηκτική αγαρόζης.

3.2.3.4 Προτύπωση της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου *HJV*

Για την ανίχνευση της μετάλλαξης G320V του γονιδίου *HJV* ενισχύθηκε τμήμα του εξωνίου 4. Χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές οι οποίοι ήταν ήδη γνωστοί από τη βιβλιογραφία (Pissia et al., 2004).

Πίνακας 3.2 . Εκκινητές για την ενίσχυση τμήματος του εξωνίου 4 του γονιδίου *HJV*

| ΟΝΟΜΑ ΕΚΚΙΝΗΤΗ | ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΕΚΚΙΝΗΤΗ 5'→3' |
|-------------------|---------------------------|
| HJV_F | AACCATGTGGAGATCCAAGC |
| HJV_R | CTCCAGTGCTGCCTGAGC |

Προτυπώθηκε η αντίδραση PCR. Χρησιμοποιήθηκε η Taq πολυμεράση (Invitrogen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Σε κάθε αντίδραση τελικού όγκου 25μl χρησιμοποιήθηκαν 1μl DNA (50-100ng), ρυθμιστικό διάλυμα (1x), 2,5mM χλωριούχου μαγνησίου (MgCl₂), 12,5pmol από κάθε εκκινητή, 0,8mM μείγμα τριφωσφονουκλεοτιδίων (dNTPs), 1u Taq πολυμεράσης και αποστειρωμένο νερό (dd).

Σε τελικό όγκο 25μl αναμειγνύονται τα εξής:

- DNA 1μl
- Ρυθμιστικό διάλυμα 10x 2,5μl
- Διάλυμα MgCl₂ 0,8μl
- Μείγμα τριφωσφονουκλεοτιδίων (dNTPs) 0,75μl
- Εκκινητές (HJV_F, HJV_R) 0,75μl από τον καθένα
- Taq DNA πολυμεράση 0,35μl
- dd H₂O 18,1μl

Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν οι παρακάτω:

1. Αρχική αποδιάταξη: 95°C για 5min
2. Αποδιάταξη: 95 °C για 45sec
3. Υβριδισμός: 60 °C για 30sec
4. Επιμήκυνση: 72 °C για 30sec
5. Επανάληψη βημάτων 2-4 για 35 φορές
6. Τελική επιμήκυνση 72 °C για 5min.

Διατήρηση του προϊόντος της PCR στους -20 °C.

Με τη χρήση των εκκινητών που αναφέρονται, το τελικό προϊόν της PCR αναμένεται να έχει μήκος 333 βάσεων

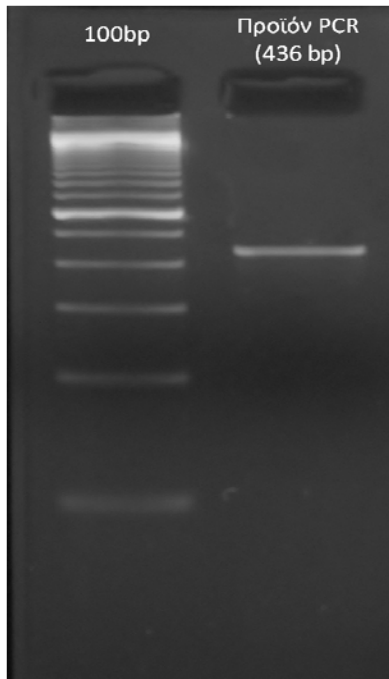
3.2.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, αναγνώριση και απομόνωση τμημάτων DNA διαφορετικού μοριακού βάρους. Τα νουκλεϊκά οξέα είναι αρνητικά φορτισμένα με αποτέλεσμα κατά την εφαρμογή τάσης στα άκρα της αγαρόζης να μετακινούνται προς το θετικό πόλο και ταυτόχρονα να διαχωρίζονται κατά το μέγεθός τους. Η συγκέντρωση της πηκτής αγαρόζης καθορίζει και τη δυνατότητα διαχωρισμού τμημάτων DNA καθορισμένου μεγέθους. Όσο μικρότερο το κομμάτι του DNA, τόσο μικρότερη αντίσταση συναντά και τόσο πιο γρήγορα μετακινείται προς το θετικό πόλο του ηλεκτρικού πεδίου. Η θέση του DNA στην πηκτή αγαρόζης γίνεται εμφανής με χρώση από βρωμιούχο αιθίδιο, μια φθορίζουσα χρωστική, η οποία περεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και εκπέμπει στο φάσμα του υπεριώδους. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να εμφανίζονται οι ζώνες των νουκλεϊκών οξέων στην πηκτή αγαρόζης με την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία. (Από Current Protocols in Molecular Biology, 2003).

Για τη σύνθεση της πηκτής αγαρόζης χρησιμοποιούνται τα εξής υλικά:

- Αγαρόζη
- Διάλυμα TBE (89mM Tris-base, 89mM boric acid, 2mM EDTA, pH8.0)
- Βρωμιούχο αιθίδιο

Για την ετοιμασία πηκτής 1,5% διαλύονται 1,5gr αγαρόζης σε 100ml διαλύματος ηλεκτροφόρησης 0,5 x TBE, το μείγμα τήκεται με θέρμανση, έως ότου γίνει διαυγές. Προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο 0,5 μg/ml και στη συνέχεια τοποθετείται σε ειδικό καλούπι μέχρι να πήξει. Με χρήση «χτενών» με δοντάκια συγκεκριμένου μεγέθους δημιουργούνται μικρές οπές «πηγαδάκια» στο πάνω μέρος της πηκτής, μέσα στις οποίες τοποθετούνται τα δείγματα της PCR. Αυτά έχουν προηγουμένως αναμειχθεί με διάλυμα φόρτωσης, το οποίο αποτελείται από μίγμα δύο χρωστικών και γλυκερόλης, που βοηθάει στην καταβύθιση του PCR προϊόντος στον πάτο του πηγαδιού (0,2 κ.ο. xylene cyanol, 0,2% κ.ο. bromophenol blue, 30% κ.ο. Glycerol). Τέλος εφαρμόζεται τάση 15V/cm στα άκρα της πηκτής.



Εικόνα 3.4: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης του προϊόντος της PCR για την ενίσχυση του IRE του γονιδίου *FTL*.

3.2.5 Καθαρισμός προϊόντος της PCR

Το προϊόν της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης, εκτός από την επιθυμητή ενισχυμένη ακολουθία, περιλαμβάνει και άλλα στοιχεία όπως μη πολλαπλασιασμένα τμήματα γενετικού υλικού, εκκινητές, dNTPs, ένζυμα και άλατα. Προκειμένου το ενισχυμένο τμήμα του DNA να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω μελέτη, όπως π.χ. για την ανάγνωση της πρωτοταγούς ακολουθίας των βάσεων του (βλ. παρακάτω), το προϊόν της PCR πρέπει να καθαριστεί από τις προσμίξεις αυτές. Ο καθαρισμός του προϊόντος της PCR γίνεται με φυγοκέντρηση σε στήλη, η οποία δεσμεύει το δίκλωνο DNA, ενώ τα υπόλοιπα στοιχεία του τελικού διαλύματος της PCR εκπλύονται.

Στην παρούσα εργασία, για τον καθαρισμό του προϊόντος της PCR χρησιμοποιήθηκε η εμπορικά διαθέσιμη μέθοδος NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey Nagel), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Όλα

τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν, εκτός από το προϊόν της PCR, περιλαμβάνονται στην εμπορικά διαθέσιμη συσκευασία.

Διαδικασία:

1. Δέσμευση του DNA:

Σε 1 όγκο προϊόντος της PCR προστίθενται 2 όγκοι ρυθμιστικού διαλύματος δέσμευσης (π.χ. 100μL προϊόντος PCR σε 200μL ρυθμιστικού διαλύματος). Το τελικό διάλυμα αναδεύεται και μεταφέρεται σε στήλη που διατίθεται από τον κατασκευαστή. Γίνεται φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου στα 11.000 x g για 30 δευτερόλεπτα. Το υγρό απορρίπτεται και η στήλη δέσμευσης επανατοποθετείται στο σωλήνα συλλογής.

2. Έκπλυση του DNA:

Προστίθεται ορισμένος όγκος (700μL) παρασκευασμένου με αιθανόλη διαλύματος έκπλυσης στη στήλη δέσμευσης. Γίνεται φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου στα 11.000 x g για 30 δευτερόλεπτα, το υγρό απορρίπτεται και η στήλη δέσμευσης επανατοποθετείται στο σωλήνα συλλογής. Γίνεται και άλλη φυγοκέντρηση στα 11.000 x g για 1 λεπτό, προκειμένου να απομακρυνθούν υπολείμματα του διαλύματος έκπλυσης.

3. Έκλουση του DNA:

Η στήλη τοποθετείται σε καθαρό σωλήνα και προστίθεται ορισμένος όγκος διαλύματος έκλουσης (25μL) και επωάζεται για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Γίνεται φυγοκέντρηση στα 11.000 x g για 1 λεπτό. Ο σωλήνας περιέχει το καθαρισμένο προϊόν της PCR.

3.2.6 Ανάγνωση της πρωτοταγούς αλληλουχίας των βάσεων του DNA (Sequencing)

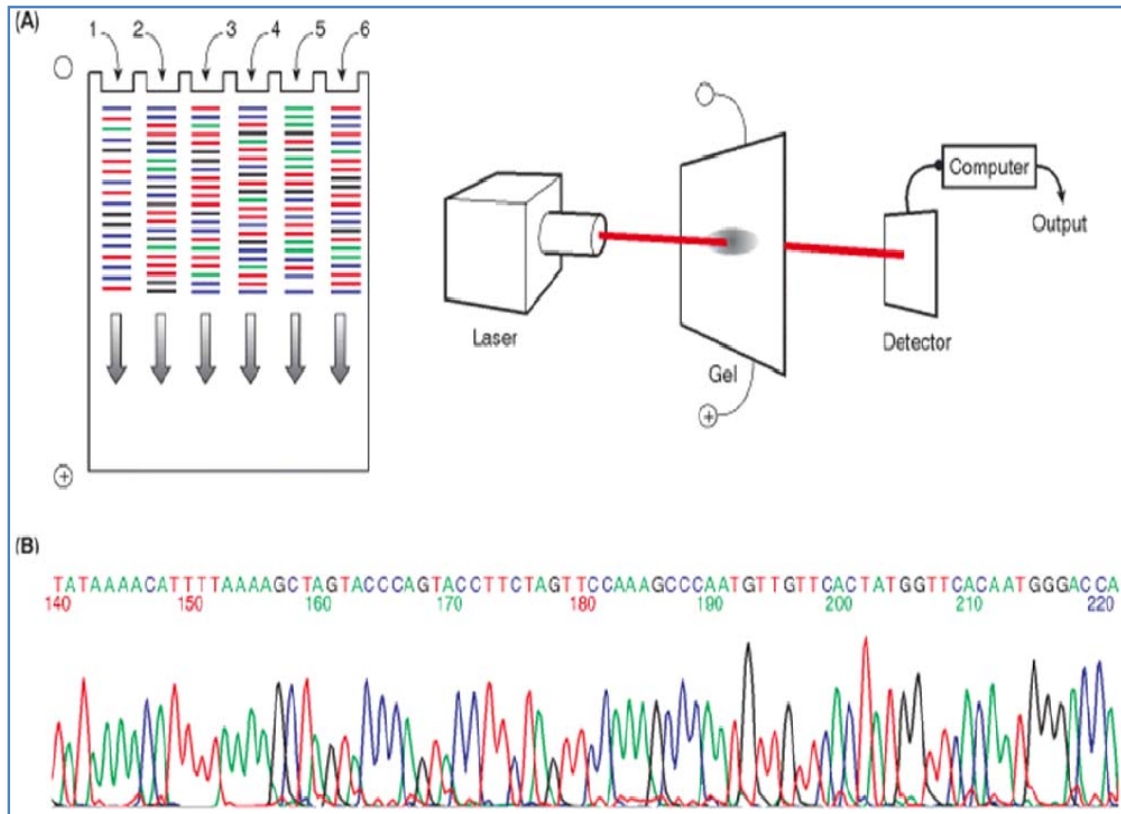
3.2.6.1 Αρχή της μεθόδου

Δύο μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για την ανάγνωση της πρωτοταγούς αλληλουχίας του DNA, η χημική μέθοδος που ανακαλύφθηκε από τους Maxam and Gilbert (1977), και η ενζυμική μέθοδος, η οποία προτυπώθηκε από τον Fred Sanger (1977). Η μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρύτερα είναι αυτή του Sanger, λόγω των σταθερότερων και μη τοξικών αντιδραστηρίων, σε αντίθεση με τη χημική μέθοδο. Η μέθοδος κατά Sanger βασίζεται στη χρήση τριφωσφορικών διδεοξυνουκλεοτιδίων (ddNTPs) και μονόκλωνου DNA, το οποίο δρα ως πρότυπο για την *in vitro* σύνθεση της συμπληρωματικής του αλυσίδας με τη δράση του ενζύμου DNA πολυμεράσης. Τα ddNTPs δρουν ως τερματιστές στη σύνθεση της αλυσίδας του DNA και είναι ειδικά για κάθε βάση του DNA.

Τα ddNTPs διαφέρουν από τα dNTPs στον 3^ο άνθρακα της δεοξυριβόζης λόγω της απουσίας του υδροξυλίου στη θέση αυτή. Τα ddNTPs ενσωματώνονται τυχαία στη σχηματιζόμενη αλυσίδα του DNA, καθώς η DNA πολυμεράση δε διακρίνει διαφορά ανάμεσα στα dNTPs και τα ddNTPs. Η σύνθεση όμως διακόπτεται με την ενσωμάτωση ενός ddNTP, καθώς αυτό δεν μπορεί να ενωθεί με το επόμενο νουκλεοτίδιο. Έτσι, η επιμήκυνση της αλυσίδας του DNA σταματά κάθε φορά σε τυχαίο νουκλεοτίδιο με την ενσωμάτωση ενός ddNTP.

Τα τέσσερα ddNTPs σημαίνονται με χρωστικές διαφορετικού χρώματος το καθένα. Η συγκέντρωση των ddNTPs είναι πολύ μικρότερη από αυτή των dNTPs, έτσι ώστε να υπερτερεί η ενσωμάτωση του dNTP από αυτή του αντίστοιχου ddNTP, το οποίο θα ενσωματωθεί σποραδικά και τυχαία προκαλώντας τερματισμό της επιμήκυνσης. Με τον τρόπο αυτό παράγεται ένα πλήθος PCR προϊόντων που διαφέρουν το ένα από το άλλο κατά μια βάση και το καθένα είναι σεσημασμένο (στην τελική του βάση) με μία από τις 4 διαφορετικές χρωστικές. Συνεπώς τα προϊόντα αυτά έχουν όμοιο αρχικό τμήμα (άκρη εκκινήτη) και διαφορετικό σημείο τερματισμού, ανάλογα με το σημείο ενσωμάτωσης του ddNTP. Με τη χρήση αυτοματοποιημένων μεθόδων

ηλεκτροφόρησης σε τριχοειδή και φθορίζουσων χρωστικών σήμανσης, η διαδικασία έχει επιταχυνθεί και η χρήση της μεθόδου είναι πλέον ευρέως διαδεδομένη.



Εικόνα 3.5: Αυτοματοποιημένη μέθοδος για sequencing του DNA. (A) Αρχές της μεθόδου. (B) Παράδειγμα προϊόντος DNA sequencing. Το κάθε διαφορετικό χρώμα αντιστοιχεί σε μια διαφορετική βάση (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=hmg.figgrp.607>)

3.2.6.2 Διαδικασία - Υλικά

Η ανάγνωση της πρωτοταγούς αλληλουχίας του IRE του γονιδίου *FTL* πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του αυτοματοποιημένου συστήματος sequencing Beckman Coulter CEQ8000.

Για την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά και διαλύματα:

- Προϊόν PCR (καθαρισμένο προϊόν από την PCR ενίσχυσης του IRE)
- Εκκινητής – FTL1F και FLT1R
- Master mix DTCS (Taq πολυμεράση, dye terminator mix ddNTPs, dNTPs, ρυθμιστικό διάλυμα 10x)
- ddH₂O

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 20μl, ως εξής:

- Προϊόν PCR 2μl (10-20ng)
- FTL1F ή FTL1R 1μl
- Master mix DTCS 4μl
- ddH₂O 13μl

Οι συνθήκες ήταν οι παρακάτω:

- Αποδιάταξη 95°C για 20sec
- Υβριδισμός 50°C για 20sec
- Επιμήκυνση 60°C για 4min

Τα παραπάνω βήματα επαναλήφθηκαν για 40 κύκλους. Μετά το πέρας των 40 κύκλων το προϊόν διατηρήθηκε στους 4 °C.

Στη συνέχεια παρασκευάστηκε stop solution (διάλυμα τερματισμού), το οποίο τερματίζει την αντίδραση. Στα 20μl προϊόντος PCR προστίθενται 5μl stop solution, αποτελούμενο από τα παρακάτω:

- | | |
|---|-------|
| • Οξικό νατριο (NaAO ₂ , 3M, pH 5,2) (Sigma) | 2μl |
| • EDTA (0,5M, pH 8,0) (Sigma) | 0,4μl |
| • Γλυκογόνο (20mg/ml) (QS kit, Beckman) | 1μl |
| • ddH ₂ O | 1,6μl |

Το μείγμα μεταφέρεται σε ειδική πλάκα 96 θέσεων, η οποία είναι συμβατή με τον Beckman Coulter CEQ8000 Sequencer , και ακολουθούν τα παρακάτω βήματα:

- Προσθήκη 60μl αιθανόλης 100%
- Φυγοκέντρηση στις 4000rpm, στους 4 °C, για 30min
- Αφαίρεση του υπερκείμενου
- Πρόσθεση 200μl αιθανόλης 70%
- Φυγοκέντρηση στις 4000rpm, στους 4 °C, για 7min
- Αφαίρεση του υπερκείμενου
- Πρόσθεση 200μl αιθανόλης 70%
- Φυγοκέντρηση στις 4000rpm, στους 4 °C, για 7min
- Σύντομη φυγοκέντρηση με την πλάκα ανάποδα στις 340rpm
- Τοποθέτηση της πλάκας σε συσκευή κενού για 15min
- Ανασύσταση του κατακρημνισμένου PCR προϊόντος με προσθήκη 40μl διαλύματος ανασύστασης (formamide) και 1 σταγόνας λάδι
- Τοποθέτηση της πλάκας στο μηχάνημα του sequencer όπου γίνεται η ανάγνωση της αλληλουχίας του τμήματος του DNA.

Η σύγκριση των αποτελεσμάτων του sequencing με τη γενωμική αλληλουχία του IRE του γονιδίου *FTL* έγινε με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος BioEdit, το οποίο διατίθεται δωρεάν στο διαδίκτυο (www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html)

3.2.7 Ανίχνευση μεταλλάξεων με τη μέθοδο πολυμορφισμού μήκους θραυσμάτων εκ περιορισμού (*Restriction Fragment Length Polymorphism-RFLP*)

3.2.7.1 Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος του πολυμορφισμού μήκους θραυσμάτων εκ περιορισμού (RFLP) βασίζεται στην αναγνώριση διαφορών μεταξύ ομόλογων αλληλουχιών DNA με τη χρήση ενδονουκλεασών περιορισμού. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες τέμνουν το DNA σε καθορισμένες νουκλεοτιδικές θέσεις. Δρουν τέμνοντας εγκάρσια ή σιγμοειδώς, με υδρόλυση των φωσφοδιεστερικών δεσμών DNA με κατεύθυνση 5' προς 3'.

Στη μέθοδο RFLP χρησιμοποιείται συγκεκριμένο ένζυμο περιορισμού που τέμνει το DNA προς μελέτη (προϊόν PCR) σε επιθυμητή θέση και οδηγεί στην παραγωγή θραυσμάτων διαφορετικού μήκους, τα οποία μπορούν να διαχωριστούν μεταξύ τους με τη χρήση ηλεκτροφόρησης σε γέλη αγαρόζης. Επειδή οι αλληλουχίες που στοχεύουν οι ενδονουκλεάσες περιορισμού είναι καθορισμένες, η κατάτμηση του προϊόντος PCR από μια συγκεκριμένη ενδονουκλεάση περιορισμού αποδίδει πάντα τον ίδιο αριθμό θραυσμάτων DNA.

Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες:

- Ένζυμα τύπου I: Αναγνωρίζουν μια ειδική αλληλουχία και τέμνουν τυχαία το DNA σε αρκετή απόσταση από τη θέση αναγνώρισης.
- Ένζυμα τύπου II: Αναγνωρίζουν μια ειδική αλληλουχία και τέμνουν το DNA μέσα σε αυτήν. Τα ένζυμα αυτά είναι ιδιαίτερα χρήσιμα για τη χαρτογράφηση και τη μελέτη του DNA, λόγω της ειδικότητας αναγνώρισης.
- Ένζυμα τύπου III: Τέμνουν το DNA σε σημείο που απέχει 24-26 νουκλεοτίδια μετά τη θέση αναγνώρισης.

3.2.7.2 Προτύπωση μεθόδου RFLP για την ανίχνευση της μετάλλαξης *FTL* C39G

Για την ανίχνευση της μετάλλαξης *FTL* C39G στην περιοχή του IRE στο ενισχυμένο τμήμα του γονιδίου, χρησιμοποιήθηκε η περιοριστική ενδονουκλεάση TspRI. Το ένζυμο αυτό αναγνωρίζει την νουκλεοτιδική αλληλουχία 5'...NNCASTGNN^v...3' και τέμνει το DNA δύο βάσεις μετά τη γουανίνη (G).

Υλικά-Αντιδραστήρια

Για την πέψη του IRE του *FTL* από την ενδονουκλεάση TspRI, χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω:

- Ένζυμο TspRI (New England BioLabs)
- Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer solution no. 4, New England BioLabs)
- Διάλυμα BSA (bovine serum albumin)
- Προϊόν από την PCR ενίσχυσης του IRE του γονιδίου *FTL*
- ddH₂O

Διαδικασία

Για την αντίδραση της πέψης αναμείχθηκαν σε τελικό όγκο 25μl τα παρακάτω:

- | | |
|------------------------|---------|
| • Buffer solution no.4 | 2.5μl |
| • TspRI | 1.0μl |
| • BSA | 0.25μl |
| • Προϊόν PCR | 10μl |
| • ddH ₂ O | 11.25μl |

Το τελικό μείγμα επωάζεται στους 65°C για 120min.

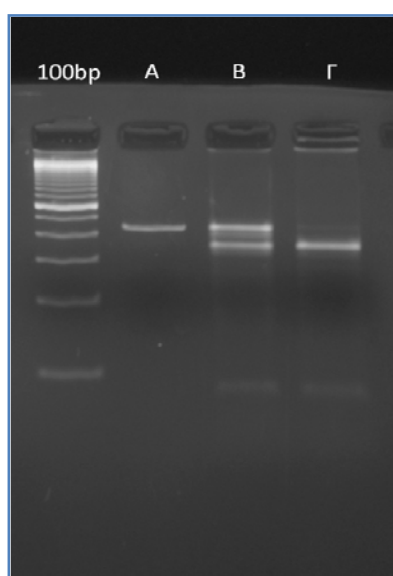
Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης – Ανάγνωση αποτελεσμάτων

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση του μείγματος προκειμένου να διαχωριστούν τα προϊόντα της πέψης. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε γέλη αгарόζης 4%.

Με την πέψη του ενισχυμένου τμήματος του IRE του *FTL* τα αναμενόμενα προϊόντα όπως αυτά προκύπτουν βάσει του προγράμματος BioEdit (www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html) φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 3.3 . Μήκη θραυσμάτων DNA μετά από πέψη του προϊόντος PCR με την TspR1

| Γονότυπος ως προς τη μετάλλαξη <i>FTL</i> C39G | Μήκη θραυσμάτων DNA (ζεύγη βάσεων-base pairs) |
|---|--|
| Μη μεταλλαγμένο DNA (Wild type) | 321, 86, 29 |
| Ομοζυγωτία (Homozygous mutant) | 407, 29 |
| Ετεροζυγωτία (Heterozygous mutant) | 407, 321, 86, 29 |
| Απουσία πέψης (Undigested product) | 436 |



Εικόνα 3.6: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης. **A.** Απουσία πέψης (προϊόν PCR). **B.** Ετεροζυγωτία για τη μετάλλαξη *FTL* C39G. **Γ.** Απουσία μετάλλαξης *FTL* C39G (wt/wt)

3.2.7.3 Προτύπωση μεθόδου RFLP για την ανίχνευση της μετάλλαξης *HJV* G320V

Για την ανίχνευση της μετάλλαξης *HJV* G320V στο ενισχυμένο τμήμα του εξωνίου 4 του γονιδίου *HJV*, χρησιμοποιήθηκε η περιοριστική ενδονουκλεάση *BanI*. Το ένζυμο αυτό αναγνωρίζει την νουκλεοτιδική αλληλουχία 5'...G^VGYRCC...3' και τέμνει το DNA αμέσως μετά την πρώτη γουανίνη (G) της αλληλουχίας.

Υλικά-Αντιδραστήρια

Για την πέψη του εξωνίου 4 του γονιδίου *HJV* από την ενδονουκλεάση *BanI*, χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω:

- Ένζυμο *BanI* (New England BioLabs)
- Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer solution no. 4, New England BioLabs)
- Διάλυμα BSA (bovine serum albumin)
- Προϊόν από την PCR ενισχυμένου τμήματος του εξωνίου 4 της *HJV*
- ddH₂O

Διαδικασία

Για την αντίδραση της πέψης αναμείχθηκαν σε τελικό όγκο 25μl τα παρακάτω:

- | | |
|------------------------|---------|
| • Buffer solution no.4 | 2.5μl |
| • <i>BanI</i> | 1.0μl |
| • BSA | 0.25μl |
| • Προϊόν PCR | 10μl |
| • ddH ₂ O | 11.25μl |

Το τελικό μείγμα επωάζεται στους 37°C για 180min. Ακολουθεί απενεργοποίηση στους 65 °C για 20min.

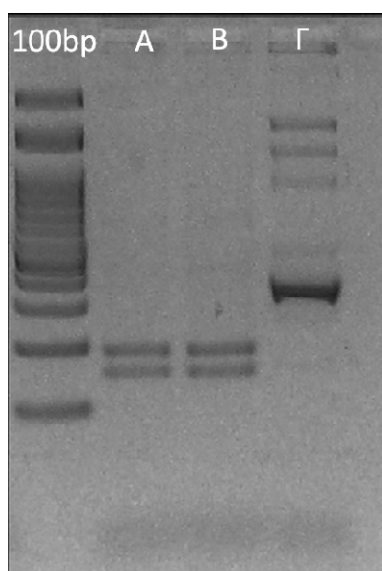
Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης – Ανάγνωση αποτελεσμάτων

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση του μείγματος προκειμένου να διαχωριστούν τα προϊόντα της πέψης. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε γέλη αγαρόζης 4%.

Με την πέψη του ενισχυμένου τμήματος του εξωνίου 4 του γονιδίου *HJV* τα αναμενόμενα προϊόντα όπως αυτά προκύπτουν βάσει του προγράμματος BioEdit (www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html) φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 3.4 . Μήκη θραυσμάτων DNA μετά από πέψη του προϊόντος PCR με την *BanI*

| Γονότυπος ως προς τη μετάλλαξη <i>HJV</i> G320V | Μήκη θραυσμάτων DNA (ζεύγη βάσεων-base pairs) |
|---|---|
| Μη μεταλλαγμένο DNA (Wild type) | 187, 146 |
| Ομοζυγωτία (Homozygous mutant) | 333 |
| Ετεροζυγωτία (Heterozygous mutant) | 333, 187, 146 |
| Απουσία πέψης (Undigested product) | 333 |



Εικόνα 3.7: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης. **A.** και **B.** Απουσία μετάλλαξης *HJV* G320V (wt/wt). **Γ.** Ομοζυγωτία για τη μετάλλαξη *HJV* G320V

3.2.8 Ανάστροφος υβριδισμός προϊόντων PCR για την ανίχνευση μεταλλάξεων στα γονίδια HFE, TfR2 και FPN1

Το δεύτερο στάδιο για την ανίχνευση των 18 μεταλλάξεων στα γονίδια *HFE*, *TfR2*, *FPN1* με την εμπορικά διαθέσιμη μέθοδο “Haemochromatosis StripAssay A” (ViennaLab, Vienna, Austria) βασίζεται στον ανάστροφο υβριδισμό των βιοτινυλιωμένων προϊόντων της multiplex PCR. Τα βιοτινυλιωμένα προϊόντα υβριδίζονται σε λωρίδες (test strips) που φέρουν σε παράλληλες γραμμές ακινητοποιημένους ολιγο-νουκλεοτιδικούς ανιχνευτές, φυσιολογικούς και ειδικούς για κάθε μία από τις μεταλλάξεις προς ανίχνευση. Τα βιοτινυλιωμένα προϊόντα PCR προσδένονται ειδικά στους ανιχνευτές και ανιχνεύονται με τη χρήση στρεπταβιδίνης, αλκαλικής φωσφατάσης και χρωμογόνου υποστρώματος.

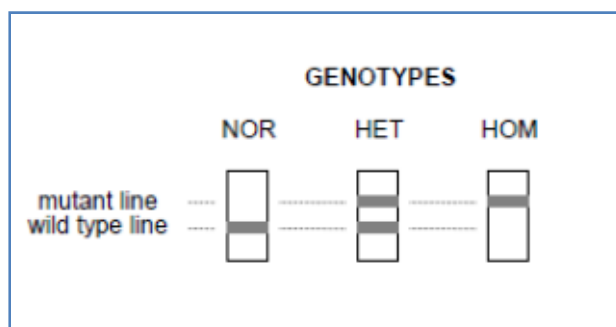
Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν συμπεριλαμβάνονται στην εμπορικά διαθέσιμη μέθοδο. Για κάθε διαφορετικό δείγμα χρησιμοποιείται μια λωρίδα υβριδισμού. Ακολουθούνται οι οδηγίες του κατασκευαστή και χρησιμοποιούνται οι όγκοι από τα διαλύματα που αναφέρονται στις οδηγίες της μεθόδου. Χρειάζονται 10μl προϊόντος PCR για το κάθε δείγμα.

Ο ανάστροφος υβριδισμός περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

1. Υβριδισμός προϊόντων PCR σε λωρίδες (45°C)
2. Έκλουση λωρίδων υβριδισμού (45°C)
3. Ανάπτυξη χρώματος στις λωρίδες υβριδισμού (θερμοκρασία δωματίου)

Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων γίνεται με τη βοήθεια προτυπωμένων διαγραμμάτων που περιλαμβάνονται στη μέθοδο (βλ. Εικόνα 3.8)

A.



B.



Εικόνα 3.8: Ανάγνωση αποτελεσμάτων στις λωρίδες υβριδισμού (test strips)

A. Σχηματική απεικόνιση της ερμηνείας των πιθανών αποτελεσμάτων.

B. Οι 18 μεταλλάξεις που ανιχνεύονται σε ένα test strip Heamochromatosis StripAssays.

Τα 3 test strips δεξιά αντιστοιχούν στα παρακάτω αποτελέσματα:

1. Φυσιολογικό wt/wt
2. Ετεροζυγωτία για τη μετάλλαξη E168Q του γονιδίου HFE wt//E168Q
3. Ομοζυγωτία για τη μετάλλαξη C282Y του γονιδίου HFE C282Y/C282Y

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Μελέτη ασθενών με εμμένουσα ασυμπτωματική υπερφερριτιναιμία

4.1.1 Κλινικά χαρακτηριστικά υπερφερριτιναιμικών ασθενών

Το διάστημα 06.2005 έως 12.2012 προσήλθαν ή παραπέμφθηκαν στο Ηπατολογικό Ιατρείο της Α' Παθολογικής Κλινικής του ΓΝΑ «Λαϊκό» 87 ασθενείς με αδιάγνωστη εμμένουσα υπερφερριτιναιμία. Από αυτούς 53 ήταν άντρες και 34 γυναίκες, ηλικίας από 6 έως 79 ετών. Από την καταγραφή και αξιολόγηση των κλινικών και εργαστηριακών ευρημάτων προέκυψε ότι η μέση τιμή της φερριτίνης για το σύνολο των ασθενών ήταν 826 μg/L (εύρος τιμών: 71-2939 μg/L, με ανώτερο φυσιολογικό όριο έως 300 μg/L). Ο δείκτης μάζας σώματος (ΔΜΣ- Body Mass Index, BMI) ήταν μεγαλύτερος του 25 kg/m² σε 44 ασθενείς, ποσοστό 50% του συνόλου. Σημειώνεται πολύ μεγαλύτερο ποσοστό παθολογικού ΔΜΣ στους άντρες (75%) απ' ότι στις γυναίκες (12%). Η χοληστερίνη ήταν αυξημένη στο 48% των ασθενών, ενώ τα τριγλυκερίδια στο 40%, με πολύ μεγαλύτερο ποσοστό υπερτριγλυκεριδαιμίας στους άντρες σε σχέση με τις γυναίκες (49% έναντι 26%). Οι τρανσαμινάσες ήταν φυσιολογικές σε 66 ασθενείς (ποσοστό 76%). Ο κορεσμός τρανσφερρίνης ήταν παθολογικός μόνο σε 12 ασθενείς (>50%). Ο Πίνακας 4.1 συνοψίζει τα βασικά κλινικά χαρακτηριστικά, καθώς και τα διαγνωστικά αίτια που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη.

4.1.2 Διαγνωστικά αίτια υπερφερριτιναιμίας

Το μεταβολικό σύνδρομο, η παρουσία φλεγμονής ή νεοπλασίας και η δυσερυθροποιητικές αναιμίες ήταν οι πιο συχνές διαγνώσεις μεταξύ των

υπερφερριτιναιμικών ασθενών, με ποσοστά 33,3%, 23% και 13,9% αντίστοιχα. Στο 3,4% των ασθενών διαγνώστηκε μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο (ΜΔΣ), ενώ 8,1% εμφάνισε υπερφερριτιναιμία λόγω εξωγενούς λήψεως σιδήρου στο παρελθόν. Το ποσοστό αυτό αφορούσε αποκλειστικά γυναίκες νεαρής σχετικά ηλικίας. Μόνο 3 ασθενείς (3,4%) διαγνώστηκαν με κληρονομική αιμοχρωμάτωση βάσει του μοριακού ελέγχου. Το κληρονομικό σύνδρομο υπερφερριτιναιμίας καταρράκτη (ΗΗCS) αναγνωρίστηκε σε 10 περιπτώσεις (11,5%). Σε ποσοστό 3,4% των ασθενών δεν αναγνωρίστηκε κάποιο αίτιο για την εμμένουσα υπερφερριτιναιμία σύμφωνα με τα κλινικά στοιχεία και τον εργαστηριακό και μοριακό έλεγχο.

Πίνακας 4.1 . Κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών με υπερφερριτιναιμία – Διαγνωστικά αίτια

| | ΑΝΤΡΕΣ | Παθολογικές τιμές (αριθμός περιστατικών) | ΓΥΝΑΙΚΕΣ | Παθολογικές τιμές (αριθμός περιστατικών) | ΣΥΝΟΛΟ | Παθολογικές τιμές (αριθμός περιστατικών) |
|--|----------------------|---|---------------------|---|---------------------|---|
| Αριθμός περιστατικών | 53 | | 34 | | 87 | |
| Ηλικία (έτη) | (6-79) | | (10-73) | | (6-79) | |
| Φερριτίνη (μg/L) | 860 (81-2939) | 52 (98%) | 770 (71-2664) | 33 (97%) | 826 (71-2939) | 85 (98%) |
| BMI (kg/m ²) | 28,3 (23,3-34,61) | 40 (75%) | 25,2 (20,1-34,2) | 4 (12%) | 27,6 (20,2-34,6) | 44 (50%) |
| Χοληστερίνη (mg/dL) | 210 (121-309) | 25 (47%) | 226 (129-436) | 17 (50%) | 215 (121-436) | 42 (48%) |
| Τριγλυκερίδια (mg/dL) | 173 (40-551) | 26 (49%) | 136 (57-389) | 9 (26%) | 160 (40-551) | 35 (40%) |
| ALT (IU/L) | 34 (15-72) | 15 (28%) | 24 (11-59) | 6 (18%) | 31 (11-72) | 21 (24%) |
| ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ (αριθμός περιστατικών) | 17 | 5 | 15 | 8 | 32 (37%) | 13/32 (41%) 13/87 (15%) |
| ΔΙΑΓΝΩΣΗ (αριθμός περιστατικών) | | | | | | |
| Δυσμεταβολικό σύνδρομο | 27 (50,9%) | | 2 (6%) | | 29 (33,3%) | |
| Φλεγμονή - Νεοπλασία | 11 (20,8%) | | 9 (26,5%) | | 20 (23%) | |
| Ετερόζυγος / Ομόζυγος βΜΑ | 6 (11,2%) | | 6 (17,6%) | | 12 (13,9%) | |
| ΜΔΣ | 1 (1,9%) | | 2 (6%) | | 3 (3,4%) | |
| Λήψη σιδήρου | - | | 7 (20,5%) | | 7 (8,1%) | |
| Αιμοχρωμάτωση | 2 (3,8%) | | 1 (2,9%) | | 3 (3,4%) | |
| ΗΗCS | 3 (5,7%) | | 7 (20,5%) | | 10 (11,5%) | |
| Χωρίς τελική διάγνωση | 3 (5,7%) | | - | | 3 (3,4%) | |

4.1.3 Μοριακός έλεγχος στη διαγνωστική προσέγγιση της υπερφερριτιναιμίας

Στο 37% των υπερφερριτιναιμικών ασθενών διενεργήθηκε μοριακός έλεγχος. Στο 41% των ατόμων που ελέγχθηκαν αναδείχτηκαν μεταλλάξεις συμβατές με την κληρονομική αιμοχρωμάτωση ή με το κληρονομικό σύνδρομο υπερφερριτιναιμίας καταρράκτη. Το ποσοστό των ασθενών με θετικό μοριακό έλεγχο ήταν 15% για το σύνολο των 87 ασθενών με υπερφερριτιναιμία.

Από τους 3 ασθενείς που διαγνώστηκαν με κληρονομική αιμοχρωμάτωση, οι 2 ήταν ομόζυγοι για τη μετάλλαξη C282Y στο γονίδιο *HFE*. Στον τρίτο αναδείχτηκε ομοζυγωτία για τη μετάλλαξη G320V στο γονίδιο *HJV*, συμβατή με νεανική αιμοχρωμάτωση.

Δεκαέξι (16) ασθενείς που εμφάνιζαν υπερφερριτιναιμία και καταρράκτη υποβλήθηκαν σε μοριακό έλεγχο για την ανάδειξη μεταλλάξεων στο IRE του γονιδίου *FTL*. Σε 10 ασθενείς ο έλεγχος ήταν θετικός. Οι 8 ήταν ετερόζυγοι για τη σημειακή μετάλλαξη C39G και οι 2 ετερόζυγοι για την A40G. Και οι δύο μεταλλάξεις βρίσκονται στον εξανουκλεοτιδικό βρόγχο του IRE.

4.2. Ασθενείς με υπερφερριτιναιμία και καταρράκτη

Οι 16 περιπτώσεις που εμφάνιζαν υπερφερριτιναιμία σε συνδυασμό με καταρράκτη σε νεαρή ηλικία μελετήθηκαν για την παρουσία του ΗΗCS. Έγινε αναλυτική καταγραφή του φαινοτύπου, του οικογενειακού ιστορικού (όπου ήταν δυνατό) και διενεργήθηκε μοριακός έλεγχος στο IRE του γονιδίου *FTL*.

4.2.1. Ασθενείς με υπερφερριτιναιμία, καταρράκτη και θετικό οικογενειακό ιστορικό

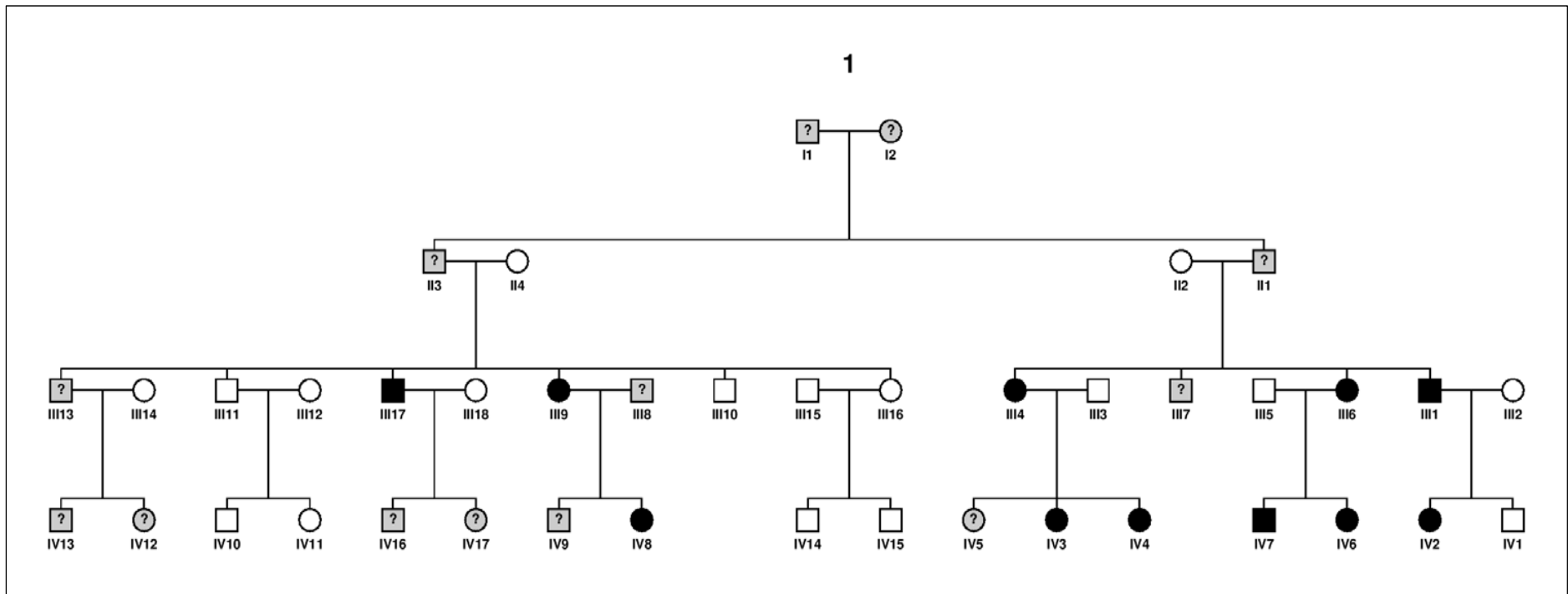
4.2.1.1 Οικογένεια 1

Η πρώτη οικογένεια που μελετήθηκε αποτελείται από 41 μέλη και η καταγωγή της είναι από τη Δυτική Ελλάδα. Το άτομο δείκτης ήταν ένα κορίτσι 10 χρονών που παραπέμφθηκε λόγω εμμένουσας υπερφερριτιναιμίας. Η αυξημένη φερριτίνη (950-1533μg/L) είχε διαπιστωθεί από έτους στο πλαίσιο διερεύνησης ενός επεισοδίου ζάλης. Η ασθενής ήταν ασυμπτωματική, χωρίς εικόνα οξείας ή χρόνιας λοίμωξης, ενώ από την κλινική εξέταση δεν προέκυψαν παθολογικά ευρήματα. Η οφθαλμολογική εξέταση ανέδειξε αμφοτερόπλευρο καταρράκτη δίκην ηλιοτροπίου (sunflower cataract) (Εικόνα 4.3). Ο εργαστηριακός και ο απεικονιστικός έλεγχος δεν ανέδειξαν κάτι παθολογικό, εκτός από ήπια έμμεση υπερχολερυθριναιμία, η οποία αποδόθηκε στην παρουσία γνωστής μετάλλαξης που σχετίζεται με το σύνδρομο Gilbert. Από το ατομικό αναμνηστικό αναφέρθηκε έλλειψη του ενζύμου G6PD. Το οικογενειακό ιστορικό του ατόμου δείκτη ήταν θετικό για την παρουσία καταρράκτη από νεαρές σχετικά ηλικίες. Συγκεκριμένα, ο πατέρας είχε χειρουργηθεί για καταρράκτη στο δεξί οφθαλμό σε ηλικία 36 ετών, ενώ η θεία της ασθενούς είχε διαγνωσθεί με καταρράκτη σε ηλικία 24 ετών. Το οικογενειακό ιστορικό ήταν επίσης θετικό για την παρουσία υπερφερριτιναιμίας.

Πίνακας 4.2 . Κλινικά χαρακτηριστικά οικογένειας 1

| Μέλος Οικογένειας | Φύλο | Ηλικία διάγνωσης | Φερριτίνη (μg/L) | Fe (μg/dL) | TIBC (μg/dL) | sat TfF (%) | Παρουσία καταρράκτη (Ηλικία διάγνωσης) | Επέμβαση για καταρράκτη (Ηλικία) | Μετάλλαξη στο IRE του <i>FTL</i> | Διάγνωση |
|-------------------|------|------------------|------------------|------------|--------------|-------------|--|----------------------------------|----------------------------------|-----------------|
| III-1 | A | 40 | 920 | 178 | 242 | 74 | N (36) | N (36) | C39G | HHCS |
| III-4 | Θ | 49 | 1650 | 175 | 447 | 39 | N (49) | 0 | C39G | HHCS |
| III-6 | Θ | 24 | 667 | 45 | 453 | 9 | N (24) | 0 | C39G | HHCS |
| III-9 | Θ | 46 | 2070 | - | - | - | N (23) | 0 | - | HHCS |
| III-17 | A | 34 | >1000 | - | - | - | N (34) | 0 | - | HHCS |
| IV-2 | Θ | 9 | 1130 | 104 | 334 | 31 | N (10) | 0 | C39G | HHCS |
| IV-3 | Θ | 18 | 770 | 196 | 346 | 57 | N (18) | 0 | C39G | HHCS |
| IV-4 | Θ | 14 | 1000 | 154 | 361 | 43 | N (14) | 0 | - | HHCS |
| IV-6 | Θ | 5 | 900 | 69 | 335 | 21 | N (5) | 0 | C39G | HHCS |
| IV-7 | A | 19 | 1500 | 154 | 341 | 45 | N (19) | 0 | - | HHCS |
| IV-8 | Θ | 19 | 1200 | - | - | - | N (19) | 0 | - | HHCS |
| IV-16 | A | 7 | >1000 | - | - | - | 0 | - | - | Υπερφερριταιμία |
| IV-17 | Θ | 5 | >1000 | - | - | - | 0 | - | - | Υπερφερριταιμία |

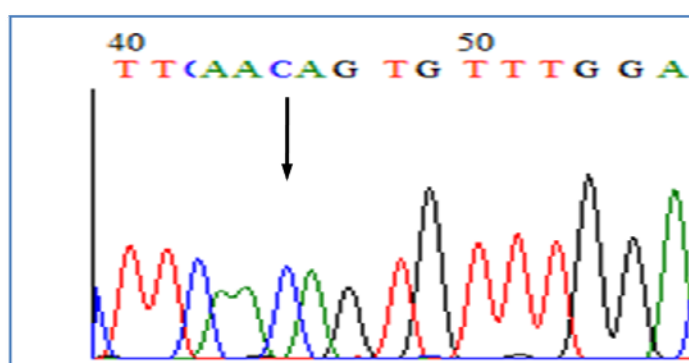
Όπως προκύπτει από την αναλυτική καταγραφή του γενεαλογικού δέντρου και τη συγκέντρωση κλινικών στοιχείων από τα άτομα της οικογένειας (Βλ.Εικόνα 4.1 και Πίνακας 4.2), την περίοδο της διερεύνησης 13 άτομα είχαν υπερφερριταιμία, ενώ 11 από αυτά είχαν διαγνωσθεί με καταρράκτη. Σε 5 μέλη, συμπεριλαμβανομένου και του ατόμου δείκτη, αναγνωρίστηκε αμφοτερόπλευρος καταρράκτης δίκην ηλιοτροπίου στην εξέταση με σχισμοειδή λυχνία. Η διάμεση τιμή της φερριτίνης ήταν 1000 μg/L (εύρος: 667-2070 μg/L). Ο σίδηρος ορού και ο κορεσμός τρανσφερρίνης ήταν εντός φυσιολογικών ορίων σε όσα μέλη ελέχθησαν, εκτός από 3 περιπτώσεις. Στη μια περίπτωση, το άτομο υπό διερεύνηση είχε υψηλό σίδηρο ορού και αυξημένο κορεσμό τρανσφερρίνης (74%) και βρέθηκε ετερόζυγος για τη μετάλλαξη H63D στο γονίδιο *HFE*, γονότυπος που δεν προκαλεί κληρονομική αιμοχρωμάτωση. Στη δεύτερη περίπτωση, η ασθενής είχε σιδηροπενική αναιμία και χαμηλό κορεσμό τρανσφερρίνης, με αυξημένη όμως φερριτίνη, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω.



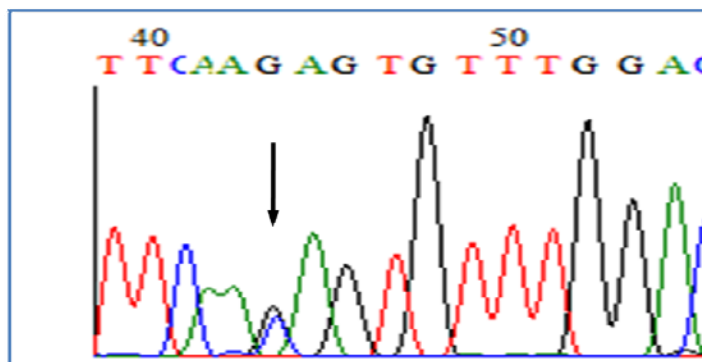
Εικόνα 4.1. Γενεαλογικό δέντρο Οικογένειας 1 – άτομο δείκτης IV-2 (κύκλος: θηλυκό, τετράγωνο: αρσενικό, μαύρος κύκλος/τετράγωνο: προσβεβλημένο μέλος, ?: άγνωστη κατάσταση)

Στα 11 μέλη της οικογένειας που εμφάνιζαν υπερφερριτιναιμία και καταρράκτη, και σε συνδυασμό με το θετικό οικογενειακό ιστορικό, τέθηκε η διάγνωση του HHCS. Ακολούθησε μοριακός έλεγχος σε 6 (III-1, III-4, III-6, IV-2, IV-3, IV-6) από τα 11 μέλη. Η ανάγνωση της πρωτοταγούς ακολουθίας του DNA (sequencing) ανέδειξε τη μετάλλαξη C39G στο IRE του γονιδίου *FTL* (Βλ. Εικόνα 4.2). Και τα 6 άτομα που μελετήθηκαν ήταν ετερόζυγα για τη συγκεκριμένη μετάλλαξη.

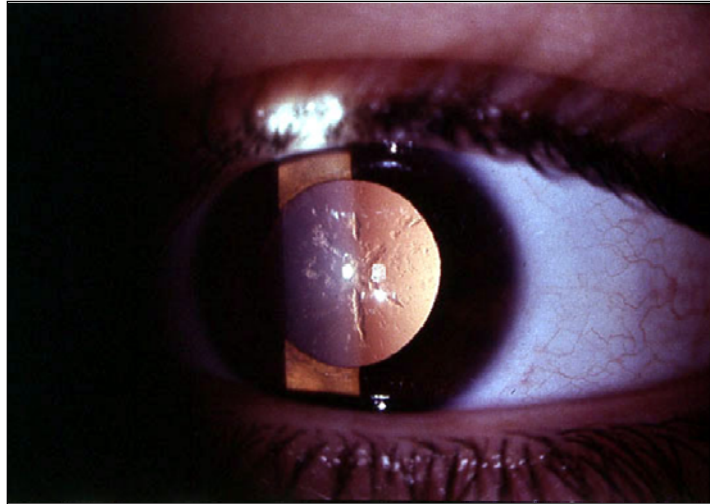
A.



B.



Εικόνα 4.2. Ανάγνωση της πρωτοταγούς ακολουθίας του DNA της περιοχής του IRE του γονιδίου *FTL*. **A.** Μάρτυρας wt / wt. **B.** Ετεροζυγωτία για τη μετάλλαξη *FTL* C39G: C39G / wt (το βέλος δείχνει τη θέση 39 στο IRE)



Εικόνα 4.3. Καταρράκτης σε ασθενή με HHCS (άτομο δείκτης IV-2 οικογενείας 1). Εξέταση με σχισμοειδή λυχνία μετά από μυδρίαση της κόρης. Διακρίνεται ο καταρράκτης ο οποίος αναπτύσσεται με το χαρακτηριστικό σχήμα δίκην ηλιοτροπίου (“sunflower cataract”).

4.2.1.2 Οικογένεια 2

Η δεύτερη οικογένεια που μελετήθηκε έχει επίσης καταγωγή από τη Δυτική Ελλάδα και αποτελείται από 19 μέλη. Το άτομο δείκτης (II-6) ήταν ένας άντρας 50 ετών, ο οποίος είχε γνωστή εμμένουσα ασυμπτωματική υπερφερριτιναιμία για τουλάχιστον 3 έτη, με τιμές φερριτίνης πάνω από 1000 μg/L. Ο εργαστηριακός του έλεγχος ανέδειξε φερριτίνη 1060 μg/L, κορεσμό τρανφερρίνης 40% και σίδηρο ορού 128 μg/dL. Το αιματολογικό προφίλ και η ηπατική λειτουργία ήταν εντός φυσιολογικών ορίων, ενώ στον υπέρηχο ήπατος σημειώνεται λιπώδης διήθηση. Από το ατομικό αναμνηστικό αναφέρθηκε υπερλιπιδαιμία και εγχείρηση για αμφοτερόπλευρο καταρράκτη σε ηλικία 48 (αριστερός οφθαλμός) και 49 (δεξιός οφθαλμός) ετών αντίστοιχα. Το οικογενειακό ιστορικό του ασθενή ήταν θετικό για την παρουσία καταρράκτη και υπερφερριτιναιμίας.

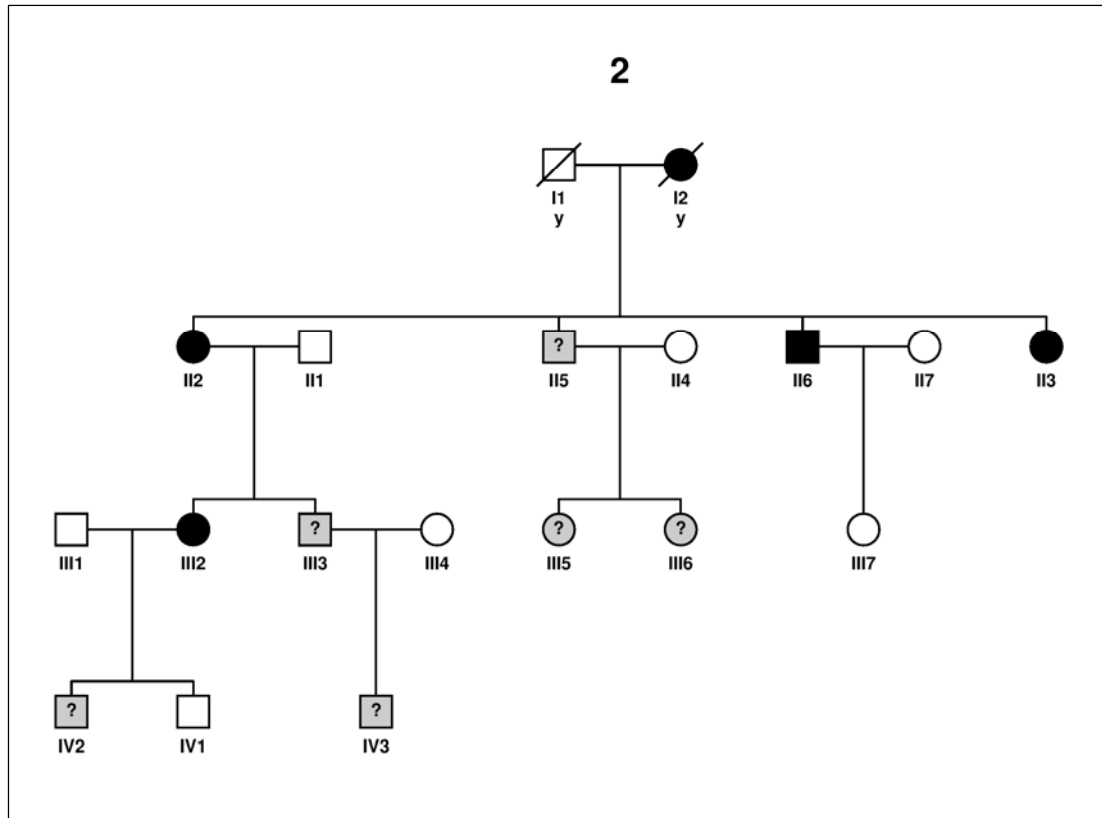
Πίνακας 4.3 . Κλινικά χαρακτηριστικά οικογένειας 2

| Μέλος Οικογένειας | Φύλο | Ηλικία διάγνωσης | Φερριτίνη (μg/L) | Fe (μg/dL) | TIBC (μg/dL) | sat TrF (%) | Παρουσία καταρράκτη (Ηλικία διάγνωσης) | Επέμβαση για καταρράκτη (Ηλικία) | Μετάλλαξη στο IRE του <i>FTL</i> | Διάγνωση |
|-------------------|------|------------------|------------------|------------|--------------|-------------|--|----------------------------------|----------------------------------|-----------------|
| I-2 | Θ | 75 | 1388 | - | - | - | N (60) | N (84) | - | ΗΗCS |
| II-2 | Θ | 56 | 770 | - | - | - | N (54) | 0 | - | ΗΗCS |
| II-3 | Θ | 60 | 1000 | - | - | - | N (55) | N (60) | - | ΗΗCS |
| II-5 | A | - | αυξημένη | - | - | - | - | - | - | Υπερφερριταιμία |
| II-6 | A | 47 | 1060 | 128 | 320 | 40 | N (48) | N (50) | C39G | ΗΗCS |
| III-2 | Θ | 35 | 918 | - | - | - | N (12) | 0 | - | ΗΗCS |
| III-3 | A | 33 | 800 | - | - | - | - | - | - | Υπερφερριταιμία |
| IV-2 | A | 3 | 820 | - | - | - | 0 | - | - | Υπερφερριταιμία |
| IV-3 | A | 6 | 775 | - | - | - | - | - | - | Υπερφερριταιμία |

Όπως προκύπτει από την καταγραφή του οικογενειακού δέντρου και τη συγκέντρωση στοιχείων από τα μέλη της οικογένειας (Βλ. Εικόνα 4.4 και Πίνακας 4.3), την περίοδο της διερεύνησης 9 άτομα είχαν γνωστή υπερφερριταιμία, ενώ σε 5 από αυτά είχε διαγνωσθεί καταρράκτης. Τρία άτομα είχαν ήδη υποβληθεί σε αμφοτερόπλευρη αποκατάσταση φακού, ενώ ένα μέλος είχε ήδη εγκατεστημένο αμφοτερόπλευρο καταρράκτη σε ηλικία 12 ετών. Η διάμεση τιμή της φερριτίνης ήταν 869 μg/L (εύρος 770-1388 μg/L).

Σύμφωνα με την κλινική εικόνα και βάσει του θετικού ατομικού και οικογενειακού ιστορικού, σε 5 (I-2, II-2, II-3, II-6, III-2) από τα 19 μέλη της οικογένειας τέθηκε η διάγνωση του ΗΗCS. Σε 3 μέλη με γνωστή υπερφερριταιμία δεν ήταν γνωστή η ύπαρξη ή μη καταρράκτη. Σε ένα αγόρι ηλικίας 3 ετών διαπιστώθηκε μόνο υπερφερριταιμία.

Πραγματοποιήθηκε ανάγνωση της πρωτοταγούς ακολουθίας στο άτομο δείκτης και ανέδειξε την παρουσία της μετάλλαξης C39G στο IRE του γονιδίου *FTL* σε ετεροζυγωτία.



Εικόνα 4.4. Γενεαλογικό δέντρο Οικογένειας 2 – Άτομο δείκτης II-6 (κύκλος: θηλυκό, τετράγωνο: αρσενικό, μαύρος κύκλος/τετράγωνο: προσβεβλημένο μέλος, ?: άγνωστη κατάσταση, / : θάνατος)

4.2.1.3 Οικογένεια 3

Η τρίτη οικογένεια που μελετήθηκε κατάγεται επίσης από τη Δυτική Ελλάδα και αποτελείται από 38 μέλη. Το άτομο δείκτης (II-8) ήταν μια γυναίκα 59 ετών, η οποία παραπέμφθηκε λόγω εμμένουσας ασυμπτωματικής υπερφερριτιναιμίας από τετραετίας. Η φερριτίνη κατά την παραπομπή της ήταν 975 μg/L, ενώ ο κορεσμός τρανσφερρίνης και ο σίδηρος ορού ήταν εντός φυσιολογικών ορίων (βλ. Πίνακας 4.4) . Από τον αιματολογικό και βιοχημικό έλεγχο δεν προέκυψαν παθολογικά ευρήματα, εκτός από υπερλιπιδαιμία, για την οποία η ασθενής λάμβανε αγωγή. Από το ατομικό αναμνηστικό της αναφέρεται ρευματοειδής αρθρίτιδα και ανεγχείρητος αμφοτερόπλευρος καταρράκτης από ηλικία 30 ετών. Από το οικογενειακό ιστορικό της ασθενούς προέκυψε παρουσία υπερφερριτιναιμίας και καταρράκτη.

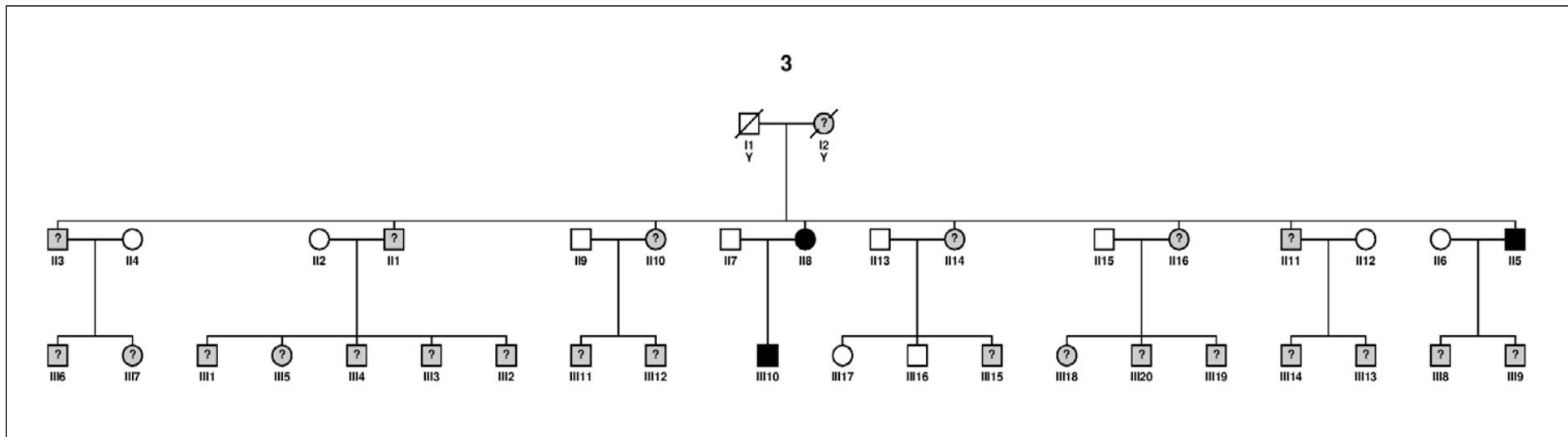
Πίνακας 4.4. Κλινικά χαρακτηριστικά οικογένειας 3

| Μέλος Οικογένειας | Φύλο | Ηλικία διάγνωσης | Φερριτίνη (μg/L) | Fe (μg/dL) | TIBC (μg/dL) | sat TfR (%) | Παρουσία καταρράκτη (Ηλικία διάγνωσης) | Επέμβαση για καταρράκτη (Ηλικία) | Μετάλλαξη στο IRE του FTL | Διάγνωση |
|-------------------|------|------------------|------------------|------------|--------------|-------------|--|----------------------------------|---------------------------|-----------------|
| I-2 | Θ | - | - | - | - | - | N | - | - | Καταρράκτης |
| II-3 | A | - | - | - | - | - | N | - | - | Καταρράκτης |
| II-5 | A | 50 | 950 | - | - | - | N (54) | N (54) | - | ΗΗCS |
| II-8 | Θ | 55 | 975 | 73 | 250 | 29 | N (30) | 0 | C39G | ΗΗCS |
| II-14 | Θ | - | αυξημένη | - | - | - | - | - | - | Υπερφερριταιμία |
| II-16 | Θ | - | - | - | - | - | N | - | - | Καταρράκτης |
| III-10 | A | 37 | 1870 | 122 | 330 | 37 | N (37) | 0 | C39G | ΗΗCS |
| III-15 | A | - | αυξημένη | - | - | - | - | - | - | Υπερφερριταιμία |

Σύμφωνα με την καταγραφή του οικογενειακού ιστορικού και του γενεαλογικού δέντρου (Βλ. Εικόνα 4.5, Πίνακα 4.4), κατά την περίοδο της διερεύνησης 5 μέλη της οικογένειας είχαν υπερφερριταιμία, ενώ 3 από αυτά είχαν γνωστό καταρράκτη από ηλικία 30, 37 και 54 ετών αντίστοιχα. Σε 3 μέλη (I-2, II-3, II-16) αναφέρεται καταρράκτης, χωρίς όμως να είναι γνωστό αν υπήρχε συνοδός υπερφερριταιμία. Η διάμεση τιμή της φερριτίνης για τα μέλη για τα οποία υπήρχαν στοιχεία ήταν 975 μg/L (εύρος: 950-1870 μg/L).

Βάσει του ατομικού και οικογενειακού ιστορικού και των γνωστών κλινικών στοιχείων, τέθηκε η διάγνωση του ΗΗCS σε 3 μέλη της οικογένειας (II-5, II-8, III-10). Στα υπόλοιπα μέλη δεν υπήρχαν επαρκή κλινικά στοιχεία.

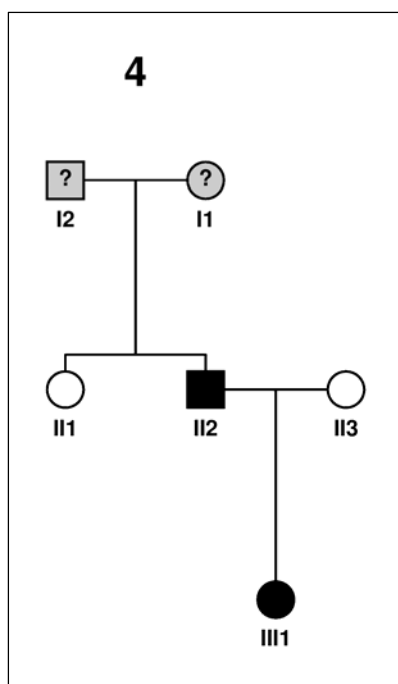
Ο μοριακός έλεγχος διενεργήθηκε σε 2 μέλη (II-8, II-10) και ανέδειξε τη μετάλλαξη C39G σε ετεροζυγωτία, με τη μέθοδο του DNA sequencing.



Εικόνα 4.5. Γενεαλογικό δέντρο Οικογένειας 3 – Άτομο δείκτης II-8 (κύκλος: θηλυκό, τετράγωνο: αρσενικό, μαύρος κύκλος/τετράγωνο: προσβεβλημένο μέλος, ?: άγνωστη κατάσταση, / : θάνατος)

4.2.1.4 Οικογένεια 4

Για την τέταρτη οικογένεια που μελετήθηκε δεν υπάρχουν εκτενή στοιχεία. Το άτομο δείκτης ήταν ένας άνδρας 30 ετών (II-2), ο οποίος είχε γνωστή, εμμένουσα υπερφερριτιναιμία από ηλικία 27 ετών. Οι τιμές της φερριτίνης ήταν πάνω από 1000 µg/L, ενώ ο σίδηρος ορού και ο κορεσμός τρανσφερρίνης ήταν φυσιολογικοί. Από τον λοιπό κλινικοεργαστηριακό έλεγχο δεν αναδείχθηκαν παθολογικά ευρήματα, εκτός από ήπια υπερχοληστεριναιμία και θάμβος οράσεως αριστερού οφθαλμού, χωρίς όμως εγκατεστημένο καταρράκτη σύμφωνα με πρόσφατη οφθαλμολογική εξέταση. Από το ατομικό αναμνηστικό αναφέρεται συστροφή όρχεως σε ηλικία 12 ετών και αμυγδαλεκτομή σε ηλικία 9 ετών. Από το οικογενειακό ιστορικό του ασθενή δεν υπήρχαν πληροφορίες σχετικά με την παρουσία υπερφερριτιναιμίας ή καταρράκτη σε άλλα μέλη της οικογένειας (Βλ. Εικόνα 4.6 και Πίνακα 4.5).



Εικόνα 4.6. Γενεαλογικό δέντρο Οικογένειας 4 – Άτομο δείκτης II-2 (κύκλος: θηλυκό, τετράγωνο: αρσενικό, μαύρος κύκλος/τετράγωνο: προσβεβλημένο μέλος, ?: άγνωστη κατάσταση)

Στο πλαίσιο διερεύνησης της υπερφερριτιναιμίας πραγματοποιήθηκε μοριακός έλεγχος για αιμοχρωμάτωση, ο οποίος ανέδειξε ετεροζυγωτία για τη

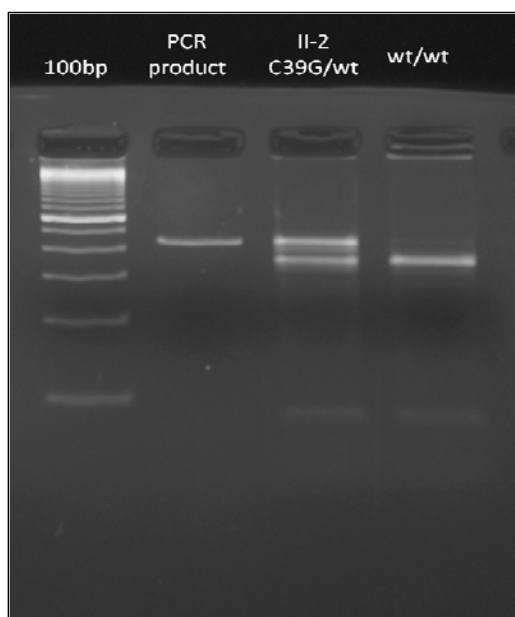
μετάλλαξη H63D στο γονίδιο *HFE*. Ο γονότυπος αυτός δεν προκαλεί κλινική εικόνα αιμοχρωμάτωσης. Ακολούθησε μοριακός έλεγχος στο γονίδιο *FTL* με τη μέθοδο του DNA sequencing. Προέκυψε ετεροζυγωτία για τη μετάλλαξη C39G.

Πίνακας 4.5 . Κλινικά χαρακτηριστικά οικογένειας 4

| Μέλος Οικογένειας | Φύλο | Ηλικία διάγνωσης | Φερριτίνη (μg/L) | Fe (μg/dL) | TIBC (μg/dL) | sat TrF (%) | Παρουσία καταράκτη (Ηλικία διάγνωσης) | Επέμβαση για καταράκτη (Ηλικία) | Μετάλλαξη στο IRE του <i>FTL</i> | Διάγνωση |
|-------------------|------|------------------|------------------|------------|--------------|-------------|---------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------|
| II-2 | A | 27 | 1300 | 83 | 344 | 24 | N | - | C39G | HHCS |
| II-3 | θ | 29 | 67 | - | - | - | 0 | - | wt | - |
| III-1 | θ | 4 | 1600 | 56 | 293 | 19 | 0 | - | C39G | HHCS |

Παράλληλα πραγματοποιήθηκε κλινικοεργαστηριακός και μοριακός έλεγχος στην ασυμπτωματική κόρη του ασθενή (III-1), ηλικίας 4 ετών (Πίνακας 4.5). Η φερριτίνη της ήταν 1600 μg/L, από την οφθαλμολογική εξέταση δεν προέκυψαν παθολογικά ευρήματα, ενώ ο μοριακός έλεγχος ανέδειξε ετεροζυγωτία για την ίδια μετάλλαξη (C39G) στο γονίδιο *FTL*. Η μητέρα του τετράχρονου κοριτσιού είχε φερριτίνη εντός φυσιολογικών ορίων.

Τα αποτελέσματα της μεθόδου του DNA sequencing αναπαράχτηκαν και με τη μέθοδο RFLP με τη χρήση του ενζύμου *TspRI*. Και για τους δύο ασθενείς η πέψη με την περιοριστική ενδονουκλέαση απέδωσε προϊόντα μήκους 407, 321, 86 και 29 ζευγών νουκλεοτιδικών βάσεων, αποτέλεσμα συμβατό με το γονότυπο C39G / wt.(Εικόνα 4.7).



Εικόνα 4.7. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης με την περιοριστική ενδονουκλεάση TspRI. Το προϊόν της PCR διακρίνεται στις 436 βάσεις.

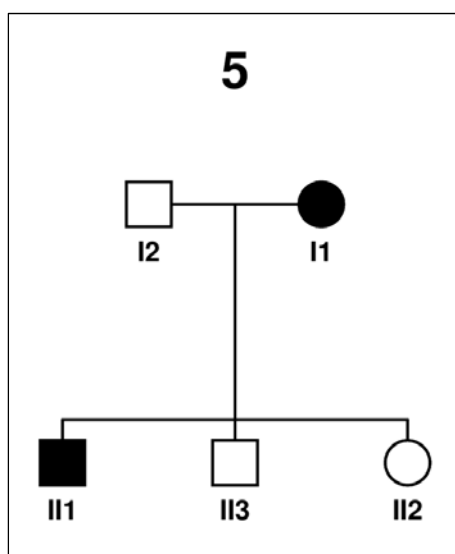
4.2.1.5 Οικογένεια 5

Η πέμπτη οικογένεια που μελετήθηκε έχει καταγωγή από τη Δράμα και αποτελείται από 5 μέλη. Το άτομο δείκτης (I-1) επισκέφτηκε αιματολόγο λόγω εμμένουσας ασυμπτωματικής υπερφερριτιναιμίας, η οποία διαπιστώθηκε σε ηλικία 49 ετών σε τυχαίο εργαστηριακό έλεγχο. Η φερριτίνη της ασθενούς ήταν 1338 $\mu\text{g/L}$, με φυσιολογικό σίδηρο ορού. Από τον υπόλοιπο κλινικοεργαστηριακό έλεγχο διαπιστώθηκε αρχόμενος καταρράκτης και στους δύο οφθαλμούς, ενώ το ατομικό της αναμνηστικό είναι ελεύθερο.

Πίνακας 4.6 . Κλινικά χαρακτηριστικά οικογένειας 5

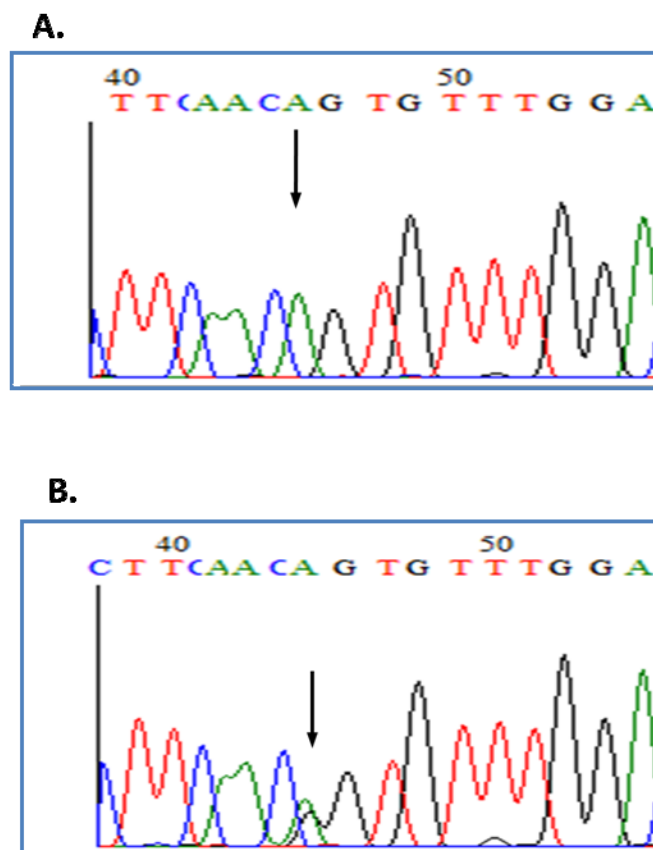
| Μέλος Οικογένειας | Φύλο | Ηλικία διάγνωσης | Φερριτίνη ($\mu\text{g/L}$) | Fe ($\mu\text{g/dL}$) | TIBC ($\mu\text{g/dL}$) | sat Trf (%) | Παρουσία καταρράκτη (Ηλικία διάγνωσης) | Επέμβαση για καταρράκτη (Ηλικία) | Μετάλλαξη στο IRE του <i>FTL</i> | Διάγνωση |
|-------------------|------|------------------|-------------------------------|-------------------------|---------------------------|-------------|--|----------------------------------|----------------------------------|----------|
| I-1 | Θ | 49 | 1338 | 90 | 311 | 29 | N (49) | 0 | A40G | HHCS |
| II-1 | A | 28 | 1200 | 68 | 332 | 20 | N | N (26) | A40G | HHCS |
| II-2 | Θ | 26 | 25 | 92 | - | - | 0 | - | wt | - |
| II-3 | A | 20 | 47 | 54 | - | - | 0 | - | wt | - |

Μετά τη διαπίστωση της υπερφερριτιναιμίας της μητέρας (ατόμου δείκτης), προσήλθαν προς διερεύνηση και τα τρία παιδιά της. Ο ένας γιος (II-1), ηλικίας 28 ετών, είχε φερριτίνη 1200 µg/L, με φυσιολογικό σίδηρο ορού και χωρίς άλλα παθολογικά ευρήματα από το λοιπό κλινικοεργαστηριακό έλεγχο. Από το ατομικό του αναμνηστικό αναφέρεται αμφοτερόπλευρη εγχείρηση για καταρράκτη προ διетίας. Τα άλλα δύο αδέρφια, όπως και ο πατέρας, είχαν φυσιολογικές τιμές φερριτίνης (Βλ. Εικόνα 4.8, Πίνακας 4.6) .



Εικόνα 4.8. Γενεαλογικό δέντρο Οικογένειας 5 – Άτομο δείκτης I-1 (κύκλος: θηλυκό, τετράγωνο: αρσενικό, μαύρος κύκλος/τετράγωνο: προσβεβλημένο μέλος, ?: άγνωστη κατάσταση)

Ακολούθησε μοριακός έλεγχος με sequencing στο IRE του *FTL* ο οποίος ανέδειξε τη μετάλλαξη A40G σε ετεροζυγωτία στο άτομο δείκτη και στο γιο της (βλ. Εικόνα 4.9), θέτοντας τη διάγνωση του HHCS.



Εικόνα 4.9. Ανάγνωση της πρωτοταγούς ακολουθίας του DNA της περιοχής του IRE του γονιδίου *FTL*. **A.** Μάρτυρας wt / wt. **B.** Ετεροζυγωτία για τη μετάλλαξη A40G: A40G / wt (το βέλος δείχνει τη θέση 40 στο IRE)

4.2.1.6 Οικογένεια 6

Η έκτη οικογένεια που μελετήθηκε αποτελείται από 29 μέλη και η καταγωγή της είναι από την περιοχή της Καρδίτσας. Το άτομο δείκτης (IV-1) είχε γνωστή υπερφερριταιμία από ηλικία 3 ετών. Η φερριτίνη του ήταν 1600 µg/L, με φυσιολογικό σίδηρο ορού και κορεσμό τρανσφερίνης 32%. Το αγόρι ήταν ασυμπτωματικό, με ελεύθερο ατομικό αναμνηστικό. Από την κλινική εξέταση δεν προέκυψαν παθολογικά ευρήματα και ο λοιπός εργαστηριακός έλεγχος ήταν εντός φυσιολογικών ορίων. Η οφθαλμολογική εξέταση που έγινε ανέδειξε αστιγματισμό, χωρίς όμως την παρουσία καταρράκτη. Συγχρόνως με το άτομο δείκτης, διερευνήθηκε και ο πατέρας του (III-2), ηλικίας 40 ετών, ο οποίος είχε επίσης αυξημένη φερριτίνη (1100 µg/L) με φυσιολογικό σίδηρο ορού και κορεσμό τρανσφερίνης και χωρίς άλλα ευρήματα από τον

εργαστηριακό του έλεγχου. Δεν ανέφερε συμπτώματα και η κλινική εξέταση δεν ανέδειξε παθολογικά ευρήματα. Και εδώ η οφθαλμολογική εξέταση δεν ήταν θετική για την παρουσία καταρράκτη.

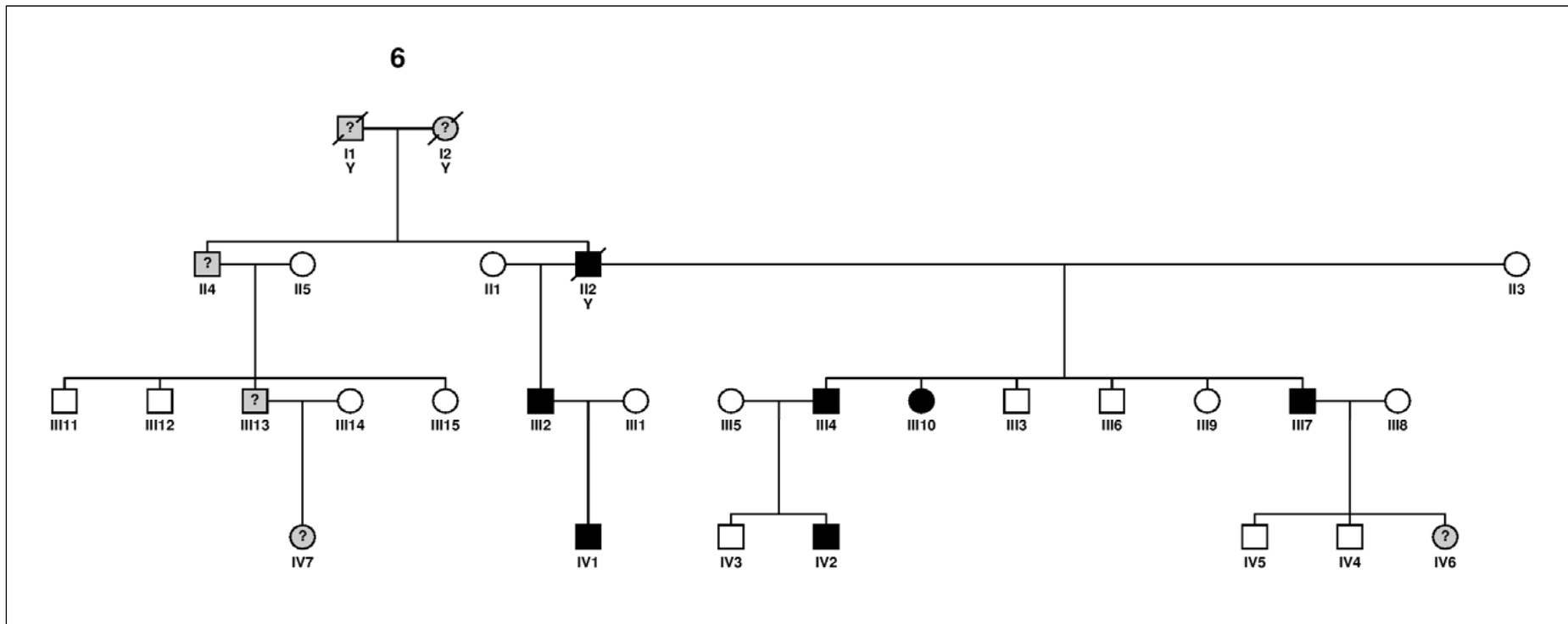
Πίνακας 4.7 . Κλινικά χαρακτηριστικά οικογένειας 6

| Μέλος Οικογένειας | Φύλο | Ηλικία διάγνωσης | Φερριτίνη (μg/L) | Fe (μg/dL) | TIBC (μg/dL) | sat TrF (%) | Παρουσία καταρράκτη (Ηλικία διάγνωσης) | Επέμβαση για καταρράκτη (Ηλικία) | Μετάλλαξη στο IRE του FTL | Διάγνωση |
|-------------------|------|------------------|------------------|------------|--------------|-------------|--|----------------------------------|---------------------------|-------------------|
| II-2 | A | - | αυξημένη | - | - | - | N | - | - | HHCS |
| III-2 | A | 40 | 1100 | 125 | 327 | 38 | O | - | - | HHCS |
| III-4 | A | - | αυξημένη | - | - | - | N | - | C39G | HHCS |
| III-5 | Θ | - | φυσιολογική | - | - | - | O | - | wt | |
| III-7 | A | - | αυξημένη | - | - | - | N | - | - | HHCS |
| III-10 | Θ | 49 | αυξημένη | - | - | - | N | - | - | HHCS |
| III-13 | A | - | αυξημένη | - | - | - | - | - | - | Υπερφερριτιναίμια |
| IV-1 | A | 3 | 1600 | 109 | 336 | 32 | O | - | C39G | HHCS |
| IV-2 | A | 4 | αυξημένη | - | - | - | - | - | C39G | HHCS |
| IV-6 | Θ | 9 | αυξημένη | - | - | - | - | - | - | Υπερφερριτιναίμια |
| IV-7 | Θ | - | αυξημένη | - | - | - | - | - | - | Υπερφερριτιναίμια |

Το οικογενειακό ιστορικό ήταν θετικό για την παρουσία φερριτίνης και καταρράκτη (Βλ. Εικόνα 4.10 και Πίνακας 4.7). Κατά την περίοδο της διερεύνησης, και σύμφωνα με τα στοιχεία που συγκεντρώθηκαν από την καταγραφή του γενεαλογικού δέντρου, 10 από τα 29 μέλη είχαν γνωστή υπερφερριτιναίμια. Τρία μέλη (III-4, III-7, III-10) είχαν διαγνωσθεί με καταρράκτη, χωρίς να είναι γνωστό αν κάποιο από αυτά είχε υποβληθεί σε εγχείρηση αποκατάστασης φακού. Από την καταγραφή του οικογενειακού ιστορικού επίσης προκύπτει, ότι ο πατέρας (III-2) του ατόμου δείκτη είχε 6 ετεροθαλή αδέρφια από τον ίδιο πατέρα (II-2), ο οποίος την περίοδο της καταγραφής είχε αποβιώσει. Σύμφωνα με το ατομικό του αναμνηστικό είχε υπερφερριτιναίμια και καταρράκτη. Δεν αναφέρεται ιστορικό υπερφερριτιναίμιας ή καταρράκτη για τη γιαγιά του ατόμου δείκτη.

Ο μοριακός έλεγχος που διεξήχθη σε 4 μέλη της οικογένειας (III-4, III-5, IV-1, IV-2), ανέδειξε την ετερόζυγη μετάλλαξη C39G σε 3 από αυτά. Κανένας από τους 3 ετεροζυγώτες δεν είχε γνωστό καταρράκτη την περίοδο της διάγνωσης. Βάσει του μοριακού ελέγχου, της κλινικοεργαστηριακής εικόνας και του θετικού οικογενειακού ιστορικού, σε 7 μέλη της οικογένειας τέθηκε η διάγνωση του HHCS. Για τα 3 υπερφερριτιναιμικά μέλη που δεν εξακριβώθηκε η παρουσία καταρράκτη, θα ήταν σκόπιμος ο περαιτέρω μοριακός έλεγχος.

Τα αποτελέσματα του μοριακού ελέγχου επιβεβαιώθηκαν και με τη μέθοδο RFLP. Και για τους τρεις θετικούς ασθενείς η πέψη με την περιοριστική ενδονουκλέαση TspRI απέδωσε προϊόντα μήκους 407, 321, 86 και 29 ζευγών νουκλεοτιδικών βάσεων, αποτέλεσμα συμβατό με ετεροζυγωτία για τη μετάλλαξη C39G. Η πέψη σε δείγμα από το μέλος III-5 απέδωσε προϊόντα μήκους 321, 86, 29 ζευγών νουκλεοτιδικών βάσεων, αποτέλεσμα συμβατό με μη μεταλλαγμένο IRE, όπως είχε διαπιστωθεί και με τη μέθοδο του sequencing.



Εικόνα 4.10. Γενεαλογικό δέντρο Οικογένειας 6 – Άτομο δείκτης IV-1 (κύκλος: θηλυκό, τετράγωνο: αρσενικό, μαύρος κύκλος/τετράγωνο: προσβεβλημένο μέλος, ?: άγνωστη κατάσταση, /: θάνατος)

4.2.1.7 Οικογένεια 7

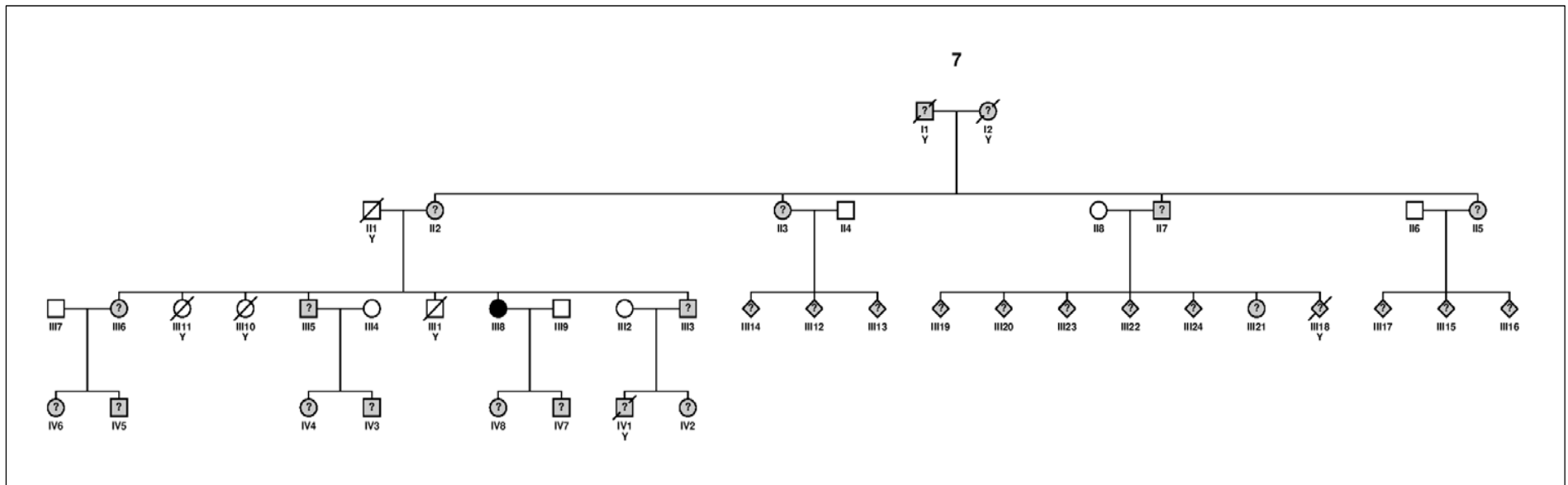
Η έβδομη οικογένεια που μελετήθηκε είναι μια πολυμελής οικογένεια με καταγωγή από την Καρδίτσα. Το άτομο δείκτης (III-8) ήταν μια γυναίκα 48 ετών, η οποία προσήλθε στο Ηπατολογικό Ιατρείο λόγω τυχαίας ανεύρεσης υπερφερριτιναιμίας. Η γυναίκα ήταν ασυμπτωματική, ενώ από το ατομικό της αναμνηστικό ανέφερε σταδιακή πτώση του αιματοκρίτη κατά τους τελευταίους 10 μήνες, σακχαρώδη διαβήτη υπό αγωγή και ανεγχείρητο αμφοτερόπλευρο καταρράκτη από ηλικία 32 ετών. Η κλινική εξέταση δεν ανέδειξε παθολογικά ευρήματα, εκτός από παχυσαρκία. Από τον εργαστηριακό έλεγχο διαπιστώθηκε ήπια αναιμία (αιμοσφαιρίνη 11,9 g/dL), υπερφερριτιναιμία (φερριτίνη: 680 µg/L) και χαμηλός σίδηρος ορού (33 µg/dL). Σε πρόσφατη αξονική άνω κάτω κοιλίας δεν αναφέρονταν παθολογικά ευρήματα, εκτός από λιπώδη διήθηση του ήπατος.

Πίνακας 4.8 . Κλινικά χαρακτηριστικά οικογένειας 7

| Μέλος Οικογένειας | Φύλο | Ηλικία διάγνωσης | Φερριτίνη (µg/L) | Fe (µg/dL) | TIBC (µg/dL) | sat TrF (%) | Παρουσία καταρράκτη (Ηλικία διάγνωσης) | Επέμβαση για καταρράκτη (Ηλικία) | Μετάλλαξη στο IRE του FTL | Διάγνωση |
|-------------------|------|------------------|------------------|------------|--------------|-------------|--|----------------------------------|---------------------------|-------------------|
| II-2 | Θ | 86 | 603 | - | - | - | - | - | - | Υπερφερριτιναιμία |
| II-7 | A | 87 | - | - | - | - | N | N (84) | - | Καταρράκτης |
| III-3 | A | 58 | - | - | - | - | N | - | - | Καταρράκτης |
| III-5 | A | 53 | - | - | - | - | N | - | - | Καταρράκτης |
| III-6 | A | 55 | - | - | - | - | N | - | - | Καταρράκτης |
| III-8 | Θ | 48 | 680 | 33 | 433 | 8 | N (32) | O | C39G | ΗΗCS |
| III-21 | Θ | 21 | 710 | - | - | - | - | - | - | Υπερφερριτιναιμία |

Από το οικογενειακό ιστορικό το άτομο δείκτης (III-8) ανέφερε παρουσία καταρράκτη σε 3 από τα 6 αδέρφια της (Βλ. Εικόνα 4.11 και Πίνακας 4.8), ενώ η μητέρα της (II-2) είχε γνωστή υπερφερριτιναιμία. Ένας αδερφός της μητέρας της είχε χειρουργηθεί για καταρράκτη σε ηλικία 84 ετών και μια από τις κόρες του (III-21) είχε υπερφερριτιναιμία. Δεν είναι γνωστή η ύπαρξη καταρράκτη ή αυξημένης φερριτίνης στα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας, ούτε κατέστη δυνατή η συλλογή εργαστηριακών στοιχείων από άλλα μέλη εκτός της 48χρονης γυναίκας.

Λόγω της παρουσίας υπερφερριτιναιμίας και καταρράκτη από νεαρή ηλικία, διενεργήθηκε μοριακός έλεγχος, ο οποίος ανέδειξε με τη μέθοδο του sequencing τη μετάλλαξη C39G σε ετεροζυγωτία. Το αποτέλεσμα αναπαράχθηκε και με τη μέθοδο RFLP. Η πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση TspRI απέδωσε προϊόντα μήκους 407, 321, 86 και 29 ζευγών νουκλεοτιδικών βάσεων, αποτέλεσμα συμβατό με ετεροζυγωτία για τη συγκεκριμένη μετάλλαξη στο IRE του γονιδίου *FTL*.



Εικόνα 4.11. Γενεαλογικό δέντρο Οικογένειας 7 – Άτομο δείκτης III-8 (κύκλος: θηλυκό, τετράγωνο: αρσενικό, μαύρος κύκλος/τετράγωνο: προσβεβλημένο μέλος, ?: άγνωστη κατάσταση, / θάνατος)

4.2.2. Ασθενείς με υπερφερριτιναιμία και καταρράκτη, χωρίς θετικό οικογενειακό ιστορικό

4.2.2.1 Ασθενείς με μεταλλάξεις στο IRE του γονιδίου *FTL*

Αναγνωρίστηκαν 3 ασθενείς με υπερφερριτιναιμία, καταρράκτη και μετάλλαξη στο IRE του γονιδίου *FTL*, χωρίς όμως γνωστό οικογενειακό ιστορικό για την παρουσία αυξημένης φερριτίνης ή/και καταρράκτη. Βάσει των κλινικών στοιχείων και του μοριακού ελέγχου τέθηκε η διάγνωση του HHCS (Πίνακας 4.9). Τα 3 περιστατικά παρουσιάζονται στη συνέχεια.

Πίνακας 4.9. Κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών με HHCS χωρίς οικογενειακό ιστορικό

| Ασθενής | Φύλο | Ηλικία διάγνωσης | Φερριτίνη (μg/L) | Fe (μg/dL) | TIBC (μg/dL) | sat Tf (%) | Παρουσία καταρράκτη (Ηλικία διάγνωσης) | Επέμβαση για καταρράκτη (Ηλικία) | Μετάλλαξη στο IRE του <i>FTL</i> | Διάγνωση |
|---------|------|------------------|------------------|------------|--------------|------------|--|----------------------------------|----------------------------------|----------|
| 1 | Θ | 40 | 950 | 65 | 340 | 19 | N | N (38) | C39G | HHCS |
| 2 | Θ | 43 | 1018 | 196 | 365 | 53 | N (42) | 0 | C39G | HHCS |
| 3 | Θ | 29 | 909 | 53 | 273 | 19 | N | 0 | A40G | HHCS |

Ασθενής 1

Η πρώτη ασθενής, μια γυναίκα 40 ετών, παραπέμφθηκε για διερεύνηση ασυμπτωματικής υπερφερριτιναιμίας. Είχε γνωστό ιστορικό αμφοτερόπλευρου καταρράκτη, ο οποίος είχε χειρουργηθεί προ διετίας. Από τον εργαστηριακό έλεγχο διαπιστώθηκε αυξημένη φερριτίνη (950 μg/L) με φυσιολογικό σίδηρο ορού και φυσιολογικό κορεσμό τρανσφερρίνης. Η περιοχή του IRE του γονιδίου *FTL* ελέγχθηκε με DNA sequencing και αναδείχτηκε ετεροζυγωτία για τη μετάλλαξη C39G..

Ασθενής 2

Η δεύτερη ασθενής, μια γυναίκα 43 ετών, προσήλθε στο Ηπατολογικό Ιατρείο για διερεύνηση ασυμπτωματικής υπερφερριτιναιμίας. Από το ατομικό

της αναμνηστικό ανέφερε επεισόδια χολοκυστίτιδας και χορήγηση ενδομυϊκού σιδήρου κατά την πρώτη της εγκυμοσύνη, προ 6 ετών. Προ έτους στην ασθενής είχε διαγνωσθεί αρχόμενος περιφερικός καταρράκτης. Η κλινική εξέταση δεν ανέδειξε άλλα παθολογικά ευρήματα, ενώ από τον εργαστηριακό έλεγχο επιβεβαιώθηκε η γνωστή υπερφερριτιναιμία (φερριτίνη: 1018 μg/L), με αυξημένο σίδηρο ορού (196 μg/L), φυσιολογική τρανσφερρίνη και οριακά αυξημένο κορεσμό τρανσφερρίνης (βλ. Πίνακα 4.9). Σε υπερηχογράφημα ήπατος διαπιστώθηκε οριακή ηπατομεγαλία, ενδεικτική λιπώδους διήθησης, ενώ σε μαγνητική τομογραφία ήπατος-καρδιάς αναδείχθηκαν σημεία μέτριας εναπόθεσης σιδήρου στο ηπατικό παρέγχυμα, χωρίς σημεία σιδήρωσης του μυοκαρδίου της αριστεράς κοιλίας (κλάσμα εξωθήσεως 60%).

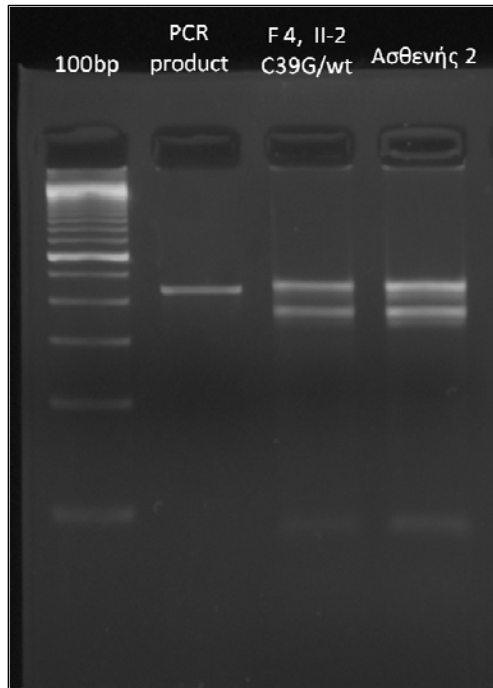
Από το οικογενειακό της ιστορικό η ασθενής δεν αναφέρει πρώτου βαθμού συγγενείς με γνωστή υπερφερριτιναιμία ή καταρράκτη. Στη 48χρονη αδερφή της ασθενούς διαπιστώθηκε φυσιολογική φερριτίνη. Τα παιδιά της ασθενούς δεν είχαν γνωστή υπερφερριτιναιμία την περίοδο της διερεύνησης.

Λόγω της συνύπαρξης υπερφερριτιναιμίας και αρχόμενου καταρράκτη, διενεργήθηκε μοριακός έλεγχος στο IRE με τη μέθοδο RFLP. Τα αποτελέσματα της πέψης με την περιοριστική ενδονουκλεάση TspRI ήταν συμβατά με ετεροζυγωτία για τη μετάλλαξη C39G (βλ.Εικόνα 4.12).

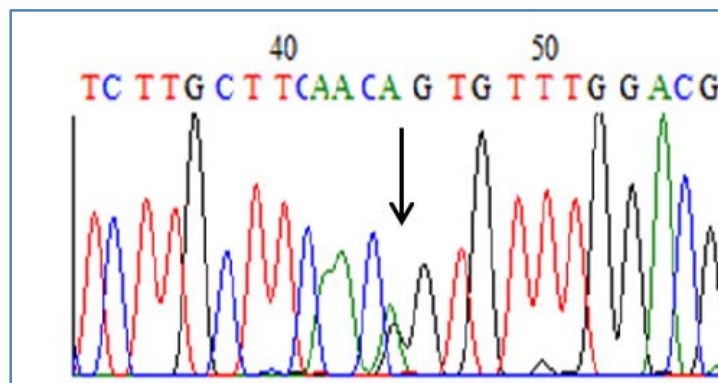
Ασθενής 3

Η τρίτη ασθενής, μια γυναίκα 29 ετών από τη Λάρισα, εκτιμήθηκε από αιματολόγο λόγω εμμένουσας αυξημένης φερριτίνης. Ο γιατρός της αναφέρει ότι η γυναίκα ήταν απολύτως υγιής, χωρίς κάτι αξιόλογο από το ατομικό αναμνηστικό, εκτός από την παρουσία καταρράκτη. Από τα γνωστά στοιχεία του εργαστηριακού της ελέγχου αναφέρεται φερριτίνη 909 μg/L, με σίδηρο ορού 53 μg/dL. Δεν αναφέρονται στοιχεία σχετικά με παρουσία υπερφερριτιναιμίας ή καταρράκτη από το οικογενειακό ιστορικό της ασθενούς.

Διενεργήθηκε μοριακός έλεγχος με τη μέθοδο του DNA sequencing και ανέδειξε ετεροζυγωτία για τη μετάλλαξη A40G στο IRE του *FTL* (Εικόνα 4.13).



Εικόνα 4.12. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης με την περιοριστική ενδονουκλεάση TspRI. Το προϊόν της PCR για την ασθενή 2 διακρίνεται στις 436 βάσεις. Τα προϊόντα της πέψης για το ετερόζυγο μέλος II-2 της Οικογένειας 4 (F4, II-2) στις 407, 321, 86 και 29 (μη διακριτό προϊόν) βάσεις. Η πέψη από την Ασθενή 2 αποδίδει ίδια αποτελέσματα με τον ασθενή F4, II-2 .



Εικόνα 4.13. DNA sequencing της περιοχής του IRE του γονιδίου *FTL* για την Ασθενή 3. Ετεροζυγωτία για τη μετάλλαξη A40G: A40G / wt (το βέλος δείχνει τη θέση 40 στο IRE)

4.2.2.2 Ασθενείς χωρίς μεταλλάξεις στο IRE του γονιδίου *FTL*

Αναγνωρίστηκαν 6 περιπτώσεις με υπερφερριτιναιμία και καταρράκτη, χωρίς θετικό οικογενειακό ιστορικό. Στο πλαίσιο διερεύνησης για παρουσία ΗΗCS διενεργήθηκε μοριακός έλεγχος ο οποίος όμως ήταν αρνητικός για παρουσία μεταλλάξεων στο IRE του *FTL*. Η διάγνωση του ΗΗCS αποκλείστηκε. Σε τρεις από τους ασθενείς η υπερφερριτιναιμία αποδόθηκε σε άλλα αίτια (δυσερυθροποιητική αναιμία, κατάχρηση αιθανόλης, μεταβολικό σύνδρομο). Για τους υπόλοιπους τρεις δεν ανευρέθηκε συγκεκριμένο αίτιο σύμφωνα με τα υπάρχοντα κλινικοεργαστηριακά δεδομένα. Οι περιπτώσεις αυτές περιγράφονται στη συνέχεια. Τα κλινικοεργαστηριακά στοιχεία συνοψίζονται στον Πίνακα 4.10.

Πίνακας 4.10 . Κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών με υπερφερριτιναιμία και καταρράκτη, χωρίς μεταλλάξεις στην περιοχή του IRE του γονιδίου *FTL*

| Ασθενής | Φύλο | Ηλικία διάγνωσης | Φερριτίνη (μg/L) | Fe (μg/dL) | TIBC (μg/dL) | sat TrF (%) | Παρουσία καταρράκτη (Ηλικία διάγνωσης) | Επέμβαση για καταρράκτη (Ηλικία) | Μετάλλαξη στο IRE του <i>FTL</i> | Μεταλλάξεις σε <i>HFE, HJV, TfR2, FPN</i> * |
|---------|------|------------------|------------------|------------|--------------|-------------|--|----------------------------------|----------------------------------|---|
| 1 | Θ | 25 | 2700 | - | - | - | N (25) | - | wt | - |
| 2 | A | 45 | 918 | - | - | - | - | - | wt | - |
| 3 | A | 55 | 840 | 120 | - | - | - | N (51) | wt | wt |
| 4 | A | 69 | 1077 | 147 | 306 | 48 | N (69) | 0 | wt | wt |
| 5 | A | 34 | 1914 | 103 | 247 | 42 | N (34) | 0 | wt | wt |
| 6 | A | 53 | 1051 | 94 | 212 | 44 | N (29) | N (35) | wt | wt |

* **Σημείωση:** Μοριακός έλεγχος για κληρονομική αιμοχρωμάτωση

Ασθενής 1

Η πρώτη ασθενής, μια γυναίκα 25 ετών από τη Βόρεια Ελλάδα, έπασχε από β ομόζυγη μεσογειακή αναιμία. Παραπέμφθηκε για μοριακό έλεγχο του

IRE του γονιδίου *FTL*, λόγω εμμένουσας υψηλής φερριτίνης (2700 μg/L), παρά τη λήψη αγωγής αποσιδήρωσης, σε συνδυασμό με την εμφάνιση αμφοτερόπλευρου καταρράκτη από έτους. Από τον κλινικοεργαστηριακό έλεγχο που είχε διενεργηθεί δεν διαπιστώθηκε κάποια χρόνια φλεγμονώδης νόσος, ενώ αποκλείστηκε η ύπαρξη νεοπλασίας.

Στο πλαίσιο διερεύνησης της υπερφερριτιναιμίας και σε συνδυασμό με τον αμφοτερόπλευρο καταρράκτη, έγινε μοριακός έλεγχος με sequencing του IRE. Δεν ανιχνεύτηκαν μεταλλάξεις. Η υπερφερριτιναιμία αποδόθηκε στη δυσερυθροποιητική αναιμία της ασθενούς σε συνδυασμό με τις χρόνιες μεταγγίσεις.

Ασθενής 2

Ο δεύτερος ασθενής ήταν ένας άντρας 45 ετών από τη Βόρεια Ελλάδα, που εμφάνιζε ασυμπτωματική εμμένουσα υπερφερριτιναιμία. Από το ατομικό του αναμνηστικό δεν αναφερόταν κάτι παθολογικό, εκτός από παρουσία καταρράκτη. Μετά από αποκλεισμό φλεγμονωδών, νεοπλασματικών και αιμολυτικών αιτιών της υπερφερριτιναιμίας, ζητήθηκε μοριακός έλεγχος (sequencing) για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο IRE του *FTL*, ο οποίος ήταν αρνητικός.

Ασθενής 3

Ο τρίτος ασθενής, ένας άντρας 55 ετών, παραπέμφθηκε στο Ηπατολογικό Ιατρείο για διερεύνηση αυξημένης φερριτίνης. Από το ιστορικό του αναφέρεται εγχείρηση για αμφοτερόπλευρο καταρράκτη προ 4 ετών και κατάχρηση αλκοόλ. Ο κλινικοεργαστηριακός έλεγχος ήταν αρνητικός για την παρουσία χρόνιων φλεγμονωδών νοσημάτων ή νεοπλασίας. Από τα εργαστηριακά ευρήματα, προέκυψε φερριτίνη 840 μg/L, με φυσιολογικό σίδηρο ορού. Ο δείκτης TIBC δεν ήταν διαθέσιμος και επομένως δεν ήταν δυνατό να υπολογισθεί ο κορεσμός τρανσφερρίνης. Σε μαγνητική τομογραφία ήπατος που είχε προηγηθεί αναφέρεται βαθμός σιδήρωσης ήπατος 4. Από το

οικογενειακό του ιστορικό δεν προέκυψαν στοιχεία για παρουσία υπερφερριτιναιμίας ή καταρράκτη.

Ο μοριακός έλεγχος για πρωτοπαθή αιμοχρωμάτωση και για μεταλλάξεις στο IRE του γονιδίου *FTL* ήταν αρνητικός. Η υπερφερριτιναιμία αποδόθηκε σε κατάχρηση αιθανόλης.

Ασθενής 4

Η τέταρτη περίπτωση, ένας άντρας 69 ετών από την Πάτρα, εκτιμήθηκε στο Ηπατολογικό Ιατρείο λόγω ασυμπτωματικής υπερφερριτιναιμίας. Σε τυχαίο εργαστηριακό έλεγχο ανευρέθηκε αυξημένη φερριτίνη (>1500 μg/L), ενώ παράλληλα ο ασθενής διαγνώστηκε με αμφοτερόπλευρο καταρράκτη. Από το ιστορικό του ασθενή προκύπτει ότι συμμετείχε σε πρόγραμμα εθελοντικής αιμοδοσίας από ηλικία 20 ετών έως και την περίοδο ανεύρεσης της αυξημένης φερριτίνης. Ο κλινικοεργαστηριακός έλεγχος που ακολούθησε απέκλεισε την παρουσία χρόνιας φλεγμονής, νεοπλασίας ή αιμόλυσης. Ο σίδηρος ορού ήταν φυσιολογικός και ο κορεσμός τρανσφερρίνης υπολογίστηκε στο 48%. Σε μαγνητική τομογραφία ήπατος-καρδίας δεν ανευρέθηκε εναπόθεση σιδήρου. Από το οικογενειακό ιστορικό του ασθενή δεν αναφέρεται υπερφερριτιναιμία ή καταρράκτης.

Ακολούθησε μοριακός έλεγχος για κληρονομική αιμοχρωμάτωση και για παρουσία HHCS, ο οποίος ήταν αρνητικός για μεταλλάξεις. Ο ασθενής τέθηκε σε αφαιμάξεις για προληπτική αντιμετώπιση της αυξημένης φερριτίνης. Μετά από 7 αφαιμάξεις η φερριτίνη μειώθηκε από 1900 μg/L σε 1070 μg/L. Δεν αναγνωρίστηκε κάποιο συγκεκριμένο αίτιο για την υπερφερριτιναιμία.

Ασθενής 5

Ο πέμπτος ασθενής, ένας άντρας 34 ετών από την Κέρκυρα, προσήλθε στο Ηπατολογικό Ιατρείο για εκτίμηση, και αυτός λόγω εμμένουσας υπερφερριτιναιμίας. Ο άντρας είχε β ενδιάμεση μεσογειακή αναιμία και από το ατομικό αναμνηστικό του αναφέρεται σακχαρώδης διαβήτης και

υποθυρεοειδισμός, για το οποία λάμβανε αγωγή από το στόμα. Δεν είχε λάβει ποτέ σκευάσματα σιδήρου ή μεταγγίσεις. Από το οικογενειακό ιστορικό ο ασθενής δεν ανέφερε παρουσία υπερφερριτιναιμίας ή καταρράκτη σε άλλα μέλη της οικογένειας του. Κατά την προσέλευσή του ήταν ασυμπτωματικός και από την κλινική εξέταση δεν προέκυψε κάτι παθολογικό, εκτός από αμφοτερόπλευρη μέτρια θόλωση φακών κατά τη βυθοσκόπηση. Από τον κλινικοεργαστηριακό έλεγχο που ακολούθησε διαπιστώθηκε ορθόχρωμη μικροκυτταρική αναιμία, υπερφερριτιναιμία (φερριτίνη: 1914 μg/L), φυσιολογικός σίδηρος ορού και κορεσμός τρανσφερρίνης 42%. Δε διαπιστώθηκε κάποιο χρόνια φλεγμονώδες νόσημα ή νεοπλασία. Σε μαγνητική καρδιάς που είχε προηγηθεί δεν αναφερόταν σιδήρωση του μυοκαρδίου. Σε βιοψία ήπατος που είχε διενεργηθεί πριν την παραπομπή του ασθενή είχε διαπιστωθεί ήπια σιδήρωση ηπατικού παρεγχύματος, συμβατή με πρωτοπαθή αιτιολογία.

Στο πλαίσιο των ανωτέρων ευρημάτων ακολούθησε μοριακός έλεγχος για πρωτοπαθή αιμοχρωμάτωση και για παρουσία του συνδρόμου υπερφερριτιναιμίας καταρράκτη. Δεν ανευρέθηκαν μεταλλάξεις. Παρά την απουσία μοριακής διάγνωσης, ο ασθενής τέθηκε σε αφαιμάξεις οι οποίες επιδείνωσαν την αναιμία του, χωρίς να βελτιώσουν την υπερφερριτιναιμία. Παράλληλα, έγινε μέτρηση της επιδίνης η οποία βρέθηκε αυξημένη. Αποφασίστηκε στη συνέχεια να τεθεί ο ασθενής σε αποσιδήρωση με Exjade, στην οποία απάντησε με μείωση της φερριτίνης, χωρίς να παρουσιάσει παρενέργειες.

Ασθενής 6

Η έκτη περίπτωση, ένας άντρας 58 ετών, προσήλθε στο Ηπατολογικό Ιατρείο λόγω εμμένουσας υπερφερριτιναιμίας κατά τα τελευταία 5 έτη. Η υπερφερριτιναιμία ήταν τυχαίο εύρημα σε εργαστηριακό έλεγχο και ο ασθενής δεν παρουσίαζε συμπτώματα. Από το ατομικό του αναμνηστικό ανέφερε σακχαρώδη διαβήτη τύπου II, αρτηριακή υπέρταση, τοπική χρήση κορτιζόνης λόγω αλλεργικής επιπεφυκίτιδας από ηλικία 18 έως 25 ετών και εγχείρηση για αμφοτερόπλευρο καταρράκτη σε ηλικία 35 ετών. Από το οικογενειακό του

ιστορικό δεν αναφέρεται παρουσία υπερφερριτιναιμίας ή καταρράκτη. Ο ασθενής είχε ήδη ελεγχθεί στο παρελθόν για την εμμένουσα υπερφερριτιναιμία, η οποία κυμαινόταν από τα ανώτερα φυσιολογικά όρια έως και 1300 µg/L. Ο σίδηρος ορού ήταν πάντα εντός φυσιολογικών ορίων και ο κορεσμός τρανσφερρίνης δεν ήταν ποτέ παθολογικός. Σε υπέρηχο ήπατος που είχε γίνει προ εξαετίας αναφερόταν ήδη λιπώδης διήθηση του ήπατος και ο ασθενής ήταν σε πρόγραμμα απώλειας σωματικού βάρους. Οι δείκτες φλεγμονής, καθώς και οι καρκινικοί δείκτες ήταν φυσιολογικοί. Προ 4 ετών είχε γίνει μοριακός έλεγχος για αιμοχρωμάτωση, ο οποίος ήταν αρνητικός. Προ τριετίας, και για ένα χρόνο, ο ασθενής είχε υποβληθεί σε σύνολο 5 αφαιμάξεων, στο πλαίσιο διερευνητικής και συμπτωματικής αντιμετώπισης της υπερφερριτιναιμίας του. Ο ασθενής ανέχτηκε τις αφαιμάξεις καλώς, χωρίς να εμφανίσει αναιμία, ενώ η φερριτίνη σημείωσε πτώση έως και τα ανώτερα φυσιολογικά επίπεδα. Παράλληλα σημειώνεται την περίοδο εκείνη και απώλεια σωματικού βάρους, καθώς και ικανοποιητική ρύθμιση του σακχαρώδους διαβήτη.

Λόγω της εμμένουσας υπερφερριτιναιμίας και της εμφάνισης αμφοτερόπλευρου καταρράκτη σε νεαρή ηλικία, κρίθηκε σκόπιμος ο έλεγχος για παρουσία μεταλλάξεων στο IRE του γονιδίου *FTL*. Η ανάγνωση της πρωτοταγούς ακολουθίας των βάσεων του DNA της περιοχής του IRE δεν ανέδειξε μεταλλάξεις συμβατές με το σύνδρομο υπερφερριτιναιμίας καταρράκτη.

Η υπερφερριτιναιμία αποδόθηκε στην παρουσία δυσμεταβολικού συνδρόμου. Πιθανόν η χρήση τοπικών κορτικοειδών να ευθύνεται εν μέρει για την εμφάνιση καταρράκτη σε νεαρή ηλικία.

4.2.3 Σύνοψη αποτελεσμάτων ασθενών με HHCS

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης προέκυψαν 10 περιπτώσεις με HHCS (που δε σχετίζονταν συγγενικά μεταξύ τους), στο σύνολο των 16 ασθενών που διερευνήθηκαν για το σύνδρομο. Από τις 10 περιπτώσεις, οι 7 είχαν θετικό οικογενειακό ιστορικό. Σύμφωνα με τα κλινικά και εργαστηριακά στοιχεία, το οικογενειακό ιστορικό και το μοριακό έλεγχο αναγνωρίστηκαν συνολικά 34 άτομα με HHCS μεταξύ των μελών των οικογενειών και των περιπτώσεων που εξετάστηκαν. Ο μοριακός έλεγχος ανέδειξε δύο σημειακές μεταλλάξεις, τη C39G και την A40G, σε όλες τις περιπτώσεις σε ετεροζυγωτία. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 4.11.

Πίνακας 4.11. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα ασθενών με HHCS (Ο: Οικογένεια, Α: Ασθενής)

| Οικογένεια / Ασθενής | Μικρότερη ηλικία διάγνωσης | Μικρότερη ηλικία εμφάνισης καταρράκτη | Τιμές φερριτίνης [ελάχιστη / μέγιστη] (μg/L) | Αριθμός ατόμων με HHCS / Αριθμός μελών οικογένειας | Μέθοδος Μοριακού Ελέγχου | Μετάλλαξη |
|----------------------|----------------------------|---------------------------------------|--|--|--------------------------|-----------|
| Ο 1 | 5 | 5 | 667 / 2070 | 11 / 41 | DNA sequencing | C39G |
| Ο 2 | 35 | 12 | 770 / 1388 | 5 / 19 | DNA sequencing | C39G |
| Ο 3 | 37 | 30 | 950 / 1870 | 3 / 38 | DNA sequencing | C39G |
| Ο 4 | 4 | - | 1300 / 1600 | 2 / 6 | DNA sequencing RFLP | C39G |
| Ο 5 | 28 | <26 | 1200 / 1338 | 2 / 5 | DNA sequencing | A40G |
| Ο 6 | 3 | - | 1100 / 1600 | 7 / 29 | DNA sequencing RFLP | C39G |
| Ο 7 | 48 | 32 | 680 | 1 / 42 | DNA sequencing RFLP | C39G |
| Α 1 | 40 | - | 950 | 1 | DNA sequencing | C39G |
| Α 2 | 43 | 42 | 1018 | 1 | RFLP | C39G |
| Α 3 | 29 | - | 909 | 1 | DNA sequencing | A40G |
| | | | Σύνολο | 34 | | |

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1. Η διερεύνηση της εμμένουσας ασυμπτωματικής υπερφερριτιναιμίας

5.1.1 Υπερφερριτιναιμία και συσσώρευση σιδήρου

Η ανεύρεση υψηλής τιμής φερριτίνης αποτελεί συχνό εύρημα σε εργαστηριακό έλεγχο ρουτίνας και η διερεύνηση της ασυμπτωματικής υπερφερριτιναιμίας είναι συχνή αιτία παραπομπής ασθενών σε τριτοβάθμια Νοσοκομεία (Beaton and Adams, 2012). Στην πλειονότητα των περιπτώσεων οι ασθενείς παραπέμπονται λόγω υποψίας αιμοχρωμάτωσης, χωρίς να έχουν πρώτα αποκλειστεί συνηθέστερα αίτια υπερφερριτιναιμίας που δε σχετίζονται με την υπερσυσσώρευση σιδήρου.

Στην παρούσα μελέτη μόνο τρεις (ποσοστό 3,4%) από τους 87 ασθενείς με υπερφερριτιναιμία διαγνώστηκαν με κληρονομική αιμοχρωμάτωση, ενώ σε περισσότερο από το 70% των περιπτώσεων η υπερφερριτιναιμία αποδόθηκε σε αίτια που δε σχετίζονταν με πρωτοπαθή ή δευτεροπαθή υπερσυσσώρευση σιδήρου. Ο κύριος λόγος παραπομπής των ασθενών με αυξημένη φερριτίνη στο Ηπατολογικό Ιατρείο ήταν η πιθανή αιμοχρωμάτωση, αλλά μόνο στο 17,3% διαγνώστηκε υπερφόρτωση σιδήρου (πρωτοπαθής και δευτεροπαθής). Στις περισσότερες περιπτώσεις δεν είχαν διερευνηθεί άλλα συνηθέστερα αίτια υπερφερριτιναιμίας.

Σε αντίστοιχες μελέτες σε διαφορετικούς πληθυσμούς, η υπερφερριτιναιμία αποδόθηκε σε HFE αιμοχρωμάτωση σε λιγότερους από τους μισούς ασθενείς που παραπέμφθηκαν για διερεύνηση υπερφερριτιναιμίας. Σε μελέτη που έγινε σε τριτοβάθμιο κέντρο υγείας στον Καναδά η HFE αιμοχρωμάτωση ήταν μέσα στις τρεις πιο συχνές διαγνώσεις στους υπερφερριτιναιμικούς ασθενείς, ακόμα και όταν αυτοί

στρωματοποιήθηκαν ως προς τα επίπεδα της φερριτίνης ορού. Η HFE αιμοχρωμάτωση διαγνώστηκε σε 28% έως 42% των ασθενών ανάλογα με το επίπεδο στρωματοποίησης, και επομένως, σε ένα μεγάλο ποσοστό των ασθενών η υπερφερριτιναιμία δεν οφειλόταν σε υπερσυσσώρευση σιδήρου (Wong and Adams, 2006). Σύμφωνα με τη μελέτη HEIRS (Haemochromatosis and Iron Overload Screening Study), μια πληθυσμιακή μελέτη που σκοπό είχε να προσδιορίσει την επίπτωση της κληρονομικής αιμοχρωμάτωσης σε ένα μεγάλο πολυφυλετικό δείγμα πληθυσμού στη Β.Αμερική στο πλαίσιο πρωτοβάθμιας περίθαλψης υγείας, η ανεύρεση υπερφερριτιναιμίας στο γενικό πληθυσμό είναι αρκετά συχνή, στην πλειονότητα όμως των περιπτώσεων δεν οφείλεται σε αιμοχρωμάτωση (Adams et al. 2005). Στο σύνολο των 101.168 ατόμων που συμμετείχαν στη μελέτη HEIRS, στο 5,9% των Καυκάσιων βρέθηκε υπερφερριτιναιμία, ενώ μόνο στο 0,44% αυτών (1 στους 200) αναδείχτηκε ομοζυγωτία για τη μετάλλαξη C282Y στο γονίδιο *HFE*.

Φαίνεται λοιπόν ότι η ανεύρεση υπερφερριτιναιμίας στο γενικό πληθυσμό δεν οφείλεται συνήθως σε υπερσυσσώρευση σιδήρου, ακόμα και σε πληθυσμούς όπου η επίπτωση της κληρονομικής αιμοχρωμάτωσης είναι σημαντική. Η αυξημένη φερριτίνη χαρακτηρίζει τις καταστάσεις υπερφόρτωσης σιδήρου, είναι όμως μη ειδικός διαγνωστικός δείκτης για την αιμοχρωμάτωση.

5.1.2 Η σημασία του κορεσμού τρανσφερρίνης στη διαγνωστική προσέγγιση της υπερφερριτιναιμίας

Ο κορεσμός τρανσφερρίνης παίζει κεντρικό ρόλο στη διαγνωστική προσέγγιση της υπερφερριτιναιμίας (βλ. Εισαγωγή 1.2.6). Η αύξηση του κορεσμού τρανσφερρίνης είναι στις περισσότερες περιπτώσεις εύρημα συμβατό με υπερφόρτωση σιδήρου, πρωτοπαθούς ή δευτεροπαθούς αιτιολογίας, ενώ η υπερφερριτιναιμία σε συνδυασμό με φυσιολογικό ή χαμηλό κορεσμό τρανσφερρίνης οφείλεται σε παρουσία χρόνιας φλεγμονής,

δυσμεταβολικού συνδρόμου, χρόνιας ηπατοπάθειας, νόσου της φερροπορτίνης ή HHCS. Σε μελέτη που έγινε σε τρίτοβάθμιο κέντρο αναφοράς, μεταξύ ασθενών με υπερφερριτιναιμία, εξετάστηκε η σχέση μεταξύ του κορεσμού τρανσφερρίνης και της ηπατικής συγκέντρωσης σιδήρου. Οι συγγραφείς καταλήγουν ότι ο κορεσμός τρανσφερρίνης είναι αντιπροσωπευτικός δείκτης της υπερφόρτωσης σιδήρου στα ηπατοκύτταρα κυρίως στους *HFE* C282Y ομοζυγώτες, ενώ ο φυσιολογικός κορεσμός σε συνδυασμό με υπερφερριτιναιμία δεν αποκλείει απαραίτητα την υπερσυσσώρευση σιδήρου (Adams and Burton, 2011).

Ο κορεσμός τρανσφερρίνης χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα μελέτη για τη διαγνωστική προσέγγιση των υπερφερριτιναιμικών ατόμων. Οι ασθενείς με τιμές κορεσμού τρανσφερρίνης άνω του 50% διερευνήθηκαν για πρωτοπαθή ή δευτεροπαθή υπερφόρτωση σιδήρου. Εκείνοι με τιμές κορεσμού κάτω του 45%, και εφόσον είχαν αποκλειστεί τα συνήθη αίτια υπερφερριτιναιμίας (δυσμεταβολικό σύνδρομο, ηπατίτιδες, χρόνια κατανάλωση αλκοόλ, φλεγμονή, νεοπλασία), διερευνήθηκαν για παρουσία σερουλοπλασμιναιμίας, νόσου της φερροπορτίνης ή συνδρόμου υπερφερριτιναιμίας καταρράκτη. Στο 13,8% του συνόλου των ασθενών (12 ασθενείς) ο κορεσμός τρανσφερρίνης ήταν μεγαλύτερος του 50%, αλλά μόνο σε 3 ασθενείς τέθηκε η διάγνωση της κληρονομικής αιμοχρωμάτωσης βάσει του μοριακού ελέγχου. Και οι δύο ομοζυγώτες για τη μετάλλαξη *HFE* C282Y και ο ασθενής με νεανική αιμοχρωμάτωση και μετάλλαξη στο γονίδιο της *HJV* είχαν αυξημένο κορεσμό τρανσφερρίνης. Στους υπόλοιπους ασθενείς, η αύξηση του κορεσμού αποδόθηκε σε δευτεροπαθή υπερσυσσώρευση σιδήρου λόγω δυσερυθροποίησης, μεταγγίσεων ή λήψης σκευασμάτων σιδήρου. Σε έναν ασθενή, στον οποίο διαγνώστηκε σιδήρωση ηπατικού παρεγχύματος στη βιοψία ήπατος, ο κορεσμό τρανσφερρίνης ήταν φυσιολογικός. Ο ασθενής απάντησε σε θεραπεία αποσιδήρωσης.

Ο κορεσμός τρανσφερρίνης σε συνδυασμό με την υπερφερριτιναιμία είναι ένας χρήσιμος δείκτης στη διαγνωστική προσέγγιση της αιμοχρωμάτωσης και έχει μεγάλη ευαισθησία για την *HFE* C282Y ομοζυγωτία. Η ανεύρεση φυσιολογικού κορεσμού τρανσφερρίνης δεν αποκλείει απαραίτητα την ηπατική υπερφόρτωση με σίδηρο.

5.1.3 Η κληρονομική αιμοχρωμάτωση στην Ελλάδα

Η υψηλή φερρίτινη με αυξημένο κορεσμό τρανσφερρίνης (>50%), θέτει στις περισσότερες περιπτώσεις τη βάση για τη διαγνωστική προσέγγιση της κληρονομικής αιμοχρωμάτωσης και τη διενέργεια μοριακού ελέγχου. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *HFE* είναι οι πιο συχνά ανιχνεύσιμες, ενώ μεταλλάξεις στην αιμοτζουβελίνη (*HJV*) και την επιδίνη (*HAMP*) οδηγούν στην ανάπτυξη νεανικής αιμοχρωμάτωσης. Σπάνιες περιπτώσεις κληρονομικής αιμοχρωμάτωσης οφείλονται σε μεταλλάξεις στο γονίδιο της φερροπορτίνης (*FPN1*). Η ασερουλοπλασμιναιμία είναι μια επίσης σπάνια γενετική νόσος με μεταλλάξεις στο γονίδιο *CP*. Χαρακτηρίζεται από φυσιολογικό κορεσμό τρανσφερρίνης, υπερφερριτιναιμία, υπερσυσσώρευση σιδήρου και νευρολογικές διαταραχές (Adams and Barton, 2011).

Η επίπτωση της κληρονομικής αιμοχρωμάτωσης στον ελληνικό πληθυσμό δεν είναι γνωστή και οι περιπτώσεις στην Ελλάδα είναι σπάνιες (Paranikolaou G et al. 2000). Το 50% των περιπτώσεων εμφανίζει νεανική αιμοχρωμάτωση με μεταλλάξεις στο γονίδιο της *HJV* (Pissia et al., 2004). Η *HFE* αιμοχρωμάτωση οφείλεται κυρίως στην μετάλλαξη C282Y, η οποία ανευρέθηκε σε ποσοστό άνω του 50% των ασθενών με κληρονομική *HFE* αιμοχρωμάτωση. (Paranikolaou et al., 2000). Το ποσοστό αυτό είναι πολύ χαμηλότερο από τα αντίστοιχα για αιμοχρωματικούς ασθενείς στη Γαλλία, τις Η.Π.Α αλλά και στην Ιταλία. Η συχνότητα των αλληλίων για τις μεταλλάξεις C282Y και H63D του γονιδίου *HFE* υπολογίστηκαν στο 0,003 και στο 0,145 αντίστοιχα (Paranikolaou et al., 2000). Η συγκεκριμένη μελέτη διεξήχθη σε αιμοχρωματικούς ασθενείς και υγιείς εθελοντές αιμοδότες. Σε μια άλλη ανάλυση 264 υγιών ενηλίκων ελληνικής καταγωγής, η μετάλλαξη C282Y δεν ανιχνεύτηκε καθόλου, ενώ 43 άτομα έφεραν τη μετάλλαξη H63D σε ετεροζυγωτία και 2 σε ομοζυγωτία (Parazoglou et al., 2003). Και αυτή η μελέτη καταλήγει στη σπανιότητα των περιστατικών κληρονομικής αιμοχρωμάτωσης στην Ελλάδα. Επομένως, ο περιορισμένος αριθμός ατόμων με μεταλλάξεις στα γονίδια της αιμοχρωμάτωσης, σε συνδυασμό με τη χαμηλή δυνεισδιτικότητα αυτών των γονιδίων καθιστούν την κληρονομική αιμοχρωμάτωση μια σπάνια νόσο στον ελληνικό πληθυσμό.

Στην παρούσα μελέτη η διάγνωση της αιμοχρωμάτωσης τέθηκε σε 3 ασθενείς (ποσοστό 3,4%). Στους δύο αναδείχθηκε ομοζυγωτία για τη μετάλλαξη C282Y στο γονίδιο *HFE*, ενώ στον τρίτο ομοζυγωτία για την G320V στο γονίδιο *HJV*. Η διάγνωση αιμοχρωμάτωσης σε ποσοστό 3,4% των ασθενών οφείλεται στη στοχευμένη διενέργεια μοριακού ελέγχου σε ασθενείς που έχουν παραπεμφθεί σε τριτοβάθμιο κέντρο αναφοράς για το μεταβολισμό του σιδήρου. Το σύνολο των 87 ασθενών με ασυμπτωματική υπερφερριτταϊμία είναι περιορισμένο και δεν αντικατοπτρίζει το γενικό πληθυσμό. Η ανεύρεση μεταλλάξεων τόσο στο γονίδιο *HFE*, όσο και στη *HJV* είναι σύμφωνη με τα υπάρχοντα στοιχεία της βιβλιογραφίας, το δείγμα όμως των αιμοχρωματικών ασθενών είναι πολύ μικρό.

5.1.4 Συνήθη αίτια υπερφερριτταϊμίας

Οι μελέτες που έχουν διενεργηθεί με οδηγό σημείο τη διερεύνηση της υπερφερριτταϊμίας είναι περιορισμένες. Οι περισσότερες προέρχονται από τριτοβάθμια κέντρα αναφοράς και ο πληθυσμός τους είναι ετερογενής. Μόνο η μελέτη HEIRS (βλ. Συζήτηση 5.1.1) πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο πρωτοβάθμιας περίθαλψης και είναι η μόνη μεγάλη πληθυσμιακή μελέτη μέχρι σήμερα. Παρά την ετερογένεια των πληθυσμών και τη μεροληψία ως προς την παραπομπή των ασθενών στα τριτοβάθμια κέντρα αναφοράς, όλες οι μελέτες, συμπεριλαμβανομένης και της HEIRS, συμφωνούν ότι η υπερφερριτταϊμία είναι πολύ συχνό εύρημα ακόμα και σε εργαστηριακό έλεγχο ρουτίνας. Καταλήγουν ότι η αύξηση της φερριτίνης δεν οφείλεται συνήθως στην υπερσυσσώρευση σιδήρου, αλλά στην παρουσία φλεγμονής, παχυσαρκίας, αυξημένης κατανάλωσης αιθανόλης, δυσμεταβολικού συνδρόμου και ηπατίτιδας.

Η παρούσα μελέτη έγινε σε τριτοβάθμιο κέντρο αναφοράς για νοσήματα του ήπατος και του μεταβολισμού του σιδήρου. Το δείγμα των 87 υπερφερριτταϊμικών ασθενών που εξετάστηκε ήταν ετερογενές (61% άντρες

έναντι 39% γυναίκες, εύρος ηλικιών: 6-79 έτη) και δεν είναι αντιπροσωπευτικό του γενικού πληθυσμού. Τα συνηθέστερα αίτια υπερφερριτιναιμίας και στην παρούσα μελέτη ήταν το δυσμεταβολικό σύνδρομο (33,3%) και η παρουσία φλεγμονής ή νεοπλασίας (23%), ενώ συχνή ήταν η παρουσία θαλασσαιμικών συνδρόμων (13,9%) και η δευτεροπαθής υπερσυσσώρευση σιδήρου. Στην Ελλάδα δεν υπάρχουν αντίστοιχες αναφορές από άλλα κέντρα στο πλαίσιο διερεύνησης της υπερφερριτιναιμίας. Τα συνήθη αίτια αύξησης της φερριτίνης σχολιάζονται στη συνέχεια.

Δυσμεταβολικό Σύνδρομο

Η υπερφερριτιναιμία αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο στη διεθνή βιβλιογραφία ως χαρακτηριστικό του δυσμεταβολικού συνδρόμου και της μη αλκοολικής στεατοηπατίτιδας (NASH). Η αύξηση της φερριτίνης είναι μέτρια και οι τιμές της δεν ξεπερνούν συνήθως τα 1000μg/L, ενώ ο κορεσμός τρανσφερρίνης είναι φυσιολογικός. Οι ακριβείς μηχανισμοί μέσω των οποίων αυξάνει η φερριτίνη στο δυσμεταβολικό σύνδρομο και στη μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος (NAFLD – Non alcoholic fatty liver disease) δεν είναι απόλυτα εξακριβωμένοι, φαίνεται όμως ότι η φλεγμονή παίζει σημαντικό ρόλο, ενώ στην πλειονότητα των περιπτώσεων δεν υπάρχει σημαντική εναπόθεση σιδήρου στο ήπαρ. Παραμένει αμφιλεγόμενο το αν η υπερφερριτιναιμία σχετίζεται με σοβαρότερου βαθμού ηπατική νόσο στη NAFLD και για το αν η μείωση της φερριτίνης μέσω αφαιμάξεων βελτιώνει την πρόγνωση (Beaton and Adams, 2012). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μιας μεγάλης πληθυσμιακής μελέτης που διεξήχθη σε δείγμα 30.000 υγιών γυναικών, φαίνεται ότι η αύξηση της φερριτίνης σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2 (Jiang et al., 2004), ενώ σύμφωνα με τα αποτελέσματα άλλης μελέτης η διάγνωση του μεταβολικού συνδρόμου ήταν σημαντικά συχνότερη σε άτομα με υπερφερριτιναιμία (Jehn et al., 2004). Η απώλεια βάρους, η βελτίωση του λιπιδαιμικού προφίλ, η καλή ρύθμιση του σακχάρου και της αρτηριακής πίεσης παραμένουν οι βασικοί θεραπευτικοί στόχοι για τους ασθενείς με δυσμεταβολικό σύνδρομο.

Στο μεγαλύτερο ποσοστό των ατόμων που διερευνήθηκαν στην παρούσα μελέτη τέθηκε η διάγνωση του δυσμεταβολικού συνδρόμου (33,3%). Η παρουσία του συνδρόμου ήταν πολύ πιο συχνή στους άντρες απ' ότι στις γυναίκες (50,9% των αντρών έναντι 6% των γυναικών). Ο δείκτης μάζας σώματος (BMI) ήταν ανώτερος του φυσιολογικού σε 75% των αντρών έναντι 12% των γυναικών, ενώ υπερτριγλυκεριδαιμία διαπιστώθηκε σε 49% των αντρών έναντι 26% των γυναικών. Φαίνεται, λοιπόν, ότι η παχυσαρκία σε συνδυασμό με υπερτριγλυκεριδαιμία (και όχι με υπερχοληστεριναιμία) συσχετίζεται με υπερφερριτιναιμία, κυρίως στους άντρες. Η λιπώδης διήθηση του ήπατος ήταν συχνό εύρημα στις απεικονιστικές εξετάσεις του συνόλου των ασθενών με δυσμεταβολικό σύνδρομο. Ο κορεσμός τρανσφερρίνης ήταν φυσιολογικός.

Το δυσμεταβολικό σύνδρομο είναι από τις πιο συχνές αιτίες υπερφερριτιναιμίας στο γενικό πληθυσμό και δε χρήζει παραπομπής σε τριτοβάθμιο κέντρο υγείας. Στόχος είναι η έγκαιρη αντιμετώπιση των προδιαθεσικών παραγόντων. Η διόρθωση της υπερφερριτιναιμίας στην αντιμετώπιση του δυσμεταβολικού συνδρόμου παραμένει αμφιλεγόμενη.

Φλεγμονώδεις καταστάσεις - Νεοπλασία - Δευτεροπαθής υπερφόρτωση σιδήρου

Η φερριτίνη είναι πρωτεΐνη οξείας φάσεως και αυξάνει σε καταστάσεις συστηματικής φλεγμονής τουλάχιστον κατά 25%. Στα νεοπλάσματα η υπερφερριτιναιμία οφείλεται σε αυξημένη σύνθεση αποφερριτίνης (ή L φερριτίνης) ή αυξημένη έκκρισή της. Στη δευτεροπαθή υπερφόρτωση σιδήρου η σύνθεση της φερριτίνης αυξάνει προκειμένου να ανταποκριθεί ο οργανισμός στην περίσσεια σιδήρου. Σύμφωνα με μελέτη που έγινε σε τριτοβάθμιο κέντρο υγείας στον Καναδά, σε 363 περιστατικά με μετρίου βαθμού υπερφερριτιναιμία (από 300μg/L έως 1000μg/L), το 17% είχε μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος, το 20% ανέφερε χρόνια κατανάλωση αλκοόλ, στο 7% διαγνώστηκε χρόνια ηπατίτιδα C και στο 2% δευτεροπαθής υπερφόρτωση με σίδηρο (Wong and Adams, 2006). Οι συγγραφείς καταλήγουν στη σημασία αξιολόγησης του ιστορικού και των βασικών εργαστηριακών εξετάσεων πριν

διενεργηθεί βιοψία ήπατος, μοριακός έλεγχος ή μαγνητική τομογραφία ήπατος-καρδιάς, και κυρίως για τους ασθενείς εκείνους που παρουσιάζουν τιμές φερριτίνης έως 1000μg/L. Η μέτρηση της CRP μπορεί να βοηθήσει στη διαπίστωση φλεγμονωδών καταστάσεων. Η ανεύρεση φυσιολογικού ή χαμηλού κορεσμού τρανσφερρίνης είναι συμβατή με την υψηλή εψιδίνη που χαρακτηρίζει τη φλεγμονή, ενώ μπορεί να συνυπάρχει και αναιμία στο πλαίσιο ανάπτυξης αναιμίας χρόνιας νόσου (Camaschella and Poggiali, 2009).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, οι φλεγμονώδεις καταστάσεις και η παρουσία νεοπλασίας (23%), η χρόνια αιμόλυση, τα θαλασσαιμικά σύνδρομα (17,3%) και οι χρόνιες μεταγγίσεις αίματος ήταν βασικά αίτια υπερφερριτιναιμίας σε ποσοστό πάνω από 40% του συνόλου των ασθενών. Στις γυναίκες, και κυρίως στις νεαρές ηλικίες, συχνή αιτία ασυμπτωματικής υπερφερριτιναιμίας ήταν η χρόνια λήψη σιδήρου (ποσοστό 8,1% του συνόλου των ασθενών και 20,5% των γυναικών με υπερφερριτιναιμία). Το ιατρικό ιστορικό σε συνδυασμό με απλές εργαστηριακές εξετάσεις (π.χ. CRP, καρκινικοί δείκτες) έθεσαν στην πλειονότητα των παραπάνω περιπτώσεων τη διάγνωση, με την αποφυγή περαιτέρω χρονοβόρων, ακριβών και μη συμπερασματικών εξετάσεων.

5.1.5 Δυσκολία στη διάγνωση της υπερφερριτιναιμίας

Ορισμένες φορές είναι δύσκολο να προσδιοριστεί το αίτιο της εμμένουσας υπερφερριτιναιμίας. Η ήπια αύξηση στη φερριτίνη είναι πολύ συχνό κλινικό εύρημα και πολλές φορές δύσκολο να αξιολογηθεί. Σε μελέτη που έγινε μεταξύ 363 ατόμων με φερριτίνη μεταξύ 300μg/L και 1000μg/L, στο 13% η υπερφερριτιναιμία δεν αποδόθηκε σε κάποιο συγκεκριμένο αίτιο (Wong and Adams, 2006). Ορισμένες φορές, η συνύπαρξη πολλών διαφορετικών παραγόντων υπερφερριτιναιμίας μπορεί να καθιστά δύσκολη μια σαφή διάγνωση, ενώ σπάνια αίτια υπερφερριτιναιμίας δεν είναι πάντα εύκολο να διαγνωσθούν.

Στην παρούσα μελέτη δεν ανευρέθηκε αίτιο για την εμμένουσα υπερφερριτιναιμία σε 3 ασθενείς. Οι τρεις αυτοί ασθενείς περιγράφονται στο πλαίσιο διερεύνησης των ασθενών που εμφάνιζαν καταρράκτη χωρίς θετικό οικογενειακό ιστορικό. Ο μοριακός έλεγχος που διενεργήθηκε για την παρουσία HHCS ή/και κληρονομικής αιμοχρωμάτωσης ήταν αρνητικός. Για τον ένα ασθενή οι κλινικές πληροφορίες ήταν περιορισμένες και σκόπιμη θα ήταν η αναλυτικότερη προσέγγιση σε συνδυασμό με τα εργαστηριακά δεδομένα.

Ο δεύτερος ασθενής (ασθενής 4) είχε φυσιολογικό κορεσμό τρανσφερρίνης, δεν ανευρέθηκε εναπόθεση σιδήρου στα παρεγχυματικά όργανα και παρουσίασε σχετική μείωση της φερριτίνης μετά από αφαιμάξεις. Η αιτία της υπερφερριτιναιμίας θα μπορούσε να αναζητηθεί σε σπανιότερα αίτια, όπως είναι η καλοήθης υπερφερριτιναιμία (BH - benign hyperferritinemia – βλ. Εισαγωγή 1.2.4). Η BH οφείλεται σε παρανοηματικές μεταλλάξεις στο αμινικό άκρο της L φερριτίνης, οι οποίες οδηγούν στην αυξημένη έκκριση γλυκοζυλιωμένης φερριτίνης στον ορό (Kannengiesser et al., 2009).

Ο τρίτος αδιάγνωστος υπερφερριτιναιμικός ασθενής (ασθενής 5) είχε ήπια αναιμία, φυσιολογικό κορεσμό τρανσφερρίνης και σιδήρωση του ηπατικού παρεγχύματος πρωτοπαθούς αιτιολογίας, σύμφωνα με τη βιοψία ήπατος. Απάντησε σε θεραπεία με αποσιδήρωση (Exjade), ενώ οι αφαιμάξεις είχαν επιδεινώσει την αναιμία χωρίς να μειώσουν την υπερφερριτιναιμία. Είναι πιθανόν ο ασθενής να πάσχει από κάποια σπάνια αιτία κληρονομικής αιμοχρωμάτωσης και συγκεκριμένα από τη νόσο της φερροπορτίνης (αιμοχρωμάτωση τύπου 4α). Σκόπιμη θα ήταν η αναζήτηση μεταλλάξεων στο γονίδιο της φερροπορτίνης μέσω DNA sequencing και η αναλυτικότερη καταγραφή του οικογενειακού ιστορικού. Χρήσιμος θα ήταν και ο προσδιορισμός των επιπέδων εψιδίνης. Η νόσος της φερροπορτίνης είναι μια σπάνια επικρατούσα αυτοσωμική περίπτωση αιμοχρωμάτωσης με φυσιολογικό ή χαμηλό κορεσμό τρανσφερρίνης, αυξημένη φερριτίνη και εναπόθεση σιδήρου στα μακροφάγα, με ή χωρίς αναιμία (Camaschella and Poggiali, 2009).

Ο μοριακός έλεγχος για παρουσία καλοήθους υπερφερριτιναιμίας και νόσου της φερροπορτίνης δεν αποτέλεσε μέρος της παρούσας μελέτης.

5.1.6 Ο ρόλος του μοριακού ελέγχου στη διαγνωστική προσέγγιση της υπερφερριτιναιμίας

Ο μοριακός έλεγχος αποτελεί συχνή εξέταση στη διαγνωστική προσέγγιση της ασυμπτωματικής υπερφερριτιναιμίας (Adams and Burton, 2011). Είναι αρκετά χρήσιμος και διαδεδομένος για τη διάγνωση της HFE αιμοχρωμάτωσης, αλλά για τις σπανιότερες περιπτώσεις διαταραχής του μεταβολισμού του σιδήρου (π.χ. νόσο της φερροπορτίνης), η διενέργεια μοριακού ελέγχου μπορεί να είναι χρονοβόρα, έχει αυξημένο κόστος και συχνά μπορεί να μην καταλήγει σε συμπεράσματα. Πολλές φορές απαιτείται η ανάγνωση της αλληλουχίας των βάσεων (sequencing) ολόκληρου γονιδίου, εφόσον δεν υπάρχει κάποια συγκεκριμένη μέθοδος εμπορικά διαθέσιμη για την ανάδειξη μεταλλάξεων σε όλα τα γονίδια που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του σιδήρου, και ακόμα και στις περιπτώσεις του sequencing τα αποτελέσματα δεν μπορούν πάντα να εκτιμηθούν κλινικά. Η πλειονότητα των μελετών στη διεθνή βιβλιογραφία καταλήγει ότι η διενέργεια μοριακού ελέγχου στο πλαίσιο διάγνωσης της υπερφερριτιναιμίας θα πρέπει να είναι προϊόν συνεκτίμησης της κλινικής εικόνας, του ατομικού και οικογενειακού ιστορικού και των βασικών εργαστηριακών εξετάσεων (π.χ. φερριτίνη, κορεσμός τρανσφερρίνης, αιμοσφαιρίνη).

Στην παρούσα μελέτη διενεργήθηκε μοριακός έλεγχος σε ποσοστό 37% του συνόλου των ασθενών (32 στους 87) στο πλαίσιο διερεύνησης της υπερφερριτιναιμίας. Στο σύνολο των 87 υπερφερριτιναιμικών ασθενών, ο μοριακός έλεγχος ήταν θετικός σε ποσοστό 15%, ενώ στο σύνολο των περιστατικών για τα οποία διενεργήθηκε μοριακός έλεγχος, το ποσοστό με θετικό αποτέλεσμα ήταν 41%. Το υψηλό αυτό ποσοστό οφείλεται στη στοχευμένη διενέργεια μοριακού ελέγχου.

Ο μοριακός έλεγχος αποτελεί χρήσιμο εργαλείο στη διαγνωστική διερεύνηση της υπερφερριτιναιμίας, δεν αφορά όμως το σύνολο των περιστατικών προς διερεύνηση. Έχει νόημα μόνο σε συγκεκριμένες περιπτώσεις οι οποίες θα πρέπει να επιλέγονται σύμφωνα με τα στοιχεία του ιστορικού και τα κλινικοεργαστηριακά ευρήματα.

5.2. Το κληρονομικό σύνδρομο υπερφερριτιναιμίας καταρράκτη (HHCS) στον ελληνικό πληθυσμό

5.2.1 Το HHCS ως αίτιο υπερφερριτιναιμίας

Το κληρονομικό σύνδρομο υπερφερριτιναιμίας καταρράκτη αποτελεί μια σπάνια, αλλά όλο και πιο συχνά αναγνωρίσιμη αιτία ασυμπτωματικής υπερφερριτιναιμίας. Στην παρούσα μελέτη αναγνωρίστηκαν συνολικά 10 περιστατικά με HHCS μεταξύ των 87 υπερφερριτιναιμικών ασθενών που διερευνήθηκαν. Τα 10 περιστατικά με HHCS δε σχετίζονταν συγγενικά μεταξύ τους. Αποτελούν το 11,5% του συνόλου των υπερφερριτιναιμικών ασθενών, ποσοστό αρκετά μεγάλο δεδομένης της σπανιότητας του συνδρόμου. Η επίπτωση του HHCS δεν είναι γνωστή. Η συλλογή στοιχείων για τον υπολογισμό της αληθούς επίπτωσής του σε συγκεκριμένους πληθυσμούς είναι δύσκολη λόγω της σπανιότητας των περιστατικών (βλ. και Εισαγωγή 1.3.5). Σε μια πληθυσμιακή μελέτη που έγινε στην Αυστραλία υπολογίστηκε ότι η ελάχιστη επίπτωση του συνδρόμου είναι περίπου 1: 200000 του γενικού πληθυσμού (Craig et al., 2003). Μια ομάδα από τη βόρεια Ιταλία (Bozzini et al., 2003) εξέτασε πάνω από 3000 αιμοδότες και σχεδόν 13000 ασθενείς με καταρράκτη. Ο μοριακός έλεγχος που πραγματοποιήθηκε στις περιπτώσεις που πληρούσαν κάποιο από τα κριτήρια του HHCS (υπερφερριτιναιμία και/ή νεανικό καταρράκτη) ήταν αρνητικός για μεταλλάξεις στο IRE του *FTL*. Το HHCS είναι σπάνιο και για τον υπολογισμό της επίπτωσης χρειάζεται πολύ μεγάλο δείγμα πληθυσμού. Συγχρόνως, η πιθανή ύπαρξη μεταλλάξεων χαμηλής διεισδυτικότητας στο IRE, δυσχεραίνει ακόμα περισσότερο τις επιδημιολογικές μελέτες και κάποια περιστατικά θα περάσουν απαρατήρητα.

Το Ηπατολογικό Ιατρείο της Α΄ Παθολογικής Κλινικής του Λαϊκού Νοσοκομείου αποτελεί τριτοβάθμιο κέντρο αναφοράς για νοσήματα μεταβολισμού του σιδήρου και επομένως υπάρχει μεροληψία ως προς την παραπομπή συγκεκριμένων περιστατικών. Η ανεύρεση HHCS σε 11,5% των ασθενών οφείλεται τόσο στο επιλεγμένο δείγμα υπερφερριτιναιμικού πληθυσμού, όσο και στη μεροληπτική παραπομπή των περιστατικών στο

Ηπατολογικό Ιατρείο. Το HHCS δεν είναι σύνηθες αίτιο υπερφερριτιανιμίας, είναι όμως σημαντικό να αναγνωρίζεται μεταξύ των υπερφερριτιναιμικών ασθενών.

Στην παρούσα μελέτη, από τα 10 περιστατικά με HHCS, τα 7 είχαν θετικό οικογενειακό ιστορικό. Συνολικά, αναγνωρίστηκαν 34 άτομα με HHCS μεταξύ των μελών των οικογενειών και των περιστατικών που εξετάστηκαν. Στο πλαίσιο της διερεύνησης πραγματοποιήθηκε μοριακός έλεγχος που ανέδειξε δύο διαφορετικές μεταλλάξεις σε ετεροζυγωτία. Η παρούσα μελέτη αποτελεί μια σημαντική συλλογή κλινικών και γενετικών πληροφοριών για το HHCS στην Ελλάδα.

5.2.2 Το HHCS χαρακτηρίζεται από φαινοτυπική ετερογένεια.

Το HHCS χαρακτηρίζεται από φαινοτυπική ετερογένεια, όπως προκύπτει από την πλειονότητα των βιβλιογραφικών αναφορών, αλλά και από την παρούσα μελέτη. Η ηλικία διάγνωσης του συνδρόμου, η ηλικία εμφάνισης του καταρράκτη και η εξέλιξή του, καθώς και οι τιμές της φερριτίνης παρουσιάζουν διακυμάνσεις μεταξύ των ασθενών με HHCS (Girelli et al., 2011).

5.2.2.1 Ηλικία διάγνωσης του HHCS

Στην παρούσα μελέτη ο μικρότερος ασθενής διαγνώστηκε σε ηλικία 3 ετών (μέλος IV-1, Οικογένεια 6) και η μεγαλύτερη σε ηλικία 75 (μέλος I-2, Οικογένεια 2), με διάμεση ηλικία διάγνωσης για όλους τους ασθενείς στα 37 έτη. Η διάγνωση των ασθενών έγινε είτε μετά από τυχαία ανεύρεση υπερφερριτιναιμίας, είτε μετά από διάγνωση ενός συγγενικού προσώπου με HHCS και για το λόγο αυτό πιο αντιπροσωπευτικές θεωρούνται οι ηλικίες των ατόμων δεικτών. Μεταξύ των τελευταίων, η μικρότερη ηλικία διαπίστωσης της υπερφερριτιναιμίας ήταν και πάλι τα 3 έτη, ενώ η μεγαλύτερη τα 55 (II-8, Οικογένεια 3).

Από τα βιβλιογραφικά δεδομένα προκύπτει επίσης μεγάλη ετερογένεια ως προς την ηλικία διάγνωσης. Μεταξύ 14 οικογενειών από την Ιταλία, το νεαρότερο άτομο δείκτης είχε ηλικία 12 ετών, ενώ το μεγαλύτερο 65 (Girelli et al., 2011). Η μικρότερη ασθενής που έχει διαγνωσθεί με HHCS, ήταν 12 μηνών την περίοδο της διάγνωσης (Ruchow et al., 2009), ενώ δεν είναι λίγα τα περιστατικά που διαγνώστηκαν σε βρεφική και παιδική ηλικία. Επομένως, η διαφορική διάγνωση της υπερφερριτιναιμίας ή του καταρράκτη σε παιδιατρικούς ασθενείς θα πρέπει να συμπεριλαμβάνει το HHCS.

5.2.2.2 Τιμές φερριτίνης στο HHCS

Στην παρούσα μελέτη οι τιμές της φερριτίνης ήταν άνω των 650 μg/L σε όλες τις περιπτώσεις με HHCS, ενώ περισσότερο από το 65% των ασθενών είχε φερριτίνη άνω των 1000 μg/L. Η μικρότερη τιμή φερριτίνης που σημειώθηκε ήταν 667 μg/L και η μεγαλύτερη 2070 μg/L. Διακυμάνσεις στις τιμές της φερριτίνης παρατηρήθηκαν τόσο μεταξύ ασθενών με διαφορετικές μεταλλάξεις, όσο και μεταξύ ατόμων με την ίδια μετάλλαξη, είτε ανήκαν στην ίδια οικογένεια, είτε όχι. Στην Οικογένεια 2, το μέλος I-2 είχε φερριτίνη 1388 μg/L, ενώ το μέλος II-2 είχε 770 μg/L. Ο ασθενής II-1 της Οικογένειας 5 είχε φερριτίνη 1200 μg/L, ενώ η ασθενής 3 (χωρίς θετικό οικογενειακό ιστορικό) που έφερε την ίδια μετάλλαξη (A40G) είχε 909 μg/L. Στη βιβλιογραφία, αναφέρονται τιμές φερριτίνης για άτομα με HHCS από τα ανώτερα φυσιολογικά όρια έως και 6000 μg/L (Craig et al., 2003).

Διακυμάνσεις στις τιμές της φερριτίνης παρατηρήθηκαν ακόμα και για τον ίδιο ασθενή σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Το άτομο δείκτης της Οικογένειας 5 σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές είχε φερριτίνη 1338 μg/L και 1733 μg/L. Παρόμοιες παρατηρήσεις αναφέρονται και από άλλους ερευνητές (Girelli et al., 2011). Πιθανόν οφείλονται σε συνυπάρχοντες παράγοντες υπερφερριτιναιμίας, όπως η παρουσία λοίμωξης ή φλεγμονής, ή οι διακυμάνσεις στα επίπεδα σιδήρου του οργανισμού. Διαφορές στην ευαισθησία των μεθόδων ποσοτικής μέτρησης της φερριτίνης έχουν παρατηρηθεί μεταξύ διαφορετικών εργαστηριών, γεγονός που μπορεί να

συμβάλλει στην ετερογένεια μεταξύ των μετρήσεων και κυρίως για τιμές που αφορούν στο ίδιο άτομο.

5.2.2.3 Καταρράκτης στο HHCS

Παρατηρείται φαινοτυπική ετερογένεια στην ηλικία εμφάνισης, στο χρόνο εξέλιξης και στη μορφολογία του καταρράκτη στο HHCS (Girelli et al., 2001). Σύμφωνα με τα διεθνή βιβλιογραφικά δεδομένα η πλειοψηφία του καταρράκτη εμφανίζεται πριν την ηλικία των 40 ετών (Ferrante et al., 2005). Η διάγνωση του καταρράκτη σε παιδική και βρεφική ηλικία έχει αναφερθεί σε πολλές μελέτες (Craig et al., 2003, Alvarez-Coca-Gonzalez et al., 2010, Serra et al., 2011), η πλειονότητα όμως των περιστατικών παρουσιάζει μείωση της οπτικής οξύτητας και εμφάνιση του καταρράκτη κατά τη δεύτερη και τρίτη δεκαετία της ζωής. Ο καταρράκτης παρόλο που έχει κατά περιπτώσεις χαρακτηριστεί ως συγγενής, φαίνεται μάλλον να είναι επίκτητος, και πολλές φορές δεν ανευρίσκεται σε περιστατικά που έχουν διαγνωσθεί με το σύνδρομο σε βρεφική ή παιδική ηλικία. Σε περιοδική παρακολούθηση με φωτογραφίες, διαπιστώθηκε ότι οι καταρράκτες στο HHCS δεν είναι στατικοί και αναγνωρίστηκε η προοδευτική επιδείνωσή τους (Craig et al., 2003).

Στην παρούσα μελέτη, το 50% των ασθενών με HHCS εμφάνισε καταρράκτη πριν την ηλικία των 40 ετών, ενώ η παρουσία του διαπιστώνεται ακόμα και από ηλικίες 5 (IV-6, Οικογένεια 1) και 10 ετών (IV-2, Οικογένεια 1). Στην περίπτωση όμως της τετράχρονης ασθενούς (III-1) στην Οικογένεια 4, δεν ανευρέθηκαν στοιχεία καταρράκτη κατά την περίοδο της διερεύνησης, και παρά την παρουσία της μετάλλαξη C39G και σοβαρού βαθμού υπερφερριτιναιμίας (>1000 µg/L). Στην Οικογένεια 5, το άτομο δείκτης (I-1) δεν είχε ακόμα υποβληθεί σε εγχείρηση αποκατάστασης φακού, ενώ ο γιός της (II-1) είχε εγχειριστεί για καταρράκτη από την ηλικία των 26 ετών. Μια άλλη ασθενής (Ασθενής 3), που φέρει την ίδια μετάλλαξη με τους πάσχοντες της Οικογένειας 5 (A40G), δεν είχε εγχειριστεί για καταρράκτη στην ηλικία των 29 ετών.

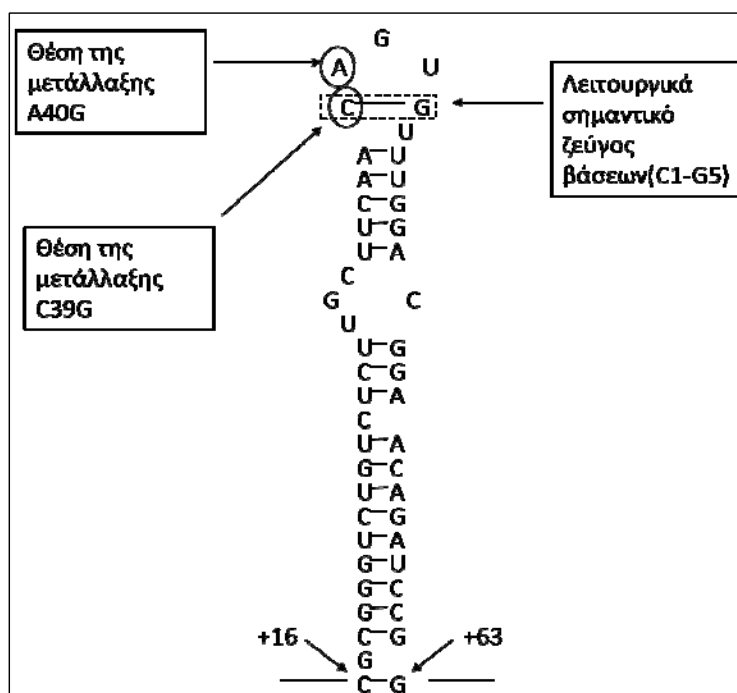
Φαίνεται ότι τόσο η ηλικία εμφάνισης του καταρράκτη, όσο και η ηλικία επέμβασης διαφέρουν ακόμα και σε άτομα με την ίδια μετάλλαξη, είτε ανήκουν στην ίδια οικογένεια, είτε όχι. Αυτή η κλινική ετερογένεια υποδηλώνει ότι, εκτός από το γονότυπο του IRE της L φερριτίνης, και άλλοι συνυπάρχοντες γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες συμβάλλουν στη δημιουργία και την εξέλιξη του καταρράκτη στο HHCS. Περιβαλλοντικοί παράγοντες που ενοχοποιούνται στην εμφάνιση καταρράκτη είναι το κάπνισμα, η διατροφή, τα επίπεδα οιστρογόνων και η ηλιακή ακτινοβολία, ενώ μεταλλάξεις σε γονίδια χαμηλής διεισδυτικότητας, όπως αυτά που εμπλέκονται στο γεροντικό καταρράκτη, πιθανόν να επηρεάζουν το βαθμό σοβαρότητας και εξέλιξης του καταρράκτη στο HHCS (Girelli et al., 2001, Livingston et al., 1995).

5.2.3 Η γενετική βάση του HHCS στον ελληνικό πληθυσμό

5.2.3.1 Μεταλλάξεις στο HHCS σε Έλληνες ασθενείς

Οι δύο μεταλλάξεις που ανευρέθηκαν μεταξύ των περιστατικών με HHCS είναι η C39G και η A40G. Η C39G έχει ήδη αναφερθεί σε Έλληνες ασθενείς (Paranikolaou et al., 2006), ενώ η A40G περιγράφεται για πρώτη φορά στον ελληνικό πληθυσμό στην παρούσα μελέτη. Και οι δύο μεταλλάξεις εδράζονται στον καλά συντηρημένο εξανουκλεοτιδικό βρόγχο του IRE (5'-CAGUGN-3') στις θέσεις 39 και 40 (βλ. Εικόνα 5.1). Προκαλούν αναδιάταξη των δεσμών μεταξύ των νουκλεοτιδικών βάσεων στο βρόγχο και οδηγούν σε δομικές και στερεοτακτικές αλλαγές. Τα σημεία πρόσδεσης των πρωτεϊνών IRP στο IRE τροποποιούνται και η συγγένεια μεταξύ των δύο μειώνεται, με αποτέλεσμα την ανεξέλεγκτη μετάφραση της L φερριτίνης (Beaumont et al., 1995, Cicilano et al., 1999, Paranikolaou et al., 2006). Και οι δύο μεταλλάξεις έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία ως παθογνωμονικές του HHCS. Η C39G αναφέρεται πρώτη φορά το 2004 στο Παρίσι (Garderet et al., 2004) και η A40G είναι μια από τις πρώτες μεταλλάξεις που αναγνωρίστηκαν και είναι γνωστή και ως "Paris 1" (Beaumont et al., 1995).

Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί διεθνώς 37 διαφορετικές μεταλλάξεις που σχετίζονται με το HHCS (Luscietti et al., 2013). Από αυτές, 31 είναι σημειακές και 6 είναι εξαλείψεις βάσεων. Η γενετική ετερογένεια που παρουσιάζει το HHCS υποδηλώνει ότι δεν έχει μια μοναδική γενετική προέλευση (Mikulits et al., 1999).



Εικόνα 5.1. Σχηματική απεικόνιση του IRE στο mRNA της L φερριτίνης. Τα βέλη δείχνουν τις θέσεις των ανευρεθείσων μεταλλάξεων C39G και A40G, καθώς και το δεσμό μεταξύ των βάσεων στις θέσεις 1 και 5 του εξανουκλεοτιδικού βρόγχου.

5.2.3.2 Γεωγραφική κατανομή των περιστατικών με HHCS στην Ελλάδα

Τρεις από τις οικογένειες που περιγράφονται στην παρούσα μελέτη έχουν καταγωγή από τη Δυτική Ελλάδα, ενώ 2 άλλες από την Κεντρική, και συγκεκριμένα από την περιοχή της Καρδίτσας. Και στις 5 αυτές οικογένειες ανευρέθηκε η μετάλλαξη C39G. Δεδομένου ότι οι περιοχές αυτές συνορεύουν και δεδομένης της απουσίας συγγένειας μεταξύ των οικογενειών αυτών, θα μπορούσε κανείς να υποθέσει ότι η παρουσία της μετάλλαξης C39G οφείλεται

σε κάποιον κοινό πρόγονο. Δεν παρατηρήθηκε αντίστοιχη γεωγραφική γειννίαση για τα περιστατικά με τη μετάλλαξη A40G.

5.2.3.3 Συσχέτιση γονοτύπου - φαινοτύπου

Έχει παρατηρηθεί από πολλούς ερευνητές ότι μεταλλάξεις που εδράζονται στο βρόγχο του IRE σχετίζονται με μεγαλύτερου βαθμού υπερφερριτιναιμία (1000-1500 $\mu\text{g/L}$) και σοβαρότητας του καταρράκτη, ενώ μεταλλάξεις που βρίσκονται στα 2 στελέχη της δομής του οδηγούν σε ηπιότερες καταστάσεις υπερφερριτιναιμίας (500 $\mu\text{g/L}$) και υποκλινικούς καταρράκτες (Cazzola et al., 1997, Allerson et al., 1999). Συγχρόνως όμως, σε άλλες μελέτες δεν έχει διαπιστωθεί κάποιος καθαρός συσχετισμός μεταξύ μετάλλαξης και βαθμού υπερφερριτιναιμίας ή καταρράκτη (Craig et al., 2003), όπως επίσης και μεταξύ βαθμού υπερφερριτιναιμίας και βαθμού σοβαρότητας των οφθαλμολογικών ευρημάτων. Η σημαντική φαινοτυπική ετερογένεια που χαρακτηρίζει το σύνδρομο ενισχύει την απουσία συσχετισμού μεταξύ γονοτύπου και κλινικής εικόνας.

Στην παρούσα μελέτη, και οι δύο ανευρεθείσες μεταλλάξεις εδράζονται στο βρόγχο του IRE. Το γεγονός ότι πάνω από το 50% των ασθενών με HHCS είχε φερριτίνη μεγαλύτερη των 1000 $\mu\text{g/L}$, ενώ όλα τα περιστατικά είχαν φερριτίνη πάνω από 650 $\mu\text{g/L}$, ενισχύει τη σχέση μεταξύ μετάλλαξης και βαθμού υπερφερριτιναιμίας. Το μεγάλο όμως εύρος διακύμανσης των τιμών της φερριτίνης, όπως π.χ. φαίνεται μεταξύ των μελών της Οικογένειας 1 (από 667 έως 2070 $\mu\text{g/L}$) και της Οικογένεια 2 (από 770 έως 1388 $\mu\text{g/L}$), καθώς και η διάγνωση καταρράκτη σε ηλικίες από 5 έως 49 ετών και 12 έως 60 ετών αντίστοιχα για τις δύο αυτές οικογένειες, θέτουν σε αμφισβήτηση τη συσχέτιση μεταξύ γονοτύπου και φαινοτύπου στο HHCS.

5.2.3.4 Οικογενείς και *de novo* μεταλλάξεις στο HHCS

Το HHCS βασίζεται στον επικρατούντα αυτοσωμικό τρόπο κληρονόμησης και τα περισσότερα περιστατικά που αναγνωρίζονται έχουν

θετικό κληρονομικό ιστορικό για υπερφερριτιναιμία και καταρράκτη. Αν και οι περισσότερες μεταλλάξεις είναι οικογενείς, έχουν περιγραφεί και *de novo* περιπτώσεις (Arosio et al., 1999, Craig et al., 2003). Στην παρούσα μελέτη 7 από τα 10 περιστατικά είχαν θετικό οικογενειακό ιστορικό, ενώ για τα υπόλοιπα 3 δεν υπήρχαν αντίστοιχα στοιχεία. Για τους 2 από τους 3 ασθενείς χωρίς θετικό οικογενειακό ιστορικό, τα κλινικά στοιχεία ήταν περιορισμένα, οπότε δεν μπορεί να αποκλειστεί η παρουσία οικογενούς μετάλλαξης. Αντίθετα, για την ασθενή 2 (βλ. Πίνακα 4.9) δεν αναφέρονταν στοιχεία στους συγγενείς πρώτου βαθμού συμβατά με το σύνδρομο. Η ανευρεθείσα μετάλλαξη C39G θα μπορούσε να είναι μια *de novo* περίπτωση, γεγονός που θα πρέπει να πιστοποιηθεί με περαιτέρω μοριακό έλεγχο.

5.2.4 Διάγνωστικοί και θεραπευτικοί χειρισμοί στο HHCS

5.2.4.1 Διαγνωστική προσέγγιση του ασθενή με πιθανό HHCS

Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα και τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, οι περισσότεροι ασθενείς με HHCS παραπέμπονται σηνύθως λόγω εμμένουσας υπερφερριτιναιμίας και υποψίας πιθανής αιμοχρωμάτωσης. Η διάγνωση του HHCS βασίζεται στην παρουσία υπερφερριτιναιμίας με καταρράκτη, σε συνδυασμό με την ανεύρεση μετάλλαξης στην περιοχή του IRE του γονιδίου *FTL*.

Στο πλαίσιο της διαγνωστικής προσέγγισης του ασθενή με πιθανό HHCS θα πρέπει μαζί με την υπερφερριτιναιμία να επιβεβαιωθεί η παρουσία καταρράκτη ή η εγχείρηση για αποκατάσταση φακού στο παρελθόν. Σε ορισμένες περιπτώσεις ο καταρράκτης μπορεί να μην έχει ακόμα εκδηλωθεί την περίοδο της διερεύνησης. Κατά την οφθαλμολογική εξέταση απαιτείται καλή μυδρίαση και ενημέρωση του οφθαλμιάτρου για την πιθανότητα αρχόμενου περιφερικού καταρράκτη. Το θετικό οικογενειακό ιστορικό για παρουσία υπερφερριτιναιμίας και καταρράκτη ενισχύει τη διάγνωση, άτομα όμως που δεν έχουν θετικό οικογενειακό ιστορικό δε θα πρέπει να

αποκλείονται του μοριακού ελέγχου λόγω της πιθανότητας *de novo* μετάλλαξης.

Από τον εργαστηριακό έλεγχο δεν αναμένεται κάτι παθολογικό εκτός από την αυξημένη φερριτίνη. Ο μεταβολισμός του σιδήρου δεν επηρεάζεται στο HHCS και επομένως ο σίδηρος ορού και ο κορεσμός τρανσφερρίνης παραμένουν εντός φυσιολογικών ορίων, εκτός αν συνυπάρχει υπερφόρτωση με σίδηρο ή σιδηροπενία. Δεδομένου ότι η ανεύρεση υπερφερριτιναιμίας είναι σε κάποιες περιπτώσεις πολυπαραγοντικό αποτέλεσμα, η διενέργεια βασικών εργαστηριακών εξετάσεων κρίνεται σκόπιμη προς αποκλεισμό συνυπάρχουσων παθολογικών καταστάσεων που συμβάλλουν στην αύξηση της φερριτίνης (π.χ. φλεγμονή).

5.2.4.2 Ο ρόλος του μοριακού ελέγχου στη διαγνωστική προσέγγιση του HHCS

Για την διάγνωση του HHCS απαιτείται η ανάδειξη μεταλλάξεων στο IRE του γονιδίου *FTL*. Για τους ασθενείς που πληρούν τα κλινικοεργαστηριακά κριτήρια του συνδρόμου, η διενέργεια μοριακού ελέγχου είναι το επόμενο βήμα στη διερεύνηση πιθανού HHCS. Ο μοριακός έλεγχος παίζει πρωταγωνιστικό ρόλο στη διαγνωστική προσέγγιση του συνδρόμου και η παρουσία μεταλλαγμένου IRE είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την τελική διάγνωση.

Στην παρούσα μελέτη για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο IRE χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι της ανάγνωσης της πρωτοταγούς αλληλουχίας των βάσεων του DNA (sequencing) και του πολυμορφισμού μήκους θραυσμάτων εκ περιορισμού (RFLP). Στην πλειονότητα των περιπτώσεων έγινε sequencing του IRE. Παράλληλα, προτυπώθηκε και χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος RFLP για την ανίχνευση της μετάλλαξης C39G, η οποία ήταν και η πιο συχνά ανευρεθείσα μετάλλαξη μεταξύ των Ελλήνων ασθενών. Η μέθοδος RFLP αποτελεί ένα γρήγορο, εύκολο και οικονομικό τρόπο ανίχνευσης για συγκεκριμένες μεταλλάξεις στο IRE και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρώτο βήμα στο μοριακό έλεγχο σε συγκεκριμένους πληθυσμούς. Η μέθοδος του sequencing, αν και είναι πιο χρονοβόρα και οικονομικά πιο επιβαρυντική, έχει

τη δυνατότητα ανίχνευσης για όλες τις πιθανές μεταλλάξεις στο IRE και είναι ο μόνος τρόπος αναγνώρισης νέων μεταλλάξεων. Και οι δύο μέθοδοι είναι αξιόπιστες, η προτύπωσή τους είναι σχετικά εύκολη και τα αποτελέσματά τους αναπαραγώγιμα.

5.2.4.3 Θεραπευτικοί χειρισμοί στο HHCS

Το σύνδρομο υπερφερριτιναιμίας καταρράκτη δεν χρήζει θεραπείας, παρά μόνο οφθαλμολογικής παρακολούθησης και εγχείρησης για καταρράκτη (Cazzola et al., 2002, Paranikolaou et al., 2006). Η υπερφερριτιναιμία δε θα πρέπει να διορθώνεται, παρά μόνο στη συνύπαρξη υπερφόρτωσης σιδήρου ή άλλης παθολογικής κατάστασης, όπως είναι π.χ. το δυσμεταβολικό σύνδρομο. Άτομα με HHCS στα οποία λανθασμένα τέθηκε η διάγνωση της αιμοχρωμάτωσης και υποβλήθηκαν σε θεραπευτικές αφαιμάξεις, ανέπτυξαν πολύ γρήγορα σιδηροπενική αναιμία (Barton et al., 1998, Simsek et al., 2003). Είναι σημαντικός ο εφησυχασμός του ασθενή και η σωστή ενημέρωση σχετικά με το αίτιο της υπερφερριτιναιμίας, προκειμένου να αποφεύγονται περιττές διαγνωστικές παρεμβάσεις και πιθανοί επιβλαβείς θεραπευτικοί χειρισμοί. Σημαντική είναι και η ενημέρωση σχετικά με την κληρονομική φύση του συνδρόμου και η αναγνώρισή του και στα υπόλοιπα μέλη της εκάστοτε οικογένειας. Τέλος, όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, η παρουσία καταρράκτη σε συνδυασμό με υπερφερριτιναιμία δεν οφείλεται απαραίτητα στο HHCS. Η παρουσία καταρράκτη είναι αρκετά συχνή, κυρίως σε μεγαλύτερες ηλικίες και η σύγχρονη ανεύρεση υπερφερριτιναιμίας μπορεί να αποτελεί τυχαίο εύρημα. Η αδυναμία ανάδειξης μεταλλάξεων στο IRE απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση της υπερφερριτιναιμίας.

5.2.4.4 Σιδηροπενία και HHCS

Στο HHCS η φερριτίνη παραμένει αυξημένη ακόμα και σε καταστάσεις σιδηροπενίας. Η απώλεια της ρύθμισής της ανάλογα με τα ενδοκυττάρια επίπεδα σιδήρου μέσω του συστήματος IRE/IRP οδηγεί στην ανεξέλεγκτη παραγωγή της και επομένως η φερριτίνη παύει να είναι αντιπροσωπευτικός

δείκτης των αποθηκών σιδήρου του οργανισμού. Το πρόβλημα παρουσιάζεται σε καταστάσεις συνύπαρξης HHCS και σιδηροπενίας, στις οποίες η χρήση της φερριτίνης δεν αποτελεί διαγνωστικό εργαλείο. Για την εκτίμηση των επιπέδων σιδήρου, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης, ο δείκτης MCV και ο κορεσμός τρανσφερρίνης. Στην παρούσα μελέτη, σε δύο περιστατικά (III-6, Οικογένεια 1 και III-8, Οικογένεια 7) διαγνώστηκε σιδηροπενική αναιμία. Και οι δύο ασθενείς είχαν υπόχρωμη μικροκυτταρική αναιμία, χαμηλό κορεσμό τρανσφερρίνης και υπερφερριτιναιμία.

Έχει αναφερθεί ότι άτομα με HHCS έχουν την τάση να αναπτύσσουν σιδηροπενία πιο γρήγορα σε σχέση με το γενικό πληθυσμό, ακόμα και ως συνέπεια ήπιων αιτιών απώλειας ή αναγκών αίματος (π.χ. αιμοδοσία, εγκυμοσύνη) (Girelli et al., 2001). Μελέτες σε λεμφοβλάστες από άτομα με HHCS έδειξαν συσσώρευση μη λειτουργικών H_oL₂₄ ομοπολυμερών, και μια μετατόπιση των ισομερών της φερριτίνης προς μόρια πλούσια σε L φερριτίνη, με μείωση του ποσοστού της H υπομονάδας (Levi et al., 1998). Η βαριά άλυσος (H φερριτίνη) είναι απαραίτητη για τη δέσμευση του σιδήρου στο μόριο της φερριτίνης λόγω της δράσης της ως σιδηροξειδάσης, και η αποθήκευση του σιδήρου εξαρτάται από την παρουσία της (Levi et al., 1994). Η τροποποίηση των αναλογιών των δύο υπομονάδων στο HHCS πιθανότατα μειώνει την απόδοση στην αποθήκευση σιδήρου σε σχέση με τον υγιή πληθυσμό.

Επομένως, τα άτομα με HHCS είναι πιο επιρρεπή στην ανάπτυξη σιδηροπενίας, ενώ συγχρόνως η σιδηροπενία είναι εύκολο να περάσει απαρατήρητη. Κρίνεται λοιπόν σκόπιμη η παρακολούθηση των ασθενών με HHCS με τακτική γενική αίματος και υπολογισμό του κορεσμού τρανσφερρίνης.

5.2.4.5 Ευαισθητοποίηση για το HHCS

Η ενημέρωση του κλινικού γιατρού για το HHCS στο πλαίσιο διερεύνησης της ασυμπτωματικής υπερφερριτιναιμίας, με σκοπό τη σωστή

διαγνωστική προσέγγιση και παραπομπή των περιστατικών για μοριακό έλεγχο, αποτέλεσε μέρος της παρούσας εργασίας. Μέσω της προφορικής, γραπτής και ηλεκτρονικής επικοινωνίας με τους συναδέλφους από διάφορα μέρη της Ελλάδας, ελπίζουμε ότι ως ομάδα καταφέραμε να συμβάλλουμε στην ενημέρωση και ευαισθητοποίηση σχετικά με το κληρονομικό σύνδρομο υπερφερριτιναιμίας καταρράκτη.

6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ανεύρεση υψηλής φερριτίνης ορού αποτελεί συχνό εύρημα σε εργαστηριακό έλεγχο ρουτίνας. Η διερεύνηση της ασυμπτωματικής υπερφερριτιναιμίας είναι συχνή αιτία παραπομπής ασθενών σε τριτοβάθμια Νοσοκομεία. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων οι ασθενείς παραπέμπονται λόγω υποψίας αιμοχρωμάτωσης, χωρίς να έχουν πρώτα αποκλειστεί συνηθέστερα αίτια υπερφερριτιναιμίας που δε σχετίζονται με το μεταβολισμό του σιδήρου. Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η φαινοτυπική και γενετική διερεύνηση ασθενών με ασυμπτωματική υπερφερριτιναιμία που προσήλθαν ή παραπέμφθηκαν στο Ηπατολογικό Ιατρείο της Α' Παθολογικής Κλινικής του ΓΝΑ «Λαϊκό» το διάστημα 06.2005 έως 12.2012.

Συνολικά μελετήθηκαν 87 ασθενείς με ασυμπτωματική υπερφερριτιναιμία. Για όλα τα περιστατικά έγινε καταγραφή του ιστορικού, των κλινικών ευρημάτων και του εργαστηριακού ελέγχου. Ο κορεσμός τρανσφερρίνης χρησιμοποιήθηκε για την αναγνώριση των ασθενών με υπερφόρτωση σιδήρου. Ο μοριακός έλεγχος διενεργήθηκε βάσει του ιστορικού και των κλινικοεργαστηριακών ευρημάτων. Σε περισσότερο από το 70% των ασθενών η υπερφερριτιναιμία αποδόθηκε σε αίτια που δε σχετίζονταν με πρωτοπαθή ή δευτεροπαθή υπερσυσσώρευση σιδήρου, ενώ μόνο σε 3 περιπτώσεις (ποσοστό 3,4%) διαγνώστηκε κληρονομική αιμοχρωμάτωση. Τα συνηθέστερα αίτια υπερφερριτιναιμίας ήταν το δυσμεταβολικό σύνδρομο (33,3%) και η παρουσία φλεγμονής ή νεοπλασίας (23%), ενώ συχνή ήταν η παρουσία δυσερυθροποίησης (17,3%) και η δευτεροπαθής υπερσυσσώρευση σιδήρου λόγω εξωγενούς χορηγήσεως (8,1%). Μοριακός έλεγχος διενεργήθηκε στο 37% του συνόλου των ασθενών και ήταν θετικός στο 41% των περιστατικών που ελέγχθηκαν μοριακά.

Από την παρούσα καταγραφή προκύπτει ότι η ασυμπτωματική υπερφερριτιναιμία δεν οφείλεται συνήθως σε υπερσυσσώρευση σιδήρου. Το υποκείμενο αίτιο θα πρέπει πρώτα να αναζητηθεί στην παρουσία φλεγμονής, παχυσαρκίας, δυσμεταβολικού νοσήματος, νεοπλασίας και δευτεροπαθούς

υπερφόρτωσης με σίδηρο. Η φερριτίνη είναι ένας μη ειδικός δείκτης. Η διαγνωστική προσέγγιση των υπερφερριτιναιμικών ατόμων θα πρέπει να βασίζεται στο ιστορικό, την κλινική εξέταση και σε απλές εργαστηριακές εξετάσεις, όπως π.χ. οι δείκτες φλεγμονής. Ο κορεσμός τρανσφερρίνης είναι ένας χρήσιμος δείκτης για την υπερφόρτωση σιδήρου και κυρίως στις περιπτώσεις της κληρονομικής HFE αιμοχρωμάτωσης. Ο μοριακός έλεγχος αποτελεί χρήσιμο εργαλείο στη διαγνωστική διερεύνηση της υπερφερριτιναιμίας, έχει όμως νόημα μόνο σε συγκεκριμένες περιπτώσεις οι οποίες θα πρέπει να επιλέγονται βάσει του ιστορικού και των κλινικοεργαστηριακών ευρημάτων

Μια σπάνια αλλά όλο και πιο αναγνωρίσιμη αιτία ασυμπτωματικής υπερφερριτιναιμίας είναι το κληρονομικό σύνδρομο υπερφερριτιναιμίας καταρράκτη (Hereditarry Hyperferritinemia Cataract Syndrome - HHCS). Πρόκειται για μια σπάνια επικρατούσα αυτοσωμική νόσο που χαρακτηρίζεται από υπερφερριτιναιμία, ανεξαρτήτως των επιπέδων σιδήρου, και εμφάνιση αμφοτερόπλευρου καταρράκτη σε νεαρή ηλικία. Το HHCS οφείλεται σε μεταλλάξεις στο σιδηροαποκριτικό στοιχείο (iron responsive element – IRE) του γονιδίου *FTL*, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την απώλεια της μετα-μεταγραφικής ρύθμισης της L φερριτίνης μέσω του συστήματος IRE/IRP. Οι σιδηρορυθμιστικές πρωτεΐνες (iron regulatory proteins – IRP) έχουν μειωμένη συγγένεια για το μεταλλαγμένο IRE και η αδυναμία πρόσδεσής τους σε αυτό οδηγεί στην ανεξέλεγκτη παραγωγή L φερριτίνης ανεξαρτήτως των επιπέδων σιδήρου. Το HHCS περιγράφεται για πρώτη φορά το 1995 στη Γαλλία και την Ιταλία. Από τότε έχει περιγραφεί σε πολλούς διαφορετικούς πληθυσμούς. Στην Ελλάδα τα πρώτα περιστατικά αναφέρονται το 2006.

Στην παρούσα μελέτη προέκυψαν 16 υπερφερριτιναιμικοί ασθενείς (ποσοστό 18,4% του συνόλου των ασθενών με υπερφερριτιναιμία) που εμφάνιζαν καταρράκτη σε νεαρή σχετικά ηλικία. Τα περιστατικά αυτά διερευνήθηκαν για παρουσία HHCS. Στο δεύτερο μέρος στην παρούσα μελέτη δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση στη φαινοτυπική καταγραφή Ελλήνων ασθενών που εμφανίζουν υπερφερριτιναιμία και καταρράκτη, καθώς και στη διερεύνηση της γενετικής βάσης του HHCS στον ελληνικό πληθυσμό.

Αναγνωρίστηκαν συνολικά 10 περιστατικά με HHCS (ποσοστό 11,5%) μεταξύ των 87 υπερφερριτιναιμικών ασθενών που διερευνήθηκαν. Τα περιστατικά αυτά δεν σχετίζονταν συγγενικά μεταξύ τους. Τα 7 είχαν θετικό οικογενειακό ιστορικό για παρουσία καταρράκτη ή/και υπερφερριτιναιμίας, ενώ στα άλλα 3 η απουσία αντίστοιχων στοιχείων μπορεί να οφείλεται στην παρουσία *de novo* μεταλλάξεων. Συνολικά αναγνωρίστηκαν 34 άτομα με HHCS μεταξύ των μελών των οικογενειών και των περιστατικών που εξετάστηκαν.

Ανευρέθηκαν δύο μεταλλάξεις μεταξύ των περιστατικών με HHCS, η C39G και η A40G. Και οι δύο μεταλλάξεις εδράζονται στον καλά συντηρημένο εξανουκλεοτιδικό βρόγχο του IRE και έχουν ήδη περιγραφεί στη βιβλιογραφία ως παθογνωμονικές του HHCS. Η C39G είχε ήδη αναφερθεί σε Έλληνες ασθενείς, ενώ η A40G αναγνωρίζεται για πρώτη φορά στον ελληνικό πληθυσμό στην παρούσα μελέτη. Σε όλα τα περιστατικά οι μεταλλάξεις ήταν σε ετεροζυγωτία.

Διαπιστώθηκε μεγάλη φαινοτυπική ετερογένεια στους ασθενείς με HHCS, ακόμα και μεταξύ αυτών με την ίδια μετάλλαξη, είτε ανήκαν στην ίδια οικογένεια είτε όχι. Η μικρότερη ηλικία διάγνωσης ήταν τα 3 έτη και η μεγαλύτερη τα 55. Οι τιμές της φερριτίνης κυμαίνονταν από 660 έως 2070 μg/L. Η εμφάνιση καταρράκτη αναφέρεται πριν την ηλικία των 40 ετών για το 50% των ασθενών, ενώ η παρουσία του διαπιστώθηκε ακόμα και σε άτομο ηλικίας 5 ετών. Καθαρή συσχέτιση μεταξύ γονοτύπου και φαινοτύπου στα περιστατικά που εξετάστηκαν δε διαπιστώθηκε.

Το HHCS δε χρήζει θεραπείας, παρά μόνο εγχείρησης για καταρράκτη. Η αναγνώριση του συνδρόμου στον υπερφερριτιναιμικό ασθενή κρίνεται απαραίτητη, προκειμένου να αποφεύγονται περιττές διαγνωστικές παρεμβάσεις, πιθανοί επιβλαβείς θεραπευτικοί χειρισμοί (π.χ. αφαιμάξεις) και για να εφησυχάζεται ο ίδιος και τα μέλη της οικογένειάς του.

Η παρούσα μελέτη αποτελεί σημαντική συλλογή κλινικών και γενετικών πληροφοριών για το HHCS και είναι μια πρώτη μεγάλη καταγραφή περιστατικών με HHCS στον ελληνικό πληθυσμό.

7. SUMMARY

Elevated serum ferritin is a common finding in routine clinical practice. Assessment of asymptomatic hyperferritinemia is a frequent cause of tertiary care referral. The majority of patients are referred due to suspicion of hereditary hemochromatosis, without having ruled out first more common causes of hyperferritinemia, that do not represent iron overload. The aim of the present study was the phenotypic and molecular assessment of asymptomatic hyperferritemic patients that presented to the Hepatology Outpatient Clinic of the 1st Department of Internal Medicine at Laiko General Hospital (Athens, Greece) between 06.2005 and 12.2012. The particular clinic is a referral centre for disorders of liver and iron metabolism.

A total of 87 patients with asymptomatic hyperferritinemia were studied. For all patients detailed recordings of the history, clinical examination and laboratory findings were made. Transferrin saturation was used for the evaluation of iron overload. Molecular analysis was performed according to clinical indications. In more than 70% of the patients the cause of hyperferritinemia was not related to primary or secondary iron overload. Only 3 patients (3.4%) were diagnosed with hereditary hemochromatosis. The most common causes of hyperferritinemia were the dysmetabolic syndrome (33.3%) and the presence of chronic inflammation or neoplasia (23%). Dyserythropoiesis (17.3%) and exogenous iron administration (8.1%) were also common. Molecular analysis was performed in 37% of the patients and was positive for pathogenic mutations in 41% of the cases that were molecularly investigated.

According to the present study, asymptomatic hyperferritinemia is not usually due to iron loading. The underlying cause should be first sought to more common conditions, such as inflammation, obesity, dysmetabolic syndrome and secondary iron overload. Ferritin is a non-specific marker of disease. The diagnostic approach to hyperferritinemia should be based on the history (including detailed family history), the clinical examination and simple

laboratory investigations, as for example markers of inflammation. Transferrin saturation is a useful marker of iron overload, especially in cases of HFE hemochromatosis. Molecular analysis is a useful tool in the diagnostic approach of hyperferritinemia, but is of value only in specific cases that are well chosen based on the history, clinical and laboratory findings.

A rare but increasingly more identifiable cause of asymptomatic hyperferritinemia is the hereditary hyperferritinemia cataract syndrome (HHCS). It is a rare autosomal dominant disorder characterized by increased ferritin levels, irrespective of body iron status, and early-onset bilateral cataracts. HHCS is due to mutations in the iron responsive element (IRE) of the *FTL* gene (ferritin light chain – L ferritin), which abolish the post-transcriptional regulation of L ferritin via the IRE/IRP system. Iron regulatory proteins (IRPs) have decreased binding affinity for the mutated IRE, leading in constitutive L ferritin production, irrespective of iron status. HHCS was simultaneously described for the first time in Italy and France in 1995. It has a worldwide geographical distribution, as confirmed by the numerous published reports. In Greece the first cases were reported in 2006.

In the present study, 16 cases (18.4% of the total of hyperferritinemic patients) presented with hyperferritinemia and early-onset cataract, and were investigated for the presence of mutations in the IRE of L ferritin. The second and major part of this study aimed to the identification and characterization of patients of Greek origin with HHCS, both phenotypically and genetically.

Ten (10) unrelated cases (11.5%) were diagnosed with HHCS among the 87 patients with hyperferritinemia. Seven (7) had positive family history for hyperferritinemia, cataract or both, whereas in the other 3 cases the lack of family history could be attributed to the presence of *de novo* mutations. HHCS was identified in a total of 34 subjects, including index cases, other family members and unrelated patients.

Molecular analysis revealed two point mutations, the C39G and the A40G. Both mutations are located in the highly conserved hexanucleotide loop of the IRE and have been previously reported in the mutational spectrum of HHCS. C39G has been previously described in patients of Greek origin.

This is the first report of the A40G mutation in the Greek population. All cases were heterozygous for the detected mutations.

A large phenotypic variability was noted among patients with HHCS, even among those sharing the same mutation, whether they belonged to the same family or not. The youngest age of diagnosis was 3 years of age and the oldest 55. Ferritin values ranged from 660 to 2070 $\mu\text{g/L}$. The onset of cataract was recorded before the age of 40 in 50% of the patients, and it was detected as early as 5 years of age. No clear correlation between genotype and phenotype was established.

HHCS is a non-iron loading disorder, needing no therapeutic intervention, apart from cataract surgery. It should be considered in all patients with unexplained hyperferritinemia, in order to avoid unnecessary investigations, potentially hazardous treatment (e.g. venesections) and confer reassurance to the patient.

The present study constitutes an important collection of clinical and molecular data and is the first extended report of HHCS cases in the Greek population.

8. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ

Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2012; 120: Abstract 3205

A STUDY OF THE HEREDITARY HYPERFERRITINEMIA CATARACT SYNDROME IN PATIENTS OF GREEK ORIGIN

Stamatia-Lydia Hatzinicolaou, Danai Palaiologou, Antonios G Antoniadis, Georgios Papanikolaou, Nikolaos Sakellaropoulos, Gerassimos A Pangalis, John Meletis, Antonios Kattamis

Background: Hereditary hyperferritinemia cataract syndrome (HHCS) is an autosomal dominant disorder characterized by elevated serum L-ferritin and early onset bilateral cataracts. The syndrome, first described in Italy and France in 1995, is caused by mutations in the iron responsive element (IRE) of the L-ferritin gene (*FTL-ferritin light chain*) on chromosome 19q13.3. The conformational changes in the mutated IRE disrupt the binding of the iron regulatory proteins (IRPs) to the IRE, resulting in loss of the posttranscriptional control in L-ferritin synthesis. L-ferritin is constitutively expressed in tissues, irrespective of cellular iron status and without otherwise disrupting cellular iron metabolism. Despite the five to twenty-fold increase in serum L-ferritin, there is no clinical or laboratory evidence of iron overload. Serum iron and transferrin saturation remain within normal limits. Visual impairment and early cataract formation is the only clinical symptom of HHCS, with lens replacement being the only treatment needed. Extensive and invasive investigations in the undiagnosed hyperferritinemic patient, as well as unnecessary treatment with phlebotomies, can be avoided with awareness of the syndrome, leading to the correct clinical and molecular diagnosis.

Aim: HHCS has been previously reported in a limited number of patients of Greek origin, with the study of three unrelated families in Greece. Papanikolaou et al. (Blood Cells Mol Dis. 2006) detected the C39>G mutation

in the IRE of the *FTL* in all affected individuals. Our aim was to further investigate the syndrome within the Greek population, both phenotypically and genetically.

Methods: We investigated 81 patients with undiagnosed hyperferritinemia referred to the Hepatology Outpatients Clinic of the 1st Department of Internal Medicine at “Laikon” General Hospital in Athens. For all patients full medical history and clinical examination (including ophthalmological evaluation) was performed, and laboratory investigations were tailored accordingly. Where indicated from the medical history and laboratory findings, molecular analysis for mutations in the IRE of the *FTL* was performed using direct DNA sequencing.

Results: From the total of 81 patients referred for undiagnosed hyperferritinemia, 18 unrelated subjects had a positive history of cataract and elevated ferritin. In those subjects ferritin levels ranged from 600 to 2070 μ g/L (normal values: 12-160 μ g/L). Serum iron was within normal limits and transferrin saturation ranged from 9 to 40%. Cataract diagnosis was reported as early as 5 years of age and 8 out of the 18 subjects had undergone surgery for lens replacement at the time of referral. From the 18 subjects that were screened for mutations in the IRE of the *FTL*, mutations were detected in 12 unrelated subjects. Ten out of the 12 individuals were positive for the previously described C39>G point mutation. The other two subjects were found to carry the A40>G mutation. The A40>G mutation has been described in the literature as part of the spectrum of mutations causing HHCS (Beaumont et al, Nat. Genet. 1995), however it has not up to now been reported in subjects of Greek origin. From the 12 subjects positive for either mutation, 8 reported positive family history for either early onset cataracts, hyperferritinemia or both. Where possible, clinical, laboratory and molecular investigations were extended to other members of these families. A total of 40 subjects from the members of the studied families fulfilled the clinical criteria of HHCS. Genetic testing was performed in 12 of them, revealing 11 subjects heterozygous for the C39>G mutation and 1 heterozygous for the A40>G mutation.

Conclusion: HHCS is a non-iron loading, rare disorder that should be considered in all patients with unexplained hyperferritinemia, in order to avoid unnecessary investigations, potentially hazardous treatment and confer reassurance to the patient. Our findings contribute to the clinical and molecular characterization of the syndrome and extend the study of the disorder in the Greek population.

Topic: Regulation of Iron Metabolism **Key words:** Hyperferritinemia cataract syndrome, L-ferritin, Iron responsive element, Cataract

9. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Ερωτηματολόγιο ασθενών με υπερφερριταιμία

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΥΠΕΡΦΕΡΡΙΤΙΝΑΙΜΙΑΣ

και

ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ ΥΠΕΡΦΕΡΡΙΤΙΝΑΙΜΙΑΣ-ΚΑΤΑΡΡΑΚΤΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΤΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ

- ΥΠΕΡΦΕΡΡΙΤΙΝΑΙΜΙΑ
- ΚΑΤΑΡΡΑΚΤΗΣ
- ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΤΟ ΙRE ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ FTL
-

1. ΑΤΟΜΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΣΘΕΝΟΥΣ

ΟΝΟΜΑ / ΚΩΔΙΚΟΣ _____

Διεύθυνση _____

Τηλέφωνο _____

Ημερομηνία Γέννησης _____

Τόπος Γεννήσεως / Καταγωγή _____

Επάγγελμα _____

Ημερομηνία Προσέλευσης _____

ΘΕΡΑΠΩΝ / ΠΑΡΑΠΕΜΠΩΝ ΙΑΤΡΟΣ

ΟΝΟΜΑ _____

Νοσοκομείο _____

Στοιχεία επικοινωνίας _____

2. ΠΑΡΟΥΣΑ ΝΟΣΟΣ – ΑΙΤΙΑ ΠΡΟΣΕΛΕΥΣΗΣ

3. ΑΤΟΜΙΚΟ ΑΝΑΜΝΗΣΤΙΚΟ

Οφθαλμολογικό ιστορικό:

Παρουσία καταρράκτη: Ναι Όχι

Αν Ναι:

Ηλικία έναρξης οφθαλμικών συμπτωμάτων: _____

Ηλικία εμφάνισης καταρράκτη: _____

Αριστερός Οφθαλμός Δεξιός Οφθαλμός

Εγχείρηση καταρράκτη: Αριστερός Οφθαλμός Δεξιός Οφθαλμός

Ηλικία εγχείρησης _____

4. ΦΑΡΜΑΚΑ

Λήψη Σιδήρου: : Ναι Όχι

Αν Ναι

Τρόπος Χορηγήσεως _____

Διάστημα Χορηγήσεως _____

Χρόνος Χορηγήσεως _____

Χορηγηθείσα Ποσότητα _____

5. ΕΞΕΙΣ ΚΑΙ ΤΡΟΠΟΣ ΤΟΥ ΖΗΝ

Κάπνισμα:

Χρήση Οινοπνεύματος:

Χρήση τοξικών ουσιών:

Διατροφή:

Ομοιοπαθητικά φάρμακα – Βιταμίνες:

6. ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ

Ιστορικό Υπερφερριτιναιμίας: Ναι Όχι

Ιστορικό Καταρράκτη: : Ναι Όχι

Εγχειρήσεις για καταρράκτη:

ΓΕΝΕΑΛΟΓΙΚΟ ΔΕΝΤΡΟ

7. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ

ΟΦΘΑΛΜΟΛΟΓΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ

ΑΡ ΟΦΘΑΛΜΟΣ:

ΔΕ ΟΦΘΑΛΜΟΣ:

ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΚΑΤΑΡΡΑΚΤΗ: ΝΑΙ ΟΧΙ

8. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

A. ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟΣ

| | | | | |
|--------------------|--|--|--|--|
| ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ | | | | |
| Hct / Hb | | | | |
| MCV / MCH/ MCHC | | | | |
| ΔΕΚ | | | | |
| Μορφολογία ερυθρών | | | | |
| WBC (τύπος) | | | | |
| PLT | | | | |

B. ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ

| | | | | |
|---|--|--|--|--|
| ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ | | | | |
| Σάκχαρο | | | | |
| Ουρία / Κρεατινίνη | | | | |
| Na / K / Ca | | | | |
| ΤΚΕ / CRP | | | | |
| AST / ALT | | | | |
| ALP / γ-GT | | | | |
| Χολερυθρίνη | | | | |
| Ολικές πρωτεΐνες | | | | |
| Αλβουμίνη | | | | |
| α ₁ / α ₂ / β / γ | | | | |
| Ουρικό οξύ | | | | |
| LDH / CPK | | | | |
| Χοληστερόλη | | | | |
| HDL / LDL | | | | |
| TG | | | | |
| Αμυλάση | | | | |

Γ. ΣΙΔΗΡΟΣ

| | | | | |
|---------------------------|--|--|--|--|
| ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ | | | | |
| Fe | | | | |
| Φερριτίνη | | | | |
| TIBC | | | | |
| sTFR | | | | |
| Κορεσμός Τρανσφερρίνης | | | | |
| Ceruloplasmin | | | | |
| B12 / Φιλλικό οξύ | | | | |
| Απποσφαιρίνες | | | | |

Δ. ΠΗΞΗ

| | | | | |
|-------------------|--|--|--|--|
| ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ | | | | |
| PT | | | | |
| INR | | | | |
| aPTT | | | | |
| Ινωδογόνο | | | | |

Ε.. ΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

| | | | | |
|--------------------|--|--|--|--|
| ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ | | | | |
| HBsAg / AntiHBs | | | | |
| HBeAg / AntiHBe | | | | |
| AntiHBc / IgM | | | | |
| HBV DNA | | | | |
| HCV RNA / γονοτ. | | | | |
| Anti-HCV | | | | |
| Anti-HDV | | | | |
| Anti-HAV (IgM,IgG) | | | | |

Z. ΔΕΙΚΤΕΣ

| | | | | |
|-------------------|--|--|--|--|
| ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ | | | | |
| CEA / Ca 19-9 | | | | |
| Ca 125 / Ca 15-3 | | | | |
| PSA | | | | |
| aFP | | | | |

H. ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

| | | | | |
|-------------------|--|--|--|--|
| ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ | | | | |
| RF | | | | |
| ANA | | | | |
| C3 / C4 | | | | |

Θ. ΛΟΙΠΑ

| | | | | |
|-------------------|--|--|--|--|
| ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

I. ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ – ΛΟΙΠΕΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ

9. ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

| Νόσημα | Γονίδια | Μοριακός Έλεγχος | Μεταλλάξεις |
|---|--------------------|------------------|-------------|
| Αιμοχρωμάτωση (HH) | HFE TfR2 FPN | | |
| Νεανική Αιμοχρωμάτωση (JH) | HJV HAMP | | |
| Σύνδρομο Υπερφερριταιμίας-Καταρράκτη (HHCS) | FTL | | |

10. ΣΧΟΛΙΑ

ΟΝΟΜΑ ΙΑΤΡΟΥ _____ ΥΠΟΓΡΑΦΗ _____

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ _____

10.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams PC, Reboussin DM, Barton JC et al. Hemochromatosis and iron-overload screening in a racially diverse population. *N Engl J Med* 2005; 352: 1769–1778.
- Adams PC, Barton JC, McLaren GD et al. Screening for iron overload: Lessons from the Hemochromatosis and iron Overload Screening (HEIRS) Study. *Can J Gastroenterol* 2009; 23: 769-772.
- Adams PC and Barton JC. A diagnostic approach to hyperferritinemia with non-elevated transferrin saturation. *J Hepatol* 2011; 55: 453-358.
- Aisen P. Transferrin receptor 1. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 2137–2143.
- Allerson CR, Cazzola M, Rouault TA. Clinical severity and thermodynamic effects of iron-responsive element mutations in hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome. *J Biol Chem.* 1999; 274(37): 26439-47.
- Alvarez-Coca-Gonzalez J, Moreno-Carralero MI, Martinez-Perez J et al. The hereditary hyperferritinemia cataract syndrome: a family study. *Eur J Pediatr* 2010; 169:1553–1555.
- Andrews NC. Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med.* 1999;341:1986-1995.
- Andriopoulos B Jr, Corradini E, Xia Y et al. BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nat Genet* 2009; 41: 482–7.
- Arnold J, Sangwaiya A, Manglam V et al. Hepcidin levels in hereditary hyperferritinemia: Insights into the iron-sensing mechanism in hepatocytes. *World J Gastroenterol.* 2010; 16:3541-5.
- Arosio C, Fossati L, Vigano M et al. Hereditary hyperferritinemia cataract syndrome: a de novo mutation in the iron responsive element of the L-ferritin gene. *Haematologica* 1999, 84:560–561.
- Arosio P, Ingrassia R, Cavadini P. Ferritins: a family of molecules for iron storage,antioxidation and more. *Biochim Biophys Acta* 2009, 1790:589–599.
- Babitt JL, Huang FW, Xia Y et al. Modulation of bone morphogenetic protein signaling in vivo regulates systemic iron balance. *J Clin Invest* 2007; 117: 1933–9.

- Bartnikas TB, Fleming MD and Schmidt PJ. Murine mutants in the study of systemic iron metabolism and its disorders: an update on recent advances. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1823: 1444-50
- Barton, J.C., Beutler, E. and Gelbart, T. Coinheritance of alleles associated with hemochromatosis and hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome. *Blood* 1998; 92, 4480.
- Beaton MD and Adams PC. Treatment of hyperferritinemia. *Ann Hepatol* 2012; 11: 294-300.
- Beaumont C, Leneuve P, Devaux I et al. Mutation in the iron responsive element of the L ferritin mRNA in a family with dominant hyperferritinaemia and cataract. *Nat Genet* 1995, 11:444–446.
- Bonneau D, Winter-Fuseau I, Loiseau MN et al. Bilateral cataract and high serum ferritin: a new dominant genetic disorder? *J Med Genet* 1995, 32:778–779.
- Bosio S, Campanella A, Gramaglia E et al. C29G in the iron-responsive element of L-ferritin: a new mutation associated with hyperferritinemia-cataract. *Blood Cells Mol Dis* 2004, 33:31–34.
- Bou-Abdalah F. The iron redox and hydrolysis chemistry of the ferritins. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1800:719-31.
- Bozzini C, Galbiati S, Tinazzi E et al. Prevalence of hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome in blood donors and patients with cataract. *Haematologica* 2003, 88:219–220.
- Brooks DG, Manova-Todorova K, Farmer J et al. Ferritin crystal cataracts in hereditary hyperferritinemia cataract syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002 ; 43:1121-1126.
- Camaschella C and Poggiali E. Towards explaining “unexplained hyperferritinemia”. *Haematologica* 2009; 94: 307-309.
- Campagnoli MF, Pimazzoni R, Bosio S, et al. Onset of cataract in early infancy associated with a 32G-->C transition in the iron responsive element of L-ferritin. *Eur J Pediatr.* 2002; 161:499-502.
- Cao W, McMahon M, Wang B et al. A case report of spontaneous mutation (C33 > U) in the iron-responsive element of L-ferritin causing hyperferritinemia-cataract syndrome. *Blood Cells Mol Dis* 2010, 44:22–27.
- Casarrubea D, Viatte L, Hallas T et al. Abnormal body iron distribution and erythropoiesis in a novel mouse model with inducible gain of iron regulatory protein (IRP) – 1 function. *J Mol Med* 2013; 91: 871-881.

- Cavill I. Erythropoiesis and iron, *Best Pract. Res. Clin. Haematol* 2002; 15: 399–409.
- Cazzola M, Bergamaschi G, Tonon L et al. Hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome: relationship between phenotypes and specific mutations in the iron-responsive element of ferritin light-chain mRNA. *Blood* 1997; 90: 814– 821.
- Cazzola M. Hereditary hyperferritinaemia/ cataract syndrome. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2002 Jun;15(2):385-98.
- Cazzola M, Invernizzi R, Bergamaschi G et al. Mitochondrial ferritin expression in erythroid cells from patients with sideroblastic anemia. *Blood* 2003; 101, 1996–2000.
- Chang-Godinich A, Ades S, Schenkein D et al. Lens changes in hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome. *Am J Ophthalmol* 2001; 132:786-788.
- Cheepsunthorn P, Palmer C, Menzies S et al. Hypoxic/ischemic insult alters ferritin expression and myelination in neonatal rat brains. *J Comp Neurol*. 2001; 431:382-396.
- Chen TT, Li L, Chung DH et al. TIM-2 is expressed on B cells and in liver and kidney and is a receptor for H-ferritin endocytosis. *J Exp Med* 2005; 202: 955–965.
- Cheng Y, Zak O, Aisen P et al. Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex. *Cell* 2004; 116: 565–576.
- Chi SI, Wang CK, Chen JJ et al. Differential regulation of H- and L-ferritin messenger RNA subunits, ferritin protein and iron following focal cerebral ischemia-reperfusion. *Neuroscience* 2000; 100:475-484.
- Cho KJ, Shin JS, Lee JH et al. The crystal structure of ferritin from helicobacter pylori reveals unusual conformational changes for iron uptake. *J Mol Biol* 2009; 390: 83-98.
- Cicilano M, Zecchina G, Roetto A et al. Recurrent mutations in the iron regulatory element of L-ferritin in hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome. *Haematologica* 1999; 84:489-492.
- Cohen LA, Gutierrez L, Weiss A et al. Serum ferritin is derived primarily from macrophages through a non-classical secretory pathway. *Blood* 2010; 116, 1574–1584.
- Cooperman SS, Meyron-Holtz EG, Olivierre-Wilson H et al. Microcytic anemia, erythropoietic protoporphyria and neurodegeneration in mice with targeted deletion of iron regulatory protein 2. *Blood* 2005; 106: 1084–1091.

- Corsi, B., Perrone, F., Bourgeois et al. Transient overexpression of human H and L ferritin chains in COS cells. *Biochemical Journal* 1998, 330: 315-320.
- Craig JE, Clark JB, McLeod JL et al. Hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome: prevalence, lens morphology, spectrum of mutations, and clinical presentations. *Arch Ophthalmol* 2003, 121:1753–1761.
- Cremonesi L, Paroni R, Foglieni B et al. Scanning mutations of the 5'UTR regulatory sequence of L-ferritin by denaturing high-performance liquid chromatography: identification of new mutations. *Br J Haematol* 2003, 121:173–179.
- Cremonesi L, Cozzi A, Girelli D, et al. Case report : a subject with a mutation in the ATG start codon has no hematological or neurological symptoms. *J Med Genet* 2004; 41: e81.
- Crook MA. Hyperferritinaemia; laboratory implications. *Ann Clin Biochem* 2012, 49:211–213.
- Curtis ARJ, Fey C, Morris CM et al. Mutation in the gene encoding ferritin light polypeptide causes dominant adult-onset basal ganglia disease. *Nat Genet.* 2001; 28:350-354.
- Darshan D, Vanoaica, L, Richman L et al. Conditional deletion of ferritin H in mice induces loss of iron storage and liver damage. *Hepatology* 2009; 50, 852–860.
- De Domenico I, Vaughn MB, Li L et al. Ferroportin-mediated mobilization of ferritin iron precedes ferritin degradation by the proteasome. *EMBO J* 2006; 25, 5396–5404.
- De Domenico I, Lo E, Ward DM et al. Hepcidin-induced internalization of ferroportin requires binding and cooperative interaction with Jak2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 3800–3805.
- De Gobbi M, Roetto A, Piperno A et al. Natural history of juvenile haemochromatosis. *Br J Haematol* 2002;117: 973–979.
- Devireddy LR, Gazin C, Zhu X et al. A cell-surface receptor for lipocalin 24p3 selectively mediates apoptosis and iron uptake. *Cell* 2005; 123:1293–1305.
- Donovan A, Brownlie A, Zhou Y et al. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* 2000; 403: 776–781.
- Donovan A, Lima CA, Pinkus JL et al. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab* 2005; 1: 191–200.

- Ferrante M, Geubel AP, Fevery J et al. Hereditary hyperferritinaemia-cataract syndrome: a challenging diagnosis for the hepatogastroenterologist. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2005;17:1247-53
- Ferrari F, Foglieni B, Arosio P et al. Microelectronic DNA chip for hereditary hyperferritinemia cataract syndrome, a model for large-scale analysis of disorders of iron metabolism. *Hum Mutat* 2006, 27:201-208.
- Ferreira C, Bucchini D, Martin M.E et al. Early embryonic lethality of H ferritin gene deletion in mice. *J. Biol. Chem.* 2000; 275, 3021–3024.
- Finberg KE, Heeney MM, Campagna DR, et al. Mutations in TMPRSS6 cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). *Nat Genet* 2008;40:569-571.
- Fleming MD, Romano MA, Su MA et al. Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 1148–1153.
- Fleming MD et al. The regulation of hepcidin and its effects on systemic and cellular iron metabolism. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2008; 151-158.
- Galy B, Ferring D, Minana B et al. Altered body iron distribution and microcytosis in mice deficient for iron regulatory protein 2 (IRP2). *Blood* 2005; 106: 2580–2589.
- Galy B, Ferring-Appel D, Kaden S et al. Iron regulatory proteins are essential for intestinal function and control key iron absorption molecules in the duodenum. *Cell Metab.* 2008; 7, 79–85.
- Galy B, Ferring-Appel D, Sauer SW et al. Iron regulatory proteins secure mitochondrial iron sufficiency and function. *Cell Metab.* 2010; 12, 194–201.
- Garderet L, Hermelin B, Gorin NC et al. Hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome: a novel mutation in the iron-responsive element of the L-ferritin gene in a French family. *Am J Med* 2004; 117:138-139.
- Giansily M, Beaumont C, Desveaux C et al. Denaturing gradient gel electrophoresis screening for mutations in the hereditary hyperferritinaemia cataract syndrome. *Br J Haematol* 2001; 112:51-54.
- Giansily-Blaizot M, Cunat S, Moulis G et al. Homozygous mutation of the 5'UTR region of the L-Ferritin gene in the hereditary hyperferritinemia cataract syndrome and its impact on the phenotype. *Haematologica* 2013; 98:e42-3.

- Girelli D, Corrocher R, Bisceglia L et al. Molecular basis for the recently described hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome: a mutation in the iron-responsive element of ferritin L-subunit gene (the “Verona mutation”). *Blood* 1995, 86:4050–4053.
- Girelli D, Olivieri O, De Franceschi L et al. A linkage between hereditary hyperferritinaemia not related to iron overload and autosomal dominant congenital cataract. *Br J Haematol* 1995, 90:931–934.
- Girelli D, Bozzini C, Zecchina G et al. Clinical, biochemical and molecular findings in a series of families with hereditary hyperferritinaemia-cataract syndrome. *Br J Haematol*. 2001, 115: 334-340.
- Gkouvatsos K, Papanikolaou G and Pantopoulos K. Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1820: 188-202.
- Goralska M, Holley BL, McGahan MC. Overexpression of H- and L-ferritin subunits in lens epithelial cells: Fe metabolism and cellular response to UVB irradiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:1721–1727.
- Goralska M, Holley BL, McGahan MC. Identification of a mechanism by which lens epithelial cells limit accumulation of overexpressed ferritin H-chain. *J Biol Chem* 2003; 278:42920–42926.
- Hammond, C.J., Snieder, H., Spector, T.D. et al. Genetic and environmental factors in age-related nuclear cataracts in monozygotic and dizygotic twins. *New England Journal of Medicine* 2000, 342: 1786-1790.
- Han O. Molecular mechanism of intestinal iron absorption. *Metallomics* 2011; 3: 103–109.
- Harris ZL, Durley AP, Man TK et al. Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 10812–10817.
- Harrison PM and Arosio P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta*. 1996; 1275: 161-203.
- Hazard JT and Drysdale JW. Ferritinemia in cancer. *Nature* 1977; 265:755-756.
- Hentze MW, Caughman SW, Casey JL et al. A model for the structure and functions of iron-responsive elements. *Gene* 1988; 72: 201–208.
- Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* 2004, 117:285–297.

- Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B et al. Two to tango: Regulation of mammalian iron metabolism. *Cell* 2010; 142: 24-38.
- Hetet G, Devaux I, Soufir N et al. Molecular analyses of patients with hyperferritinemia and normal serum iron values reveal both L ferritin IRE and 3 new ferroportin (slc11A3) mutations. *Blood* 2003, 102:1904–1910.
- Hintze KJ and Theil EC. Cellular regulation and molecular interactions of the ferritins. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 591-600.
- Hintze KJ, Kato K, Igarashi K. Bach1 repression of ferritin and thioredoxin reductase 1 is heme-sensitive in cells and in vitro and coordinates expression with heme oxygenase 1, beta-globin, and NAD(P)H quinone reductase 1. *J Biol Chem* 2007; 282: 34365-34371.
- Huang FW, Pinkus JL, Pinkus GS et al. A mouse model of juvenile hemochromatosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 2187–91.
- Hubert N and Hentze MW. Previously uncharacterized isoforms of divalent metal transporter (DMT)-1: implications for regulation and cellular function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 12345–12350.
- Ishikawa H, Kato M, Hori H et al. Involvement of heme regulatory motif in heme-mediated ubiquitination and degradation of IRP2. *Mol Cell* 2005; 19: 171-181.
- Iwasaki K, McKenzie EL, Hailemariam K et al. Hemin-mediated regulation of an antioxidant-responsive element of the human ferritin H gene and role of Ref-1 during erythroid differentiation of K562 cells. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 2845-2856.
- Jehn M, Clark JM and Guallar E. Serum ferritin and risk of the metabolic syndrome in US adults. *Diabetes Care* 2004; 27: 2422-2428.
- Jiang R, Manson JE, Meigs JB et al. Body iron stores in relation to risk of type 2 diabetes in apparently healthy women. *JAMA* 2004; 291: 711-717.
- Kannengiesser C, Jouanolle AM, Hetet G et al. A new missense mutation in the L ferritin coding sequence associated with elevated levels of glycosylated ferritin in serum and absence of iron overload. *Haematologica* 2009; 94: 335-339.
- Kato J, Fujikawa K, Kanda M et al. A mutation in the iron-responsive element of H ferritin mRNA causing autosomal dominant iron overload. *Am J Hum Genet.* 2001; 69:191-197.
- Kautz L, Meynard D, Monnier A et al. Iron regulates phosphorylation of Smad1/5/8 and gene expression of Bmp6, Smad7, Id1, and Atoh8 in the mouse liver. *Blood* 2008; 112: 1503–9.

- Kawabata H, Yang R, Hirama T et al. Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor like family. *J Biol Chem* 1999; 274: 20826–20832.
- Keel SB, Doty RT, Yang Z et al. A heme export protein is required for red blood cell differentiation and iron homeostasis. *Science* 2008; 319: 825-828.
- Krause A, Neitz S, Magert HJ et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett.* 2000; 480: 147–150.
- Krijt J, Vokurka M, Chang KT et al. Expression of Rgmc, the murine ortholog of hemojuvelin gene, is modulated by development and inflammation, but not by iron status or erythropoietin. *Blood* 2004; 104: 4308–10.
- Kushner I. The phenomenon of the acute phase response. *Ann NY Acad Sci* 1982; 389: 39.
- Lanzara C, Roetto A, Daraio F et al. Spectrum of hemojuvelin gene mutations in 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Blood* 2004; 103: 4317–21.
- Laufberger V. Crystallization of ferritin. *Bulletin de la Societe de Chimie Biologique* 1937; 19:1575–1582.
- Lee DH, Zhou LJ, Zhou Z et al. Neogenin inhibits HJV secretion and regulates BMP-induced hepcidin expression and iron homeostasis. *Blood* 2010; 115: 3136–3145.
- Levi S, Yewdall SJ, Harrison PM et al. Evidence that H- and L- chains have co-operative roles in the iron-uptake of human ferritin. *Biochem J* 1992; 288: 591-596.
- Levi, S., Santambrogio, P., Cozzi, A. et al. The role of the L-chain in ferritin iron incorporation. Studies of homo and heteropolymers. *Journal of Molecular Biology* 1994; 238, 649-654.
- Levi, S., Girelli, D., Perrone F. et al. Analysis of ferritin in lymphoblastoid cells lines and in the lens of subjects with hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome. *Blood* 1998; 91, 4190-4197.
- Levy JE, Jin O, Fujiwara Y, Kuo F et al. Transferrin receptor is necessary for development of erythrocytes and the nervous system. *Nat Genet* 1999; 21: 396–399.
- Li JY, Paragas N, Ned RM et al. Scara5 is a ferritin receptor mediating non-transferrin iron delivery. *Dev Cell* 2009;16: 35–46.

- Lin L, Valore EV, Nemeth E et al. Iron transferring regulates hepcidin synthesis in primary hepatocyte culture through hemojuvelin and BMP2/4. *Blood* 2007; 110: 2182–9.
- Liu X and Theil E. Ferritins: dynamic management of biological iron and oxygen chemistry. *Acc Chem Res* 2005; 38: 167-175.
- Livingston, P.M., Carson, C.A. and Taylor, H.R. The epidemiology of cataract: a review of the literature. *Ophthalmic Epidemiology* 1995; 2, 151-164.
- Luscieti S, Tolle G, Aranda J et al. Novel mutations in the ferritin-L iron-responsive element that only mildly impair IRP binding cause hereditary hyperferritinaemia cataract syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 2013 Feb 19;8:30.
- McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO et al. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science* 2001; 291: 1755–1759.
- McKie AT, Marciani P, Rolfs A et al. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol. Cell* 2000; 5: 299–309.
- McLeod JL, Craig J, Gumley S et al. Mutation spectrum in Australian pedigrees with hereditary hyperferritinaemia-cataract syndrome reveals novel and de novo mutations. *Br J Haematol* 2002, 118:1179–1182.
- Meneses FG, Schnabel B, Silva ID et al. Identification of the mutations associated with hereditary hyperferritinemia cataract syndrome and hemochromatosis in a Brazilian family. *Clin Genet* 2011, 79:189-192.
- Meynard D, Kautz L, Darnaud V et al. Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload. *Nat Genet* 2009; 41: 478–81.
- Meyron-Holtz EG, Ghosh MC, Iwai K et al. Genetic ablations of iron regulatory proteins 1 and 2 reveal why iron regulatory protein 2 dominates iron homeostasis. *EMBO J* 2004; 23: 386–395.
- Mikulits W, Schranzhofer M, Beug H et al. Post-transcriptional control via iron-responsive elements: the impact of aberrations in hereditary disease, *Mutat. Res.* 1999; 437: 219– 230.
- Millonig G, Muckenthaler MU, Mueller S. Hyperferritinaemia-cataract syndrome: worldwide mutations and phenotype of an increasingly diagnosed genetic disorder. *Hum Genomics* 2010, 4:250–262.
- Missirlis F, Kosmidis S, Brody T et al. Homeostatic Mechanisms for Iron Storage Revealed by Genetic Manipulations and Live Imaging of *Drosophila* Ferritin. *Genetics* 2007; 177:89-100.

- Mohn A, Capanna R, Chiarelli F. A girl with persistent hyperferritinaemia. *Lancet* 2005; 365: 1744.
- Muckenthaler MU, Galy B and Hentze MW. Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. *Annu Rev Nutr* 2008; 28: 197–213.
- Mumford AD, Cree IA, Arnold JD et al. The lens in hereditary hyperferritinaemia cataract syndrome contains crystalline deposits of L-ferritin. *Br J Ophthalmol*. 2000; 84:697-700.
- Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 2004; 306: 2090–2093.
- Ohgami RS, Campagna DR, Greer EL et al. Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. *Nat Genet* 2005; 37: 1264–1269.
- Oudit GY, Sun H, Trivieri MG et al. Backx, L-type Ca²⁺ channels provide a major pathway for iron entry into cardiomyocytes in iron-overload cardiomyopathy. *Nat Med* 2003; 9: 1187–1194.
- Pantopoulos K and Hentze MW. Activation of iron regulatory protein-1 by oxidative stress in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:10559–10563.
- Papanikolaou G, Politou M, Terpos E et al. Hereditary hemochromatosis : HFE mutation analysis in Greeks reveals genetic heterogeneity. *Blood Cells Mol Dis* 2000; 26: 163-168.
- Papanikolaou G, Samuels ME, Ludwig EH et al. Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet* 2004; 36: 77–82.
- Papanikolaou G, Chandrinou H, Bouzas E et al. Hereditary hyperferritinaemia cataract syndrome in three unrelated families of Western Greek origin caused by the C39>G mutation of L-ferritin IRE. *Blood Cells Mol Dis* 2006; 36: 33-40.
- Papazoglou D, Exiara T, Speletsas M et al. Prevalence of hemochromatosis gene (HFE) mutations in Greece. *Acta Haematol* 2003; 109: 137-140.
- Park CH, Valore EV, Waring AJ et al. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 2001; 276: 7806–7810.
- Piccinelli P and Samuelsson T. Evolution of the iron-responsive element. *RNA* 2007; 13, 952–966.

- Pietrangelo A. Heparin in human iron disorders: therapeutic implications. *J Hepatol* 2011; 54:173-181.
- Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 2001; 276: 7811–7819.
- Pissia M, Polonifi K, Politou M et al. Prevalence of the G320V mutation of the HJV gene, associated with juvenile hemochromatosis, in Greece. *Haematologica* 2004; 89: 742– 743.
- Ponka P and Lok CN. The transferrin receptor: role in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31: 1111–1137.
- Qiu A, Jansen M, Sakaris A et al. Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell* 2006;127: 917–928.
- Riley RD, Heney DR, Jones DR et al. A systematic review of molecular and biological tumor markers in neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 4-12.
- Rochow N, Bachmaier N, Tost F et al. The case of a 1-year-old girl with hereditary hyperferritinaemia cataract syndrome. *Pediatr Hematol Oncol.* 2009; 26:136-41.
- Roetto A, Bosio S, Gramaglia E et al. Pathogenesis of hyperferritinemia cataract syndrome. *Blood Cells Mol Dis.* 2002; 29: 532-5.
- Rogers J and Munro H. Translation of ferritin light and heavy subunit mRNAs is regulated by intracellular chelatable iron levels in rat hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84:2277-2281.
- Rogers JT, Andriotakis JL, Lacroix L et al. Translational enhancement of H-ferritin mRNA by interleukin-1 beta acts through 5' leader sequences distinct from the iron responsive element. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22:2678-2686.
- Rosochova J, Kapetanios A, Pournaras C et al. Hereditary hyperferritinaemia cataract syndrome: does it exist in Switzerland? *Schweiz Med Wochenschr.* 2000; 130:324-8.
- Rouault TA. The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat Chem Biol* 2006; 2: 406-414.
- Rufer A, Howell JP, Lange AP et al. Hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome (HHCS) presenting with iron deficiency anemia associated with a new mutation in the iron responsive element of the L ferritin gene in a Swiss family. *Eur J Haematol* 2011; 87: 274-278.

- Salahudeen AA, Thompson JW, Ruiz JC et al. An E3 ligase possessing an iron responsive hemerythrin domain is a regulator of iron homeostasis. *Science* 2009; 326: 722–726.
- Sammarco MC, Ditch S, Banerjee E et al. Ferritin L and H subunits are differentially regulated on a post-transcriptional level. *J Biol Chem* 2008; 283: 4578-4587.
- Santambrogio P., Levi S., Cozzi A. et al. Evidence that the specificity of iron incorporation into homopolymers of human ferritin L- and H-chains is conferred by the nucleation and ferroxidase centers. *Biochemical Journal* 1996; 314, 139-144.
- Serra M, Longo F, Roetto A et al. A child with hyperferritinemia: case report. *Ital J Pediatr* 2011; 37:20.
- Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS et al. Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* 2005; 122: 789–801.
- Shi H, Bencze KZ, Stemmler TL et al. A cytosolic iron chaperone that delivers iron to ferritin. *Science* 2008; 320, 1207–1210.
- Simsek S, Nanayakkara PW, Keek JM et al. Two Dutch families with hereditary hyperferritinaemia-cataract syndrome and heterozygosity for an HFE-related haemochromatosis gene mutation. *Neth J Med* 2003; 61:291-295.
- Smirnov IM, Bailey K, Flowers CH et al. Effects of TNF-alpha and IL-1 beta on iron metabolism by A549 cells and influence on cytotoxicity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 1999; 277:L257–L263.
- Smith SR, Ghosh MC, Ollivierre-Wilson H et al. Complete loss of iron regulatory proteins 1 and 2 prevents viability of murine zygotes beyond the blastocyst stage of embryonic development. *Blood Cells Mol. Dis.* 2006 36, 283–287.
- Thurlow V, Vadher B, Bomford A et al. Two novel mutations in the L ferritin coding sequence associated with benign hyperferritinaemia unmasked by glycosylated ferritin assay. *Ann Clin Biochem* 2012; 49: 302-305.
- Torti SV, Kwak EL, Miller SC et al. The molecular cloning and characterization of murine ferritin heavy chain, a tumor necrosis factor-inducible gene. *J Biol Chem*. 1988; 263:12638-12644.
- Torti FM and Torti SV. Regulation of ferritin genes and protein. *Blood* 2002; 99, 3505–3516.

- Tran TN, Eubanks SK, Schaffer KJ et al. Secretion of ferritin by rat hepatoma cells and its regulation by inflammatory cytokines and iron. *Blood* 1997; 90:4979-4986.
- Vashisht AA, Zumbrennen KB, Huang X et al. Control of iron homeostasis by an iron-regulated ubiquitin ligase. *Science* 2009; 326: 718–721.
- Vulpe JD, Kuo YM, Murphy TL et al. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat Genet* 1999; 21: 195–199.
- Walczyk T and Blanckenburg F. Deciphering the iron isotope message of the human body. *Int J Mass Spectrom* 2005; 242: 117-134.
- Walden WE, Selezneva AI, Dupuy J et al. Structure of dual function iron regulatory protein 1 complexed with ferritin IRE-RNA. *Science* 2006; 314: 1903–1908.
- Wang RH, Li C, Xu X et al. A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell Metab* 2005; 2: 399–409.
- Wang J and Pantopoulos K. Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem. J.* (2011) 434, 365–381.
- Wong K and Adams PC. The diversity of liver diseases among outpatient referrals for an elevated serum ferritin. *Can J Gastroenterol* 2006; 20: 467 – 470.
- Wong K and Adams PC. The diversity of liver diseases associated with an elevated serum ferritin. *Can J Gastroenterol* 2007; 20: 467–470.
- Yeh KY, Yeh M and Glass J. Expression of intestinal brush-border membrane hydrolases and ferritin after segmental ischemia-reperfusion in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1998; 38: G572–G583.
- Zanella A, Gridelli L, Berzuini A et al. Sensitivity and redictive value of serum ferritin and free erythrocyte protoporphyryn for iron deficiency. *J Lab Clin Med* 1989; 113: 73.
- Zhang AS, West AP Jr, Wyman AE et al. Interaction of hemojuvelin with neogenin results in iron accumulation in human embryonic kidney 293 cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 33885–94.
- Zhang AS and Enns CA. Molecular mechanisms of normal iron homeostasis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009; 207-214.
- Zhang AS, Gao J, Koeberl DD et al. The role of hepatocyte hemojuvelin in the regulation of bone morphogenic protein-6 and hepcidin expression in vivo. *J Biol Chem* 2010; 285: 16416–23.

Zhang AS. Control of systemic iron homeostasis by the hemojuvelin-hepcidin axis. *Adv Nutr* 2010; 1:38-45.

Zhang DL, Hughes RM, Ollivierre-Wilson H et al. A ferroportin transcript that lacks an iron-responsive element enables duodenal and erythroid precursor cells to evade translational repression. *Cell Metab* 2009; 9: 461–473.

Zhao N, Gao J, Enns CA et al. ZRT/IRT-like protein 14 (ZIP14) promotes the cellular assimilation of iron from transferrin. *J Biol Chem* 2010; 285: 32141–32150.

11. ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Όνομα: Χατζηνικολάου Σταματία-Λυδία
Επάγγελμα: Ιατρός
Ημ. Γέννησης: 25.06.1979
Τόπος Γέννησης: Βοστώνη, Η.Π.Α.
Τηλέφωνο: 6974874414
Διεύθυνση: Θράκης 4, 15124 Μαρούσι, Αθήνα
e-mail: matinahatzinicolaou@gmail.com

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

2005-σήμερα **Διδακτορική διατριβή** με τίτλο: «Μελέτη της γενετικής βάσης συνδρόμων υπερφερριτιναιμίας με ή χωρίς αναιμία σε Έλληνες ασθενείς», Α΄ Παθολογική Κλινική, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

2010-2011 **Πιστοποιητικό παρακολούθησης 4^{ου} Σχολείου Κλινικής Ηπατολογίας**, Ελληνική Εταιρεία Μελέτης του Ήπατος

2008-2010 **Άσκηση στην Ειδικότητα της Παθολογίας** (προαπαιτούμενο μέρος ειδικότητας Γαστρεντερολογίας), Γ΄ Παθολογική Κλινική, Γενικό Ογκολογικό Νοσοκομείο Κηφισιάς «Οι Άγιοι Ανάργυροι»

Μάιος 2006 **19th Course in Medical Genetics**, European School of Genetic Medicine, Bertinoro di Romagna, Ιταλία

1998-2003 **Πτυχίο Ιατρικής** (Bachelor of Medicine Bachelor of Surgery- BMBS), Ιατρική Σχολή, The University of Nottingham, Nottingham, Ηνωμένο Βασίλειο

1998-2001 **Πτυχίο Ιατρικών Επιστημών** (Bachelor of Medical Sciences- BMedSci), Ιατρική Σχολή, The University of Nottingham, Nottingham, Ηνωμένο Βασίλειο

1994-1998 **A' Levels** σε Mathematics, Physics, Chemistry, Further Mathematics with Statistics, Biology (για την εισαγωγή σε βρετανικά πανεπιστήμια) , Athens G.C.E. Tutorial College

1998 **Απολυτήριο Λυκείου**, Κολλέγιο Αθηνών

ΕΡΓΑΣΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

| | |
|-----------------|--|
| 01/2011-07/2013 | Συνεργάτης Ογκολογικού Τμήματος , Α΄ Παθολογική Κλινική, ΕΚΠΑ, ΓΝΑ «Λαϊκό» |
| 01/2011-09/2013 | Συνεργάτης Ηπατολογικού Εξωτερικού Ιατρείου (Μονάδα Μελέτης Μεταβολικών Νοσημάτων Ήπατος), Α΄ Παθολογική Κλινική, ΕΚΠΑ, ΓΝΑ «Λαϊκό» |
| 06/2011-06/2013 | Εφημερεύουσα ιατρός στο Διαγνωστικό Κέντρο «Euromedica Εγκέφαλος» |
| 05/2008-12/2010 | Ειδικευόμενη Παθολογίας , Γ΄ Παθολογική Κλινική, Γενικό Ογκολογικό Νοσοκομείο Κηφισιάς «Οι Άγιοι Ανάργυροι» |
| 05/2005-05/2008 | Συνεργάτης-Ερευνητής στη Μονάδα Έρευνας Μεταβολισμού του Σιδήρου , Ερευνητικό Εργαστήριο Α΄ Παθολογικής Κλινικής, ΕΚΠΑ, ΓΝΑ «Λαϊκό» |
| 02/2004-08/2004 | Pre-Registration House Officer (PRHO) στη Χειρουργική, “The Calderdale Royal Hospital”, Halifax, Ηνωμένο Βασίλειο |
| 08/2003-02/2004 | Pre-Registration House Officer (PRHO) στην Παθολογία, “Nottingham City Hospital”, Nottingham, Ηνωμένο Βασίλειο |

ΠΙΣΤΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

| | |
|------------|--|
| 21/10/2009 | Basic Life Support, Κωνσταντοπούλειο Γ.Ν. Νέας Ιωνίας «Η Αγία Όλγα» |
| 29/05/2007 | Αναγνώριση πτυχίου Ιατρικής (ισοτιμία-αντιστοιχία) από το Δ.Ο.Α.Τ.Α.Π. |
| 09/12/2004 | Άδεια ασκήσεως ιατρικού επαγγέλματος, Νομαρχία Αθηνών |
| 04/08/2004 | Άδεια ασκήσεως ιατρικού επαγγέλματος, General Medical Council, Ηνωμένο Βασίλειο |
| 08/08/2003 | Advance Life Support, “Nottingham City Hospital”, Nottingham, Ηνωμένο Βασίλειο |
| 03/07/2003 | Πτυχίο Ιατρικής, Ιατρική Σχολή, The University of Nottingham, Nottingham, Ηνωμένο Βασίλειο |

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ – ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

| | |
|-----------|--|
| 2012-2013 | Sub-investigator κλινικών μελετών φάσης III (MEK115306, MO 28048, BRF 115532), Ογκολογικό Τμήμα, Α΄ Παθολογική Κλινική, ΕΚΠΑ, ΓΝΑ «Λαϊκό» |
|-----------|--|

| | |
|-----------|--|
| 2006-2008 | Συντονιστής κλινικής μελέτης φάσης III (A 3671009), Ογκολογικό Τμήμα, Α΄ Παθολογική Κλινική, ΕΚΠΑ, ΓΝΑ «Λαϊκό» |
| 2005-2008 | Μοριακός έλεγχος αιμοχρωμάτωσης και μελέτη μεταβολισμού του σιδήρου , Μονάδα Έρευνας Μεταβολισμού του Σιδήρου, Ερευνητικό Εργαστήριο Α΄ Παθολογικής Κλινικής, ΕΚΠΑ, ΓΝΑ «Λαϊκό» |
| 2005-2007 | Μέρος εργασιών διδακτορικής διατριβής (πριν την αλλαγή θέματος): «Μελέτη της γενετικής βάσης της αναιμίας Diamond-Blackfan στον ελληνικό πληθυσμό», Ερευνητικό Εργαστήριο Α΄ Παθολογικής Κλινικής, ΕΚΠΑ, ΓΝΑ «Λαϊκό» και Α΄ Παιδιατρική Κλινική, ΕΚΠΑ, Νοσοκομείο Παιδών «Η Αγία Σοφία» |
| 2000-2001 | Προπτυχιακή εργασία: “The effects of red blood cell constituents on platelet aggregation”, Τμήμα καρδιαγγειακών νοσημάτων, Νοσοκομείο “Queen’s Medical Centre”, Ιατρική Σχολή, The University of Nottingham, Nottingham, Ηνωμένο Βασίλειο |

ΟΜΙΛΙΕΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ – ΗΜΕΡΙΔΕΣ – ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΑ ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

- 1.Ομιλία σε Επιστημονική Ημερίδα με θέμα: «*Νεότερες εξελίξεις στη θεραπεία του Μελανώματος*» (Α΄ Παθολογική Κλινική, ΕΚΠΑ, ΓΝΑ «Λαϊκό»), 19/10/2013. Θέμα ομιλίας: *Χειρισμός ανεπιθύμητων ενεργειών και case studies*
- 2.Ομιλία σε Κλινικό Φροντιστήριο με θέμα: «*Νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις στην αντιμετώπιση της δυσκοιλιότητας κατά τη χρήση οπιοειδών*» (Ε.Σ.Ν.Ε, Τομέας Νοσηλευτικής Ογκολογίας), 03/06/2010. Θέμα ομιλίας: *Αξιολόγηση και αντιμετώπιση της δυσκοιλιότητας κατά τη χορήγηση οπιοειδών*
3. Ομιλία σε Επιστημονική Ημερίδα με θέμα: «*Μεταβολικά Νοσήματα και Ήπαρ*» (Ελληνική Εταιρία Μελέτης Ήπατος και Ελληνική Εταιρία Παθολογικής Ανατομικής), 20/02/2010. Θέμα ομιλίας: *Παρουσίαση περιστατικών – Νεανική αιμοχρωμάτωση και Κληρονομικό σύνδρομο υπερφερριτιναιμίας καταρράκτη*
4. Ομιλία σε Επιστημονική Ημερίδα με θέμα: «*Νεώτερα Δεδομένα στο Μεταβολισμό του Σιδήρου*» (Ελληνική Αιματολογική Εταιρεία, Τμήμα ερυθροκυττάρου και αιμοσφαιρινοπαθειών), 05/09/2009. Θέμα ομιλίας: *Κληρονομικό Σύνδρομο Υπερφερριτιναιμίας Καταρράκτη*
5. Ομιλία σε Εκπαιδευτικό Σεμινάριο με θέμα: *Advanced Course in Thalassemia* (First Department of Pediatrics and Department of Medical Genetics, University of Athens Medical School), 14-15/09/2006. Θέμα ομιλίας: *Iron regulating proteins and chelation*

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Stamatia-Lydia Hatzinicolaou, Danai Palaiologou, Antonios G Antoniadis, Georgios Papanikolaou, Nikolaos Sakellaropoulos, Gerassimos A Pangalis, John Meletis and Antonios Kattamis **A Study of the Hereditary Hyperferritinemia Cataract Syndrome in Patients of Greek Origin Blood** (ASH Annual Meeting Abstracts) 2012; 120: Abstract 3205.

Gogas H, Hatzinicolaou SL, Bafaloukos D **Melanoma: What does it mean in 2012 and beyond** MOJ 2012; 2: 30-37

Stamatia-Lydia Hatzinicolaou and Helen Gogas **Melanoma: What does it mean in 2011 and beyond** EJCMO 2012; 4: 1-6

K Konstantopoulos, E Kanta, V Papadopoulos, P Kaklamanis, M Hatzinicolaou, V Kalotychoy, A Kanta, V Kapsimali, G Vaiopoulos **Mediterranean Fever Gene Mutations in Greek Patients with Behcet's Disease** West Indian Med J 2012; 61 (1): 28

H.Res, A. Visvikis, J. Sgouros, I. Patenioti, S.Spyridon, S.M. Kyvelou, S.L.Chatzinikolaou, I.Koutsounas, E.Samantas, G.Aravantinos **Observational study of 16 patients with gastrointestinal stromal tumors (GIST) – A single institution experience** Digestive Oncology 2009; 9:131

Γ. Αραβαντινός, Σ. Χατζηνικολάου, Δ. Πεκτασίδης, Ι. Σγουρός **Καρκίνος Όρχεων: Αντιμετώπιση σταδίων II και III, Μέρος Β-Υπολειμματική νόσος στον καρκίνο του όρχεως: χειρουργική προσέγγιση** Εκπαιδευτική Σειρά Ελληνικής Ακαδημίας Ογκολογίας 2008 (Καρκίνος Ουροποιογεννητικού Συστήματος: Από τη βασική έρευνα στις στοχευμένες θεραπείες) Τεύχος 6, Κεφάλαιο 12, σ.σ. 131-139.

Hatzinicolaou, M. L., Palaiologou, D., Papanikolaou, G., Kattamis, A. **Iron regulating genes and chelation** HAEMATOLOGICA-THE HEMATOLOGY JOURNAL 2007; 92: 292.

Pink, A., White, A. E., Glenn, J. R., Hatzinicolaou, M. L., Heptinstall, S. **ATP causes platelet aggregation in whole blood but not in PRP** Platelets 2002, 13, 354.

ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΚΑΙ ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

Stamatia-Lydia Hatzinicolaou, Danai Palaiologou, Antonios G Antoniadis, Georgios Papanikolaou, Nikolaos Sakellaropoulos, Gerassimos A Pangalis, John Meletis and Antonios Kattamis **A Study of the Hereditary Hyperferritinemia Cataract Syndrome in Patients of Greek Origin** ASH 54th Annual Meeting 2012, December 8-11, Atlanta, USA

Αντωνίου Γ., Κουτσούνας Ι., Σγουρός Ι., Κυβέλου Σ.Μ., Χατζηνικολάου Σ.Λ., Σπυρίδων Σ., Μπίνας Ι., Τσουκαλά Χ., Ρες Ε., Βισβίκης Α., Αραβαντινός Γ., Σαμαντάς Ε. **Αναδρομική μελέτη του δείκτη κινδύνου της διεθνούς εταιρείας υποστηρικτικής αγωγής του καρκίνου (MASC Index) στους ασθενείς μιας ελληνικής ογκολογικής κλινικής με εμπύρετη ουδετεροπενία** 16^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας 2010, 22-25 Απριλίου, Αθήνα

Ι. Κουτσουνάς, Ι. Σγουρός, Γ. Βλαχονικολού, Σ.Μ. Κυβέλου, Σ.Λ. Χατζηνικολάου, Γ. Αντωνίου, Ε. Ρες, Α. Βισβίκης, Γ. Αραβαντινός, Ε. Σαμαντάς **Ιρινοτεκάνη σε συνδυασμό με οξαλιπλάτινα (IROX) ως θεραπεία σε πολυθεραπευόμενους ασθενείς με μεταστατικό κολοορθικό καρκίνο: Μια αναδρομική μελέτη** 15^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ογκολογίας 2009, 13-15 Νοεμβρίου, Αθήνα

Α.Γ. ΑΝΤΩΝΙΑΔΗΣ, Δ. ΠΑΛΑΙΟΛΟΓΟΥ, Σ. ΧΑΤΖΗΝΙΚΟΛΑΟΥ, Μ.ΝΟΝΗ, Γ.ΝΙΚΟΛΑΚΗΣ, Γ.ΒΑΪΟΠΟΥΛΟΣ **Αξιολόγηση ασυμπτωματικής υπερφερριτιναιμίας** 20^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο 2009, 4-7 Νοεμβρίου, Ηράκλειο, Κρήτης

ΑΓ Αντωνιάδης, Δ Παλαιολόγου, ΣΛ Χατζηνικολάου, Γ Παπανικολάου, Φ Ντζιώρα, Ν Σακελλαρόπουλος **Μοριακός έλεγχος υπερφερριτιναιμίας** 11^ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο 2009, 7-10 Μαΐου, Κέρκυρα

ΑΓ Αντωνιάδης, Δ Παλαιολόγου, ΣΛ Χατζηνικολάου, Φ Ντζιώρα, Χ Φλούδας, Ν Σακελλαρόπουλος **Αξιολόγηση ασυμπτωματικής υπερφερριτιναιμίας** 11^ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο 2009, 7-10 Μαΐου, Κέρκυρα

H.Res, A. Visvikis, J. Sgouros, I. Patenioti, S.Spyridon, S.M. Kyvelou, S.L.Chatzinikolaou, I.Koutsounas, E.Samantas, G.Aravantinos **Observational study of 16 patients with gastrointestinal stromal tumors (GIST) – A single institution experience** 4th International Congress on Gastrointestinal Oncology 2009, May 22-24, Athens, Greece

Σταματία-Λυδία Χατζηνικολάου, Αναστάσιος Βισβίκης, Ελένη Ρες, Ιωσήφ Σγουρός, Ιωάννα Τριανταφυλλοπούλου, Ιωάννα Πατηνιώτη, Σοφία Σπυριδών, Βλαχονικολού Γεωργία, Στέλλα-Μαρία Κυβέλου, Ματίνα Καραμέτου, Άννα Κιούση, Επαμεινώνδας Σαμαντάς, Γεράσιμος Αραβαντινός **Οξύ χολινεργικό σύνδρομο σε ασθενή με καρκίνο του ορθού υπό αγωγή με οξαλιπλάτινα** 15^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας 2009, 26-28 Μάρτιου, Αθήνα

Ματίνα Καραμέτου, Ιωσήφ Σγουρός, Αθανάσιος Ζώμας, Στέλλα Κυβέλου, Άννα Κιούση, Γεωργία Βλαχονικολού, Πατηνιώτη Ιωάννα, Χατζηνικολάου Σταματία-Λυδία, Σπυριδών Σοφία, Ελένη Ρες, Αναστάσιος Βισβίκης, Γεράσιμος Αραβαντινός, Επαμεινώνδας Σαμαντάς **Αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία σε ασθενή με στρωματικό όγκο γαστρεντερικού (GIST) υπό αγωγή με σουνιτινίμη: Παρουσίαση ενδιαφέροντος περιστατικού** 15^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας 2009, 26-28 Μάρτιου, Αθήνα

ΣΛ Χατζηνικολάου, Δ Παλαιολόγου, ΑΓ Αντωνιάδης, Γ Παπανικολάου, Ν Σακελλαρόπουλος, Γ Βαϊόπουλος **Σύνδρομο κληρονομικής υπερφερριτιναιμίας καταρράκτη σε έλληνες ασθενείς** 19^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο 2008, 19-22 Νοεμβρίου, Αθήνα

Δ Παλαιολόγου, ΑΓ Αντωνιάδης, ΣΛ Χατζηνικολάου, Γ Παπανικολάου, Ν Σακελλαρόπουλος, Γ Βαϊόπουλος **Μοριακός έλεγχος υπερφερριτιναιμίας** 19^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο 2008, 19-22 Νοεμβρίου, Αθήνα

D Palaiologou, M Hatzinicolaou, G Papanikolaou, A Kattamis **Iron regulating genes and chelation** EHA 12th Annual Congress 2007, June 7-10 Vienna, Austria

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ ΚΑΙ ΒΡΑΒΕΙΑ

1. Βραβείο καλύτερης αναρτημένης ανακοίνωσης στο 11ο πανελλήνιο Ηπατολογικό συνέδριο 2009
2. Βραβεία και αριστεία προόδου σε όλες τις τάξεις γυμνασίου και λυκείου

ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλικά Άριστα (O'Level English 1995)
Γαλλικά Ικανοποιητικά (Sorbonne 1 1995)

Η/Υ

Πολύ καλή γνώση MS Windows, MS Word, MS Power Point, Internet

Καλή γνώση MS Excel