



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**<<ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΤΑΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΤΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΝΕΕΣ  
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ>>.**

**ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΚΑΙ ΒΙΟΦΥΣΙΚΗΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**<<ΜΕΛΕΤΗ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΟΠΑΘΕΙΩΝ ΣΤΟΝ ΕΛΛΑΔΙΚΟ ΧΩΡΟ.  
ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΙΑ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΤΟΥ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟΥ  
ΜΕ ΕΝΗΜΕΡΩΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΛΗΨΗ >>**

**ΚΥΡΙΤΣΑΚΑ ΑΣΠΑΣΙΑ**

**Τεχνολόγος Ιατρικών Εργαστηρίων**

**A.M :226604**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
ΑΛΕΠΟΡΟΥ-ΜΑΡΙΝΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ**

**ΑΘΗΝΑ 13/11/2014**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

**ΑΛΕΠΟΡΟΥ-ΜΑΡΙΝΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημικής & Μοριακής Γενετικής, Πανεπιστημίου Αθηνών.

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**ΑΛΕΠΟΡΟΥ-ΜΑΡΙΝΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημικής & Μοριακής Γενετικής, Πανεπιστημίου Αθηνών.

**ΙΣΙΔΩΡΑ ΠΑΠΑΣΙΔΕΡΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ & ΒΙΟΦΥΣΙΚΗΣ**

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κυτταρικής και Αναπτυξιακής Βιολογίας, Πανεπιστημίου Αθηνών.

**ΚΟΛΛΙΑ ΠΑΝΑΓΟΥΛΑ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

Επικουρη Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου, Πανεπιστημίου Αθηνών

*ΤΟΠΟΣ ΔΙΕΞΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ*

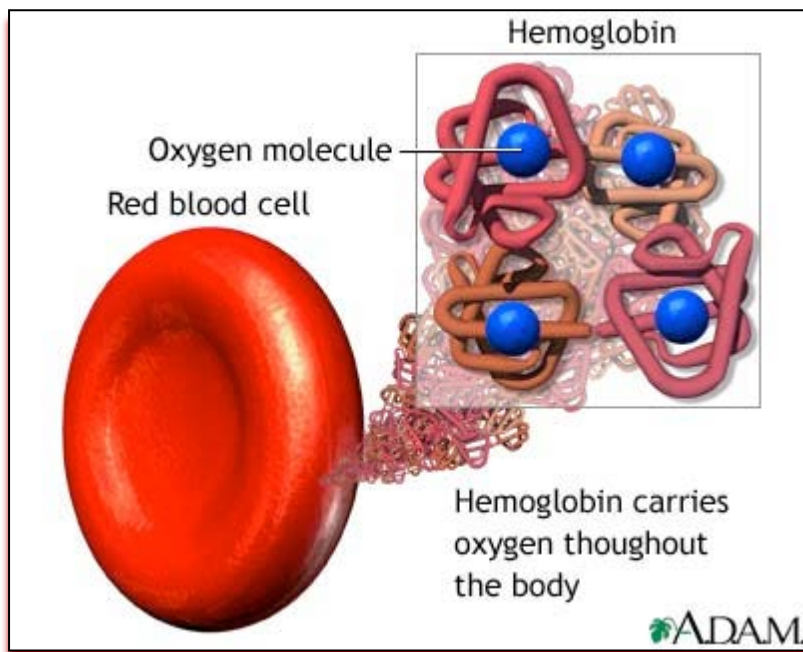
*ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ*

*ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΑΣ & ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΑΣ*

**Διευθυντής Εργαστηρίου: Καθηγ. Κουκούλης Γεώργιος**

**Υπεύθυνη .Μορ. Ελέγχου: Επίκουρη Καθηγ. Σαμαρά Μαρία**

# *A-Thal*



# *B-Thal*

# *HbS*

Στην Μητέρα μου.

*<< Δεν θα ανακάλυπτα δίχως εσένα την ψυχή μου  
Μεγαλώνει στο βλέμμα μου ο θρόμβος του ιδρώτα σου  
γίνεται μάζα νερού που γκρεμίζεται από ένα φηλό καταρράχτη.  
Γνωρίζω τα δάκρυα , το αίμα σου. Μια ζωή και δεν έφυγαν ποτέ  
από τα χέρια μου. Πλάθω τον πόνο σου καθώς ο καλός Σιφναίος  
τον πηλό σου.  
Δίχως εσένα ,τον δικό σου πηλό εγώ δεν θα είχα όνομα...όνειρα...>>*

**Στον γιό μου**

*<< Σ ευχαριστώ για την υπομονή σου >>*

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περιεχόμενα.....	6
Πρόλογος -Ευχαριστίες .....	9
Σύντομο Βιογραφικό Σημείωμα.....	11-13
<u>Α.ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ –ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ</u>	
<u>Α1.ΜΕΡΟΣ</u>	
1.Εισαγωγή .....	14-19
1.1 ΙστορικήΑναδρομή.....	20
1.2 Αιμοσφαιρίνη.....	20
1.2.1Δομή και Λειτουργία.....	21
1.2.2Γονίδια και Σύνθεση της Αιμοσφαιρίνης.....	22-23
2.Μεσογειακά Σύνδρομα.....	24
2.1Εισαγωγή	
2.2 α-Μεσογειακή Αναιμία.....	25-26
2.2.2Μοριακή Βάση της α-Μεσογειακής Αναιμίας.....	27-30
2.2.3Παραλλαγές της α-Μεσογειακής Αναιμίας.....	31
2.2.4.Σπάνιες α-αιμοσφαινοπάθειες που οφείλονται σε ασταθείς α-αλυσίδες.....	32-34
2.2.5Κινική αντιμετώπιση της α-Μεσογειακής Αναιμίας.....	35
2.3 β-Μεσογειακή Αναιμία.....	35-39
2.3.1Μοριακή Βάση της β-Μεσογειακής Αναιμίας.....	40
2.3.2 Παραλλαγές της β-Μεσογειακής Αναιμίας.....	41
2.3.3Ενδιάμεση β-Μεσογειακή Αναιμία.....	44
2.3.3.1Παθοφυσιολογία των κλινικών εκδηλώσεων.....	45
2.3.3.2ΕργαστηριακήΔιερεύνηση.....	47
2.3.3.3 Θεραπευτική αντιμετώπιση.....	48
2.3.3.4 Γονιδιακή Θεραπεία: Παρούσα φάση και Μελλοντικές Προοπτικές.....	56

2.4 Δρεπανοκυτταρική Αναιμία	
2.4.1 Εισαγωγή- Ιστορική Αναδρομή.....	57
2.4.2 Παθογένεια.....	58
2.4.3 Αιμοσφαιρινοπάθεια S-Δρεπανοκυτταρικά σύνδρομα.....	59
2.4.4 Κλινική Εικόνα.....	60-64
2.4.5 Διάγνωση.....	65-69
2.4.6 Αντιμετώπιση και Θεραπεία.....	70
<u>A2. ΜΕΡΟΣ</u>	
2.5. Ψυχολογική υποστήριξη θαλασσαιμικών πασχόντων.....	71-75
<u>A.3 ΜΕΡΟΣ</u>	
2.6 Αναλυτικές και Φυσικοχημικές Τεχνικές Διάγνωσης των αιμοσφαινοπαθειών	
2.6.1 Εισαγωγή-Μεθοδολογία.....	76
2.6.2 Ηλεκτροφορητικές και Χρωματογραφικές Τεχνικές.....	79
<u>A.4. Εργαστηριακό Μέρος. Υλικά και Μεθοδολογία</u>	
2.7 Επιλογή δειγμάτων.	
Αποτελέσματα.....	79-83
2.7.1 Διαδικασία αξιολόγησης αιματολογικών δεδομένων.....	84-90
<u>A.5. ΜΕΡΟΣ</u>	
Πίνακες μεταλλάξεων αιμοσφαιρινοπαθειών στον Ελληνικό χώρο.	
Παλαιά και Νεότερα δεδομένα.....	90
Χάρτες συχνοτήτων αιμοσφαιρινοπαθειών στην Ελλάδα και Παγκοσμίως.....	93-95
Στατιστικά δεδομένα β-ΜΑ στην Ελλάδα.....	96
<u>A.6. Συζήτηση.....</u>	
<u>A.7. Περίληψη</u>	
Ελληνική.....	99-100
Αγγλική.....	100-101

## Β. ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

Εισαγωγή.....	103
Περιγραφή Περιστατικού.....	104-106
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	107-115



## Πρόλογος-Ευχαριστίες

Οι αιμοσφαιρινοπάθειες είναι μια κατηγορία κληρονομικών, γενετικών νοσημάτων στα οποία εντάσσονται κυρίως η δρεπανοκυτταρική νόσος και οι θαλασσαιμίες που ευθύνονται για σημαντικό ποσοστό γεννήσεων ατόμων με γενετικά νοσήματα. Η θαλασσαιμία είναι μια ετερογενής ομάδα γενετικών νοσημάτων στα οποία η παραγωγή φυσιολογικής αιμοσφαιρίνης είναι μερικώς ή τελείως κατεσταλμένη λόγω ελαττωματικής σύνθεσης της ή περισσοτέρων αλυσών σφαιρίνης. Ανάλογα με της αλυσούς που εμφανίζουν ελαττωματική σύνθεση έχουν περιγραφεί διάφοροι τύποι θαλασσαιμίας. Οι συνήθεις τύποι που εξετάσαμε με σοβαρή κλινική σημασία είναι η μείζων β, η δβ και η α-θαλασσαιμία.

Με την παρούσα εργασία μελετήσαμε της παραπάνω τύπους των αιμοσφαιρινοπαθειών, την κατανόηση της μοριακή της βάσης και των εμπλεκόμενων μηχανισμών στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων σφαιρίνης στα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια του ανθρώπου, την αποτελεσματική πρόληψη διάγνωση, θεραπεία των ατόμων με θαλασσαιμικά σύνδρομα, την εξάπλωση της, την γεωγραφική της κατανομή στον Ελλαδικό χώρο και ευρέως ανά την υφήλιο καθώς συνιστούν ένα παγκόσμιο πρόβλημα δημόσιας υγείας.

Ακολούθησε η διδακτική προσέγγιση που αφορά νέους ιατρούς μετά την απόκτηση του του τίτλου σπουδών τους ,έχοντας ως πρόταιρη γνώση τον τομέα της Αιματολογίας και των Βιολογικών εννοιών στην διάγνωση των Αιμοσφαιρινοπαθειών.

Ένα ενδεικτικό πειραματικό μέρος πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Ιστοπαθολογίας και Παθολογοανατομίας , του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη της Επίκουρης Καθηγήτριας κας Σαμαρά Μαρίας, νέα συνεργάτης με εμπειρία στις μοριακές τεχνικές και άρτια επιστημονική κατάρτιση.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Παπασιδέρη, Αναπληρώτρια Διευθύντρια του Μ.Δ.Ε που με έδωσε την ευκαιρία να συμμετάσχω στο πρόγραμμα σπουδών, πίστεψε σε εμένα, με ενθάρρυνε,με στήριξε στην δύσκολη προσπάθεια μου λόγω απόστασης ανοίγοντας μου νέους ορίζοντες και επιτρέποντάς μου να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον κομμάτι της διδακτικής της Βιολογίας .

Συμπληρωματικά, αφιερώνω ένα τμήμα του ευχαριστηρίου λόγου στην επιτηρούσα καθηγητική μορφή του προσωπικού μου μεταπτυχιακού εκπονήματος , κα Αλεπόρου Μαρίνου Βασιλική για την άμετρη κι αναμφίβολη εμπιστοσύνη που επέδειξε της το πρόσωπο μου καθ'όλη τη διάρκεια του εν λόγω ψυχοφθόρου εγχειρήματος, τη σταθερή και απαρέγκλιτη της καθοδήγηση και την άρτια επιστημονική κατάρτιση στο αντικείμενο μελέτης της, της θεμελιώδεις αρχές του οποίου μερίμνησε να μου μεταλαμπαδεύσει .

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον κ.Βαμβακόπουλο Νικόλαο Καθηγητή Βιολογίας του Πανεπιστημίου Ιατρικής Θεσσαλίας για την εμπιστοσύνη που έδειξε όλα αυτά τα χρόνια συνεργασίας της στο εργαστήριο Μοριακής Γενετικής και Κυτταρογεννητικής για την

επιστημονική του κατάρτιση στο χώρο της Μοριακής Βιολογίας και την προτροπή του για την συμμετοχή μου στο Μ.Δ.Ε, και πάνω από όλα άνθρωπο για της φιλικές του συμβουλές. Ευχαριστώ την κα Κόλλια Παναγούλα ,Επίκουρη Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου του Πανεπιστημίου Αθηνών και πρώην Διευθύντρια μου για την άψογη συνεργασία της στο εργαστήριο Μοριακής-Γενετικής του Π.Π.Γ.Ν.Α, την επιστημονική κατάρτιση της στον τομέα των Μοριακών Τεχνικών και την προσπάθεια της για την εύλογη λειτουργία του εργαστηρίου αλλά πάνω από όλα την εχεμύθεια της και ανθρώπινη συμβολή της στους συνεργάτες της.

Ευχαριστώ της συναδέρφους του εργαστηρίου(Μοριακής Γενετικής) και ιδίως την κα. Βλαχοπούλου Κλεοπάτρα Τεχνολόγο Ιατρικών Εργαστηρίων του Π.Π.Γ.Ν.Α για την μακροχρόνια απουσία μου από το εργαστήριο, την ψυχολογική της στήριξη και το άριστο κλίμα συνεργασίας καθώς και την κα Τζαβέλα Αναστασία υπεύθυνη της Μονάδας Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής του Π.Π.Γ.Ν.Α, συνάδερφο και προσωπική μου φίλη για την βοήθεια της προσαρμογής μου στην Αθήνα όλο αυτό το χρονικό διάστημα.

Τους συναδέρφους, κα Βέρα Μπαλαμίτσα ,Βιολόγο υπεύθυνη της μονάδας Πρόληψης Μεσογειακής Αναιμίας στο Νοσοκομείο Τρικάλων και τον κο Σαΐτη Ιωάννη Βιολόγο υπεύθυνο εξωτερικού εργαστηρίου Κρήτης για τα στατιστικά στοιχεία που μου παραχώρησαν .

Ευχαριστώ της δύο συμφοιτήτριες μου, κα Παναγιώτα Βλόνταρτζικ, Βιολόγος και την κα Θάλεια Θεοδωράκη, Βιολόγος για την πολύτιμη βοήθεια της στην περαίωση του Μ.Δ.Ε και στην διδακτική προσέγγιση της στο τομέα της Βιολογίας καθώς την οικογένεια μου και τον σύντροφο της ζωής μου για την ενθάρρυνση, την υποστήριξη την εμπιστοσύνη και την υπομονή τους σε εμένα αυτά τα δυο χρόνια διότι χωρίς αυτούς δεν θα είχα τη δυνατότητα να ξεκινήσω και να ολοκληρώσω αυτή τη μελέτη.

## Σύντομο Βιογραφικό Σημείωμα

**ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ:** Κυριτσάκα Ασπασία  
**ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ:** Ηροδότου 29 Λάρισα  
**ΧΡΟΝΟΣ ΚΑΙ ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ** **13 Οκτωβρίου 1970**, Λάρισα  
**ΟΙΚΟΓΕΝ. ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ** Διαζευγμένη με ένα παιδί

### ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΙΤΛΟΙ ΣΠΟΥΔΩΝ

**1989-1991** : << Σχολές Paster >> Πτυχίο Βοηθού Ιατρικών Εργαστηρίων βαθμός πτυχίου 20 <<Άριστα>>

**1991-1995** : << Τεχνικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα (ΤΕΙ)>> Λάρισα, βαθμός πτυχίου 6.7 <<Λίαν Καλώς>>

**2007** : <<Ευρωπαϊκή προφορική >>Πτυχίο Η/Υ προγραμματιστών Microsoft Office XP 2002 (Ms Excel, Ms Power Point, Ms Internet Explorer, Ms Word)

**ΜΕΤΑΠ/ΚΕΣ ΣΠΟΥΔΕΣ:** Τελειόφοιτη στο Μ.Δ.Ε(2012-2014) του Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών του τμήματος Βιολογίας με τίτλο <<Διδακτική των Βιολογικών Μαθημάτων και των Νέων τεχνολογιών>>(Mhd)

**ΠΑΡΟΥΣΑ ΘΕΣΗ: 2014** Δημόσιος Υπάλληλος ΕΣΥ, κλάδος ΤΕ Τεχνολόγων Ιατρικών Εργαστηρίων Εργ. Μοριακής Ιστοπαθολογίας (Παθολογοανατομίας &Κυτταρολογίας) Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισα (ΠΓΝΛ) σε συνεργασία με Πανεπιστήμιο Ιατρικής Θεσσαλίας.

### ΠΡΟΗΓΟΥΜΕΝΕΣ ΘΕΣΕΙΣ

**1996-2002** : Γενικό Νοσοκομείο. <<Ελενα Βενιζέλου>>, Τμήμα Αιμοδοσίας Αθήνα **2002-2006** : Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισα, τμήμα (Παθολογοανατομίας &Κυτταρολογίας) Λάρισα

**2006-2013** : Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισα, τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, ΠΓΝΛ, Λάρισα

### ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

**2004-2005** : Διδασκαλία Μαθήματος Δερματολογίας, ΙΕΚ Λάρισα

**2008-2011:** Επιστημονικός εργαστηριακός συνεργάτης εκπαίδευσης φοιτητών Ιστοπαθολογίας, Τμήμα Ιατρικών Εργαστηρίων (ΣΕΥΠ) Λάρισα.

### Πρωτότυπες Δημοσιεύσεις

1. Satra M, Vamvakopoulou DN, Sioutopoulou DO, Kollia P, **Kiritsaka A**, Sotiriou S Antonakopoulos G, Alexandris E, Costantoulakis P, Vamvakopoulos NC. 2009. **Sequence-based**

genotyping HPV L1 DNA and RNA transcripts in clinical specimens. *Pathol Res Pract.*, 205:863-9.

2. Lialiaris TS, Kouskoukis A, (-), **Kiritsaka A**, Athanassiou E, Lialios GA, Sotiriou S Sidiropoulos A, Vamvakopoulos NC. 2011. Expression of 6 common antigenic markers in invasive ductal breast carcinoma: potential clinical implications. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 19:106-11.

### **Άρθρα Ανασκόπησης**

Nomikos I, (-), **Aspasia Kyritsaka A**<sup>+</sup>, Athanassiou E, Vamvakopoulos N. 2012. On the management of hyperglycaemia in critically ill patients undergoing surgery. *Journal of Clinical Medicine Research*, in press.

### **Συμμετοχή σε Διεθνή Επιστημονικά συνέδρια**

#### Τίτλοι Ανακοινώσεων-Poster

- 1.26<sup>th</sup> congress of the international society of «blood transfusion» Vienna, 2000.
- 2.12<sup>th</sup> Congress of the EHA Vienna,Austria 2007.
3. Plakokefalos E, Siotopoulou D, **Kyritsaka A**, (-), Vamvakopoulos N. 2007. Adaptive changes induced in human cervical adenocarcinoma (Hela) cells surviving acute infection by influenza A (H3n2) virus.
4. Siotopoulou D, **Kyritsaka A**, Destouni C, Satra M, Kollia P, Vamvakopoulos N. 2008.Genotyping prevalent L1 HPV DNA and RNA by one strand sequencing as complementary marker to the course of viral infection.
- 5.33rdFEBS Congress&11<sup>th</sup> IUBMB Conference 2008.
6. **Kyritsaka A**, Sioutopoulou D, Vamvakopoulos N. 2009. Response of human cervical adenocarcinoma Hella Cells to infection by non-oncogenic influenza viruses: potential implications for biological management of cancer-like human disease.
7. Training in Sample Preparation (tataabiocenter)Freising – Germany2009
- 8.34<sup>th</sup>FEBS Congress Prague Czech Republic2009.
- 9.Internactional Symosium Cartilage Biology 2009.
10. Lialiaris, T, (-), **Kyritsaka A**, (-), Vamvakopoulos NC. 2010. Expression of 6 Common Antigenic Markers In Invasive Ductal Breast Carcinoma:Potential Cilinical Impications.
11. Manolakis A, (-), **Kyritsaka A**, Vamvakopoulos N, Potamianos S. 2011. Comparative distribution of Toll-like Receptor-2 and -4 Gene Polymorphisms in patients with inflammatory bowel disease.

### **Συμμετοχή σε Ελληνικά Επιστημονικά συνέδρια – σεμινάρια**

1. Λοίμωξη ιού ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας, Αθήνα 1997
2. 9<sup>ο</sup> πανελλήνιο συνέδριο «AIDS(HIV)», Αθήνα 1997
3. 10<sup>ο</sup> πανελλήνιο συνέδριο «AIDS(HIV)», Ημερίδα, Αθήνα 1998
- 4.«Μεθ-αιμόσταση» – ημερίδα, Αθήνα 1999
5. «Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα και σύνδρομα μυελικής ανεπάρκειας»1999
6. «Ποιοτική διασφάλιση στην Αιμοδοσία», διάρκειας 150 2000.

7. 4<sup>η</sup> ημερίδα , φροντίδα καρκινοπαθών και μη ασθενών» (ΠΑΡΗ.ΣΥ.Α.) 2005
8. 7<sup>ο</sup>Πανελλήνιο Συνέδριο Ελλην.Κυτταρολογικής Εταιρείας 2006
9. Συμμετοχή στο συμπόσιο με τίτλο «Μοριακή διαγνωστική και γενετική».2006
- 10.Συμμετοχή στο συνέδριο «Βιοεπιστήμες του 21<sup>ο</sup> αιώνα».2006
11. 17<sup>ο</sup> πανελλήνιο συνέδριο αιματολογίας 2006
12. Επιμόρφωση Ενηλίκων ``Βασικές Δεξιότητες της Νέες Τεχνολογίες´2006
13. Πρόγραμμα Κατάρτισης Εργαζομ. Σε βασικές δεξιότητες χρήσης ΤΠΕ.2007
14. 18<sup>ο</sup> πανελλήνιο αιματολογικό συνέδριο 2007
15. Προαγωγή και διασφάλιση της Δημόσιας Υγείας στη Θεσσαλία 2007
16. 8<sup>ο</sup> παιδιατρικό συμπόσιο, Λάρισα 2008
17. 11<sup>ο</sup> πανελλήνιο συνέδριο παθολογικής ανατομικής 2008
18. Ημερίδα Συνεχιζόμενης Εκπαίδευσης Επαγγελματιών Ψυχικής Υγείας´´2008
19. Πιστοποιητικό Εκπαίδευσης ``Λειτουργίας αναλυτή GTBlot 20´´2009
20. 3<sup>η</sup> Σύνοδος ΕΛΕΕ HPV-λοίμωξη-Testing-εμβολιασμός 2010
21. 30<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας 2010
- 22.2<sup>ο</sup>Πανελλήνιο Επιστ. Επιμορφ. Πρόγρ.-Ημερίδα Τεχνολόγων Ιατρικών Εργαστηρίων 2011
- .
23. 4<sup>ο</sup> Συνέδριο Παθολογίας Κεντρικής Ελλάδος 2012
24. Σεμινάριο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής&Κυτταρολογίας  
´ Νεότερες Εξελίξεις στην Πρόληψη του Καρκίνου του Τραχήλου της μήτρας 2012´´.
25. Ζ´ Κύκλος Μετεκπαιδευτικών Μαθημάτων Τομέας Χειρουργικής Ιατρικού Τμήματος με θέμα: <<Βασικές Αρχές Πρόληψης &Αποκατάστασης στη Χειρουργική 2012.

## Α.ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ –ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

### 1.Εισαγωγή-1.1 Ιστορική αναδρομή

Η μελέτη της ανθρώπινης αιμοσφαιρίνης κατά την διάρκεια των τεσσάρων τελευταίων δεκαετιών συνέβαλλε σημαντικά στην κατανόηση των βασικών αρχών της Γενετικής και διαμόρφωσε μια γόνιμη περιοχή ανάπτυξης και εφαρμογής μεθόδων μοριακής προσέγγισης των ασθενών .

Το 1925 οι Cooley & Lee περιέγραψαν 5 παιδιά με συμπτώματα : ***Βαρειάς Αναιμίας Ηπατοσπληνομεγαλία, Οστικές παραμορφώσεις, έντονη Μελάχρωση Λευκοκυττάρωση-Ερυθροβλαστοκυττάρωση .***

Η ομάδα αυτή των ασθενειών απεδείχθη σαν το πιο συχνό μονογονιδιακό νόσημα με παγκόσμια διασπορά. Επιχειρήσαμε λοιπόν μια σύντομη ανασκόπηση της εντυπωσιακής διαχρονικής εξέλιξης, της επιδημιολογίας, της γενετικής ετερογένειας και της αντιμετώπισης της νόσου .

Τρεις βασικές περιόδους σηματοδοτούν αυτήν την εξέλιξη :

#### **Περίοδος Πρώτη (Αρχική 1925-1950)**

Χαρακτηρίζεται από συλλογή δεδομένων που οριοθέτησαν την κλινική ετερογένεια και την γενετική βάση των Μεσογειακών Συνδρόμων (Μ.Σ)

#### **Περίοδος Δεύτερη (1950-1975)**

Ταυτίζεται με την εξέλιξη της βιοχημείας και την μελέτη της δομής των πρωτεϊνών Στην περίοδο αυτή εφαρμόστηκαν νέες αιματολογικές και βιοχημικές μέθοδοι στην διάγνωση και στην μελέτη της παθοφυσιολογίας της νόσου και τέθηκαν οι βάσεις της θεραπείας και της πιθανής πρόληψης.

#### **Περίοδος Τρίτη(1975 έως και σήμερα)**

Χαρακτηρίζεται από τη ταχεία πρόοδο της Μοριακής Βιολογίας και της Γενετικής και την εφαρμογή των μοριακών τεχνικών στην διάγνωση ,στην πρόληψη, στην θεραπεία και στην πρόδρομη έρευνα της γονιδιακής θεραπείας.

Θα πρέπει να προστεθεί και η προϊστορική περίοδος, όπου καταγράφονται ενδιαφέροντα ευρήματα που επιβεβαιώνουν την παρουσία της νόσου στο Μεσογειακό χώρο. Χαρακτηριστικά είναι τα ευρήματα που βρέθηκαν στον παλαιολιθικό οικισμό της Χειροκοιτίας στην Κύπρο σε σκελετούς παιδιών και μελετήθηκαν με μοριακές μεθόδους ανάλυσης.

## Αρχική Περίοδος(1925-1950)

Στην πρώτη περίοδο Αμερικανοί και Ευρωπαίοι ,κυρίως Ιταλοί αποτυπώνουν τα βασικά κλινικά ,εργαστηριακά και γενετικά χαρακτηριστικά της νόσου και αναζητούν την πιο πρόσφορη ονοματολογία ανάμεσα της της που έχουν προταθεί.( *Von Jaksch 1889 Cooley and Lee 1925, Rietti1925, Cooley et al 1927, Whipple and Bradford 1932, Michelli et al 1935, Valentine and Neel 1944*).

Από τον μεγάλο αριθμό των προτάσεων για την ονοματολογία (Πίνακας 1.) επικράτησαν

α) στην διεθνή ονοματολογία ο όρος «*thalassemias*» ή «*Thalassemia Syndromes*»

β) στην Ελληνική ο όρος Μεσογειακή Αναιμία(M.A) ή σύνδρομα Μεσογειακής Αναιμίας

και οι πιο σπάνιοι όροι <<Θαλασσαιμία ή Θαλασσαιμία >> και <<Νόσος ή Αναιμία Cooley >>

Από της μελέτες της περιόδου της αναγνωρίστηκαν:

α) Η κλινική και εργαστηριακή ετερογένεια της νόσου και καθορίστηκαν οι βασικοί και κλινικοί φαινότυποι της μείζονος ,της ενδιάμεσης και της ελάσσονος ,η minima M.A της και του συνδυασμού μεσογειακής αναιμίας με δρεπανοκυτταρική.

Β) Ο οικογενής χαρακτήρας της νόσου. Από τις εργασίες της Καμινόπετρου (1939),επιβεβαιώθηκε η μενδέλειος κληρονομικότητα υπολειπόμενου σωματικού τύπου.

Η επιβεβαίωση βασίστηκε στην μελέτη οικογενειών ,της οποίες και της δύο γονείς βρέθηκαν σταθερά αύξηση της αντίστασης των ερυθρών, μικροκυττάρωση και υποχρωμία.

Γ) Η παρουσία της νόσου και σε της λαούς εκτός των μεσογειακών .

δ)Η αποτελεσματική θεραπεία με σπληνεκτομή και μεμονωμένες μεταγγίσεις.

Η εφαρμογή συχνών μεταγγίσεων ήταν αδύνατη λόγω :

α) συχνών και σοβαρών επιπλοκών, β)αδυναμία συντηρήσεως αίματος και ελέγχου συμβατότητας του αίματος γ) δυσκολίες εφαρμογής της μετάγγισης που απαιτούσαν σύγχρονη χορήγηση από τον δότη στον άρρωστο και ειδικές συσκευές.

Για λόγους ιστορικούς αναφέρεται ότι η χρήση συντηρημένου αίματος της μεταγγίσεις εφαρμόζεται μετά τον Β΄ παγκόσμιο πόλεμο όποτε άρχισαν να δημιουργούνται οι πρώτες Τράπεζες αίματος στην Αμερική.



**Ανασκόπηση προτάσεων ορισμού M.A. με βάση κλινικά, αιματολογικά και γενετικά ευρήματα**

<u>Συγγραφείς</u>	<u>Ευρήματα – Ορισμός</u>
1889 Von Jaksch	“Anemia Infantum Pseudoleucemia”
1925 Cooley and Lee	Mongoloid facies, bone changes, osmotic resistance
1921 Rietti	“Ittero Emolitica Familiare”
1927 Cooley	“Erythroblastic Anemia” Med. Races
1931 Greppi	Polycythemia, microcytosis
1932 Whipple and Bradford	“Thalassemia ”
1935 Micheli et al	“Ellitocitosi – poichilocitosi”
1938 Capinopetros	Mendelian Recessive
1940 Wintrobe et al	The minor ..... form Cooley’s anemia
1940 Dauneshek et al	Target cell anemia a “forme fruste”
1942 Gatto	Eterozigote -stigmata, omozigote -malattia
1944 Valentine and Neel	“Thalassemia major and minor”
1944 Silvestroni and Bianco	Microdrepanocitica

Πίνακας 1.

**Δεύτερη Περίοδος (1950-1975)**

Στην δεύτερη περίοδο η εφαρμογή βελτιωμένων τεχνικών στην μελέτη της δομής των πρωτεϊνών και της βιοσύνθεσης των πολυπεπτιδικών αλυσίδων, της και η καθιέρωση αξιόπιστων μεθόδων διάγνωσης ,καθόρισαν τα κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των αιματολογικών φαινοτύπων και προσδιόρισαν της άξονες της πρόληψης και θεραπείας των μεσογειακών συνδρόμων .

Στην πρόοδο της περιόδου της η συμβολή της Ελληνικής Ιατρικής και ιδιαίτερα των Πανεπιστημιακών κλινικών, υπήρξε σημαντική και με αξιόλογη διεθνή αναγνώριση.

Ο προσδιορισμός της δομής της φυσιολογικής αιμοσφαιρίνης έδωσε το έναυσμα για την μελέτη της M.A.

Το μόριο της αιμοσφαιρίνης είναι τετραμερές και αποτελείται από ένα πρωτεϊνικό κλάσμα και από 4 μόρια αίμης. Το πρωτεϊνικό κλάσμα συνθέτουν δύο ζεύγη πολυπεπτιδικών αλυσίδων (Πίνακας 2.) Οι τρεις φυσιολογικές αιμοσφαιρίνες A,F και A2 έχουν κοινό το ένα ζεύγος της α-αλυσού και διαφέρουν στην δομή του δεύτερου ζεύγους, που είναι η β για την



A, η γ για την F και η δ για την A2. Στον ενήλικα επικρατεί η αιμοσφαιρίνη HbA σε ποσοστό >95% (Lehmann and Hunstman, 1974).

Πίνακας 2. Πρωτεϊνική Δομή και Ποσοστά Φυσιολογικών Αιμοσφαιρινών Ενήλικου		
Είδος Hb	Δομή Πρωτεϊνικού Κλάσματος	Ποσοστό
A	$\alpha_2 \beta_2$	>95%
F	$\alpha_2 \gamma_2$	<2%
A2	$\alpha_2 f_2$	>3.5%

Πίνακας 2.

Από της μελέτες που ακολούθησαν ,διαπιστώθηκαν σε ομάδα αναιμιών ποιοτικές και ποσοτικές διαταραχές στην σύνθεση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Οι αναιμίες αυτές χαρακτηρίστηκαν με τον γενικό όρο *Αιμοσφαιρινοπάθειες* .Από τα σύνολα των αιμοσφαιρινοπαθειών διαχωρίστηκαν τα σύνδρομα της Μεσογειακής Αναιμίας.

Η περίοδος αυτή χαρακτηρίζεται από συστηματικές και εκτεταμένες επιδημιολογικές μελέτες για την χαρτογράφηση της γεωγραφικής κατανομής των αιμοσφαιρινοπαθειών. Αδρές εκτιμήσεις ανεβάζουν τον αριθμό των φορέων μεσογειακής και δρεπανοκυτταρικής αναιμίας πάνω από 300 εκατομμύρια παγκοσμίως (WHO 1983)

Οι επιδημιολογικές μελέτες της γεωγραφικής κατανομής έδειξαν :

α) Εντόπιση της M.A σε πληθυσμούς της Μεσογείου, της εγγύς και της Μέσης Ανατολής της Ασίας ,ιδιαίτερα της νοτιοανατολικής και της Αφρικής.

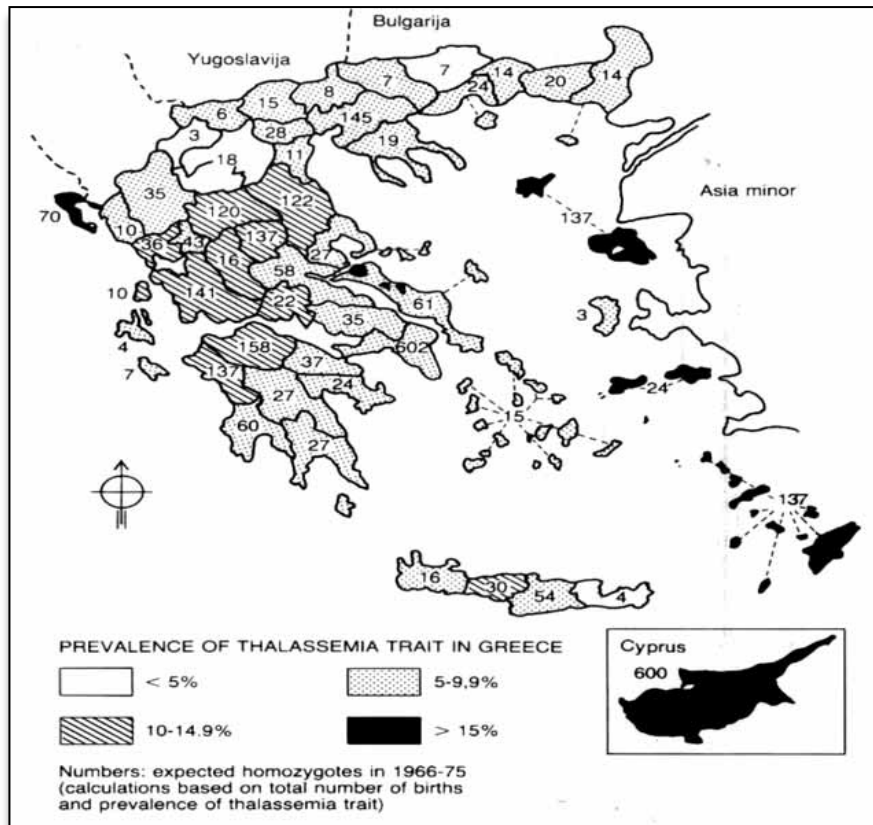
β) Πληθυσμιακές διαφορές στην συχνότητα της νόσου : της μεγαλύτερη συχνότητα και βαρύτητα της κλινικής εικόνας της M.A σε Ασιατικούς πληθυσμούς, και μικρότερη συχνότητα με ηπιότερη βαρύτητα της β-Μεσογειακής Αναιμίας στην Αφρική.

γ)Εκλεκτική εντόπιση της Δρεπανοκυτταρικής αναιμίας σε πληθυσμούς της Αφρικής με μικρές εστίες σε χώρες της Μεσογείου και της Μέσης Ανατολής, της HbE, στην Ασία και της C στην Δυτική Αφρική.

δ) Απουσία αιμοσφαιρινοπαθειών σε λαούς της Βόρειας ,Δυτικής .Κεντρικής και Ανατολικής Ευρώπης και της Αυστραλίας (Weatherall et Clegg 2000).

Ανάλογες επιδημιολογικές μελέτες ,επέτρεψαν την ακριβή χαρτογράφηση της γεωγραφικής κατανομής των αιμοσφαιρινοπαθειών και στην Ελλάδα(Kattamis,1980 )

Όπως φαίνεται από το χάρτη (Εικόνα 1.) υπάρχει μεγάλη ετερογένεια στην γεωγραφική κατανομή των φορέων της β-Μεσογειακής Αναιμίας.



Εικόνα 1.

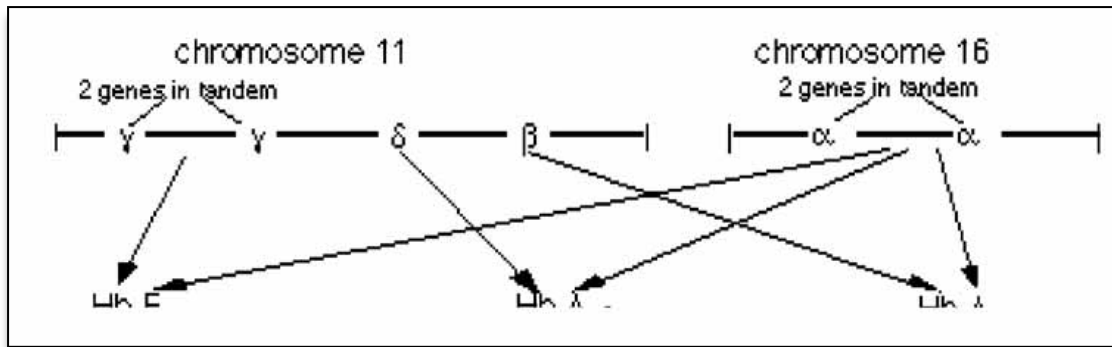
*Επιδημιολογία ετερόζυγης β-Μεσογειακής Αναιμίας στην Ελλάδα .Οι αριθμοί δηλώνουν της αναμενόμενες γεννήσεις ομοζυγών στην δεκαετία 1965-1975 και την συχνότητα των ετεροζυγών στον πληθυσμό κάθε περιοχής (Kattamis. C1980).*

Παρατηρούνται περιοχές υψηλής συχνότητας με ποσοστά >15 και 20% (της η Ρόδος η Κύπρος ,η Καρδίτσα ),περιοχές μέσης συχνότητας 10-15% και 5-10% και χαμηλής 5% της και στη Βόρεια Ελλάδα.

### Τρίτη Περίοδος (1975-έως και σήμερα)

Η Τρίτη περίοδος χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη της μοριακής ιατρικής και τη εφαρμογή συνεχώς βελτιούμενων τεχνικών για την ακριβή μελέτη της δομής του DNA.

Το πρώτο επίτευγμα ήταν η χαρτογράφηση των γόνων των πολυπεπτιδικών αλυσίδων και συγκεκριμένα των γόνων (ε,γ<sup>G</sup>,γ<sup>A</sup>,δ και β) του συμπλέγματος της β αλυσίδας στο χρωμόσωμα 11 και των γόνων ( ζ,α2,α1) του ασυμπλέγματος στο χρωμόσωμα 16 (Εικόνα 2.)

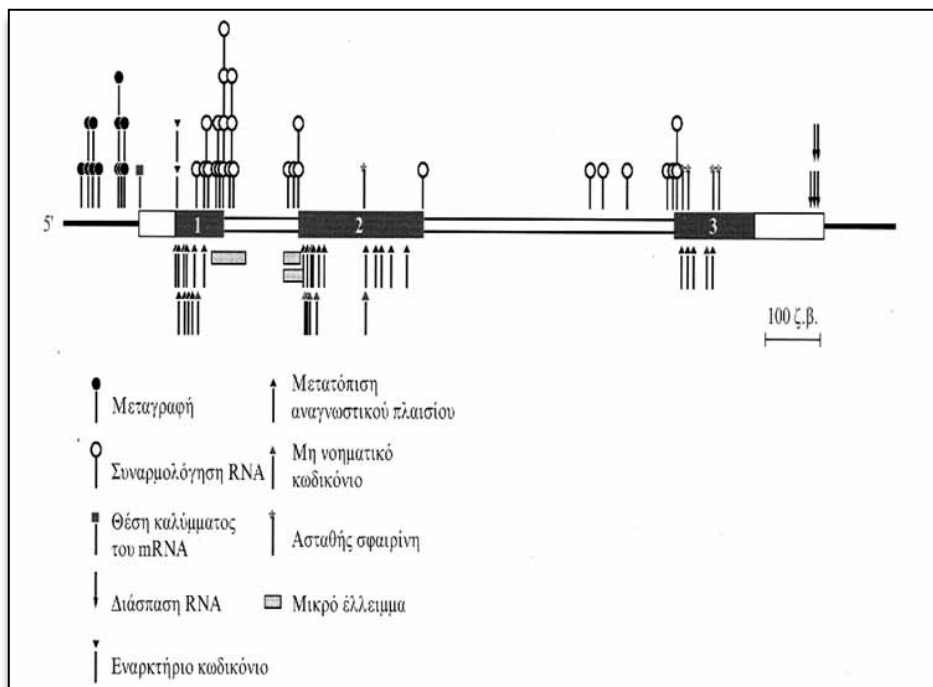


Εικόνα 2.

*Χαρτογράφηση των α και β συμπλεγμάτων των φυσιολογικών αιμοσφαιρινών  
(Kattamis C.1989)*

Το δεύτερο επίτευγμα της της περιόδου είναι η ανακάλυψη κα η περιγραφή των μεταλλάξεων του β γόνου σε αρρώστους με Μεσογειακή Αναιμία. Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί πάνω από 200 μεταλλάξεις του β γόνου (Εικόνα 3.) .Οι σημειακές αυτές μεταλλάξεις εντοπίζονται από την αρχή μέχρι το τέλος της μεταγραφής και όχι μόνο στα εξόνια και εσόνια.

Σημαντικό της ενδιαφέρον σε αυτήν την περίοδο ήταν η χαρτογράφηση της επιδημιολογίας και της πληθυσμιακής κατανομής των μεταλλάξεων της Μ.Α .



Εικόνα 3.Kattamis C.2004

## 1.2 Αιμοσφαιρίνη

### 1.2.1 Δομή και Λειτουργία

Της ανώτερους οργανισμούς, το οξυγόνο, στοιχείο απαραίτητο για τον προσπορισμό ενέργειας μέσω της οξείδωσης, μεταφέρεται της ιστούς με διάφορες αιμοπρωτεΐνες, που αποτελούν σύμπλοκα πρωτεΐνης και της μικρού μορίου στο κέντρο του οποίου υπάρχει ένα μέταλλο, συνήθως σίδηρος, που συνδέεται με το αέριο. Στα ανώτερα θηλαστικά και τον άνθρωπο η μεταφορά του οξυγόνου επιτελείται με την αιμοσφαιρίνη που κυκλοφορεί στα αγγεία μέσα σε ειδικά κατασκευασμένα σακίδια, τα ερυθροκύτταρα. Ο εγκλεισμός της εξυπηρετεί δύο προϋποθέσεις που κάνουν την λειτουργία της ευκολότερη και αποδοτικότερη. Στον υγιή άνθρωπο, η ποσότητα(στην κυριολεξία η “συγκέντρωση” της αιμοσφαιρίνης) στο αίμα είναι περίπου 13-15 g/dl. Ένα διάλυμα με αυτήν την πυκνότητα δύσκολα θα κυκλοφορούσε μέσα στα τριχοειδή. Από την άλλη πλευρά, το μοριακό βάρος της αιμοσφαιρίνης είναι 64,000 daltons. Αν ήταν απλά διαλυμένη στο πλάσμα, εύκολα θα διέφευγε από τον νεφρό. Κατά συνέπεια, τα ανθεκτικά αλλά και εύπλαστα ερυθροκύτταρα αποτελούν ιδανική λύση για την απρόσκοπτη μεταφορά της αιμοσφαιρίνης σε μεγάλη ποσότητα.

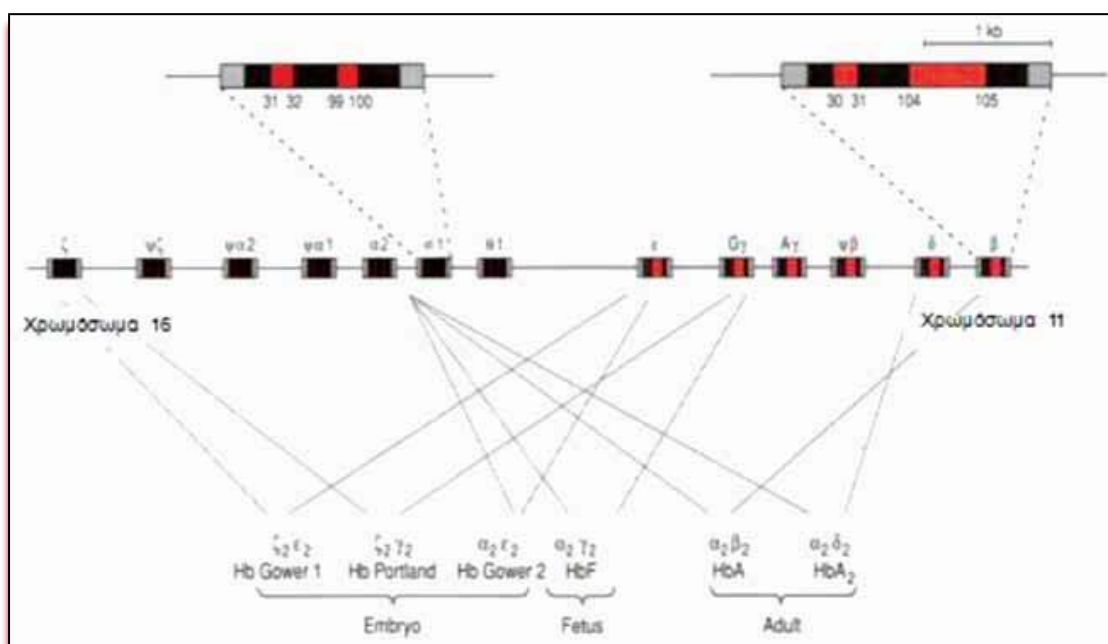
Η αιμοσφαιρίνη είναι ένα πολύ ενδιαφέρον μόριο, γιατί κορέννυται (100%) εύκολα με οξυγόνο της πνεύμονες(μερική πίεση 110 mmHg στον ατμοσφαιρικό αέρα, έως 90 mmHg της κυψελίδες), αλλά το αποδίδει προοδευτικά της ιστούς, όσο η μερική πίεση μειώνεται (μερική πίεση έως 40 mmHg έπειτα φλεβικό αίμα με κορεσμό 70%), εξασφαλίζοντας επαρκή οξυγόνωση από τα στεφανιαία αγγεία μέχρι τα τριχοειδή στα ακροδάκτυλα. Η λειτουργία αυτή επηρεάζεται από τη θερμοκρασία και το pH του αίματος και αποδίδεται γραφικά με τη γνωστή καμπύλη της “συγγένειας της αιμοσφαιρίνης με το οξυγόνο(ή της αποδέσμευσης του οξυγόνου από την αιμοσφαιρίνη). Η μοναδική και εξαιρετικά επακριβής αυτή ιδιότητα εξασφαλίζεται με την πολύπλοκη δομή του μορίου της αιμοσφαιρίνης.

Ένα μόριο αιμοσφαιρίνης αποτελείται από δύο ζεύγη όμοιων “αλυσίδων” (πολυπεπτίδια 140 περίπου αμινοξέων), σε κάθε μία από της οποίες προσαρτάται ένα μόριο αίμης. Υπάρχουν διάφορες αλυσίδες, που προέρχονται από μια κοινή προγονική μορφή (η έναρξη της διαφοροποίησης περίπου πριν από 400 εκατομμύρια χρόνια), εμφανίζουν σχετική ομοιότητα (ομολογία) και χαρακτηρίζονται με μικρά γράμματα του ελληνικού αλφαβήτου ως αλυσίδες α, ζ, και θ [“ομάδα (cluster) α-αλυσίδων”] και β, γ, δ και ε [ομάδα (cluster) β-αλυσίδων”]

Η σειρά των 140 περίπου αμινοξέων που αποτελούν κάθε αλυσίδα αιμοσφαιρίνης είναι αυστηρά καθορισμένη και μεταβιβάζεται αναλλοίωτη από γονείς σε απογόνους εδώ και της χιλιάδες χρόνια (πρωτογενής δομή). Τα αμινοξέα συνδέονται μεταξύ της με πεπτιδικούς

δεσμούς. Όμως η διάταξή της στο χώρο δεν αποτελεί μια ευθεία γραμμή. Ασθενείς αλληλεπιδράσεις (δεσμοί) ανάμεσα στα άτομα των πλευρικών της ριζών δίνουν σε μερικά τμήματα του μορίου ελικοειδή μορφή (δευτεροταγής δομή) και με τον ίδιο μηχανισμό, το σύνολο του μορίου αναδιπλώνεται στο χώρο παίρνοντας μια αυστηρά προκαθορισμένη μορφή που ονομάζεται τριτοταγής δομή και είναι πολύ σημαντική για τη λειτουργία του. Αν και οι αλυσίδες εμφανίζουν αρκετές δομικές διαφορές μεταξύ της (“ομολογία” α- και β-αλυσίδων 80%, (“ομολογία” α- και γ-αλυσίδων 76%), η στερεοδομή της δεν είναι διαφορετική. Τελικά, δύο όμοια μόρια αλυσίδων της ομάδας α και δύο μόρια αλυσίδων της ομάδας β διαπλέκονται μεταξύ της και σχηματίζουν ένα σχεδόν ωοειδές σύμπλεγμα, το μόριο της αιμοσφαιρίνης (τεταρτοταγής δομή).

Οι αλυσίδες εμφανίζονται διαδοχικά κατά την οντογένεση και σχηματίζουν κατά σειρά της **πρωτοεμβρυϊκές (embryonic) αιμοσφαιρίνες Gower και Portland**, την **εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη F (HbF, από το fetal, α2γ2)**, την **αιμοσφαιρίνη του ενήλικου, (HbA από το adult, α2β2)** και μια **εξελικτική μορφή της που συντίθεται με πολύ βραδύ ρυθμό, την αιμοσφαιρίνη A2 (α2δ2)**. Η διαδοχική εμφάνιση των παραπάνω αιμοσφαιρινών εξασφαλίζεται με την αυστηρά ελεγχόμενη διαδοχική ενεργοποίηση και σίγαση των αντίστοιχων γονιδίων, που θα αναλυθεί στη συνέχεια (Εικόνα 4.) .



Εικόνα 4.

Σχηματική παράσταση των γονιδίων της σφαιρίνης πάνω στα χρωμοσώματα 11 και 16 και των τύπων της αιμοσφαιρίνης που συντίθεται κατά την ογκογένεση. (Weatherall και Clegg, 2001).

### 1.2.2 Γονίδια και Σύνθεση της αιμοσφαιρίνης.

Τα γονίδια των αλυσίδων της ομάδας α- βρίσκονται σε μια περιοχή 50,000 βάσεων πάνω στο χρωμόσωμα 16 με την ακόλουθη σειρά: ζ1, ζ2, α2, α1 και θ. Τα ψευδογονίδια δεν εκφράζονται. Τα γονίδια της ομάδας β βρίσκονται στο χρωμόσωμα 11 και η σειρά της αντικατοπτρίζει την διαδοχική της έκφραση που είναι: ε, Αγ, Gγ, δ και β.

Της έγινε εμφανές, κάθε άτομο διαθέτει δύο αλληλικά γονίδια β αλυσίδων και τέσσερα γονίδια α-αλυσίδων. Τα γονίδια των αλυσίδων της σφαιρίνης είναι ασυνεχή δηλαδή περιλαμβάνουν αλληλουχίες βάσεων που, στο τελικό προϊόν, μεταφράζονται σε πρωτεΐνη (εξώνια), και αλληλουχίες που δεν έχουν νόημα (παρεμβαλλόμενες αλληλουχίες, ιντρόνια). Τα νουκλεοτίδια που είναι στο τέλος των εξωνίων και στην αρχή των ιντρονίων ή αντίστροφα, είναι αυστηρά καθορισμένα (δινουκλεοτίδια AG “donor” και CT, “acceptor” αντίστοιχα) σε όλα τα ευκαρυωτικά συστήματα. Μικρές “μη μεταφραζόμενες αλληλουχίες”(UTR, untranslated regions) “πριν” (5’) και μετά κάθε γονίδιο “3” αποτελούν αναπόσπαστο τμήμα του.

Η σύνθεση των αλυσίδων αρχίζει με τη μεταγραφή του επιλεγμένου για κάθε στάδιο της οντογένεσης γονιδίου μέσα στον πυρήνα (**Εικόνα 5**). Μια ειδική πολυμεράση μαζί με της “μεταγραφικούς παράγοντες” προσκολλάται σε ειδική θέση του DNA αρκετές βάσεις “πριν”(5’) από το γονίδιο, και αρχίζει να συρράπτει την αλυσίδα του αγγελιαφόρου RNA, ως κατοπτρικό αντίγραφο του γονιδίου που μεταγράφεται. Η επιλογή των γονιδίων που θα μεταγραφούν κάθε φορά κατευθύνεται από ειδικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που βρίσκονται πολύ μακριά από τα γονίδια και είναι οι αλληλουχίες LCR (Locus Control Regions) για την ομάδα β και HP40 για την ομάδα α. Έπειτα το πρωτογενές mRNA:

(α) απαλλάσσεται από τα ιντρόνια που αποκόπτονται με της κατάλληλες ριβονουκλεάσες επακριβώς ανάμεσα στην αλληλουχία AG-CT, οπότε το 3’ άκρο του εξωνίου ξαναενώνεται με το 5’ άκρο του επόμενου (μια διεργασία που ονομάζεται splicing, “μάτισμα”)

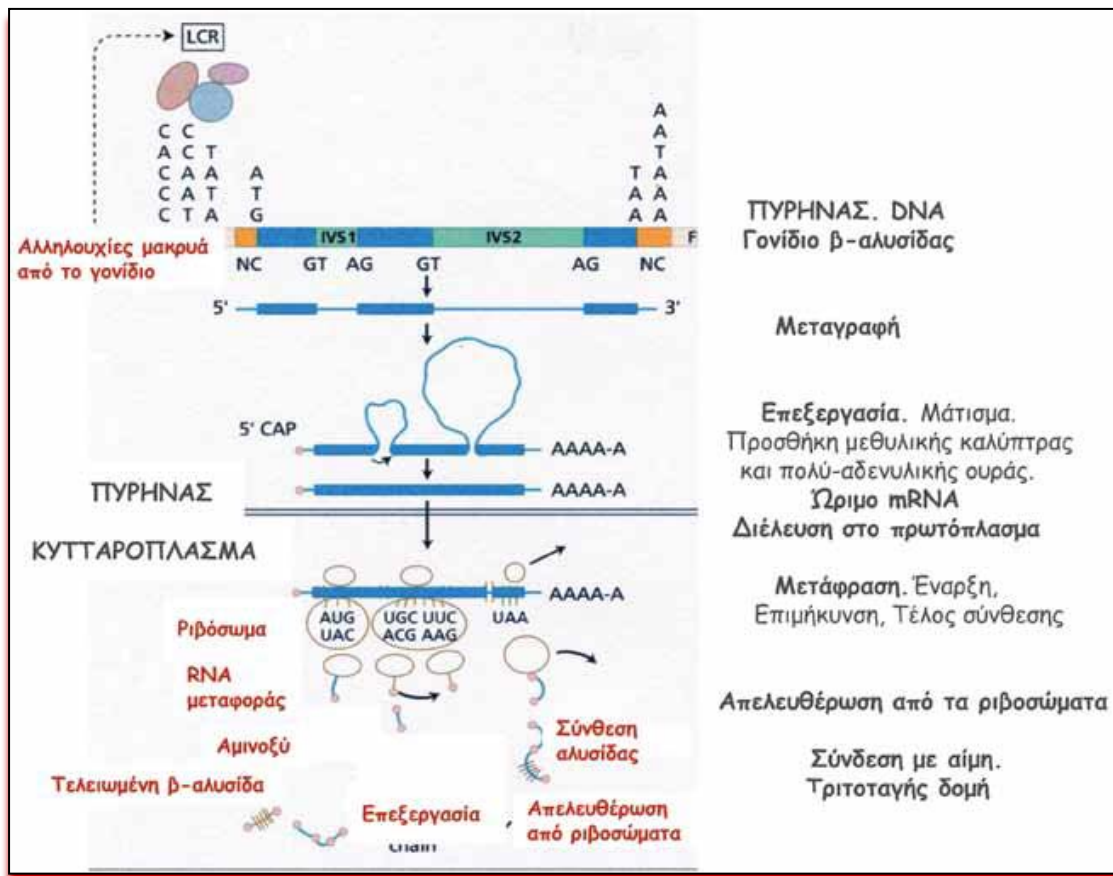
(β) μεθυλιώνεται σε ειδική θέση λίγες βάσεις πριν από την αρχή του γονιδίου

(γ) αποκτά μια “ουρά” από νουκλεοτίδια αδενίνης που προστίθενται στο 3’ άκρο του και του προσδίδουν σταθερότητα, και, τελικά περνά από τον πυρήνα στο πρωτόπλασμα με τη μορφή του “ώριμου” mRNA.

Το ώριμο mRNA συνδέεται με τα ριβοσώματα και μεταφράζεται σε πρωτεΐνη με συρραφή των αμινοξέων που υπαγορεύονται από το νουκλεοτιδικό μήνυμα. Η μετάφραση αρχίζει από ειδική θέση, όπου η αίμη (που βρίσκεται ανεξάρτητα από τον παραπάνω μηχανισμό στο κυτταρόπλασμα) παίζει σημαντικό ρόλο και τελειώνει με ειδικό κωδικόνιο (AUG) που διακόπτει την περαιτέρω συρραφή. Έπειτα, στην περίπτωση της αιμοσφαιρίνης, η έτοιμη



αλυσίδα ελευθερώνεται από το ριβόσωμα συνδέεται με την αίμη αποκτώντας την ειδική της στεροδομή και διαπλέκεται με της συμπληρωματικές της σχηματίζοντας το τετραμερές μόριο αιμοσφαιρίνης. Στην διεργασία αυτή, οι α-αλυσίδες που είναι εξαιρετικά ασταθείς “προστατεύονται” από την άμεση μετουσίωση και κατακρήμνιση ”προσφέρονται” της σύνδεση με της β-αλυσίδες από μια άλλη πρωτεΐνη του ερυθροκυττάρου, που ονομάζεται AHSP (α-hemoglobin stabilizing protein). Η όλη διεργασία διαρκεί λίγα μόνον λεπτά και επιτελείται κατά 95% και πλέον της ερυθροβλάστες για να συμπληρωθεί στα δικτυοερυθροκύτταρα. Το τελικό αποτέλεσμα είναι ότι κάθε φυσιολογικό ερυθροκύτταρο είναι εφοδιασμένο με 300 εκατομμύρια μορίων αιμοσφαιρίνης που συνιστούν τη “μέση ποσότητα αιμοσφαιρίνης” (MCH) των 30 pg. Ο πολύπλοκος της μηχανισμός υπόκειται σε κάποιου είδους ρύθμιση, που δεν έχει ακόμη πλήρως μελετηθεί: ενώ οι α- και β-αλυσίδες συντίθενται ανεξάρτητα, στο τέλος το ποσό της είναι πρακτικά το ίδιο, και η μικρή περίσσεια α-αλυσών που διαπιστώνεται απομακρύνεται άμεσα με πρωτεόλυση.



Εικόνα 5.

Σχηματική παράσταση της πρωτεϊνοσύνθεσης (Thein και Rees, 2011)

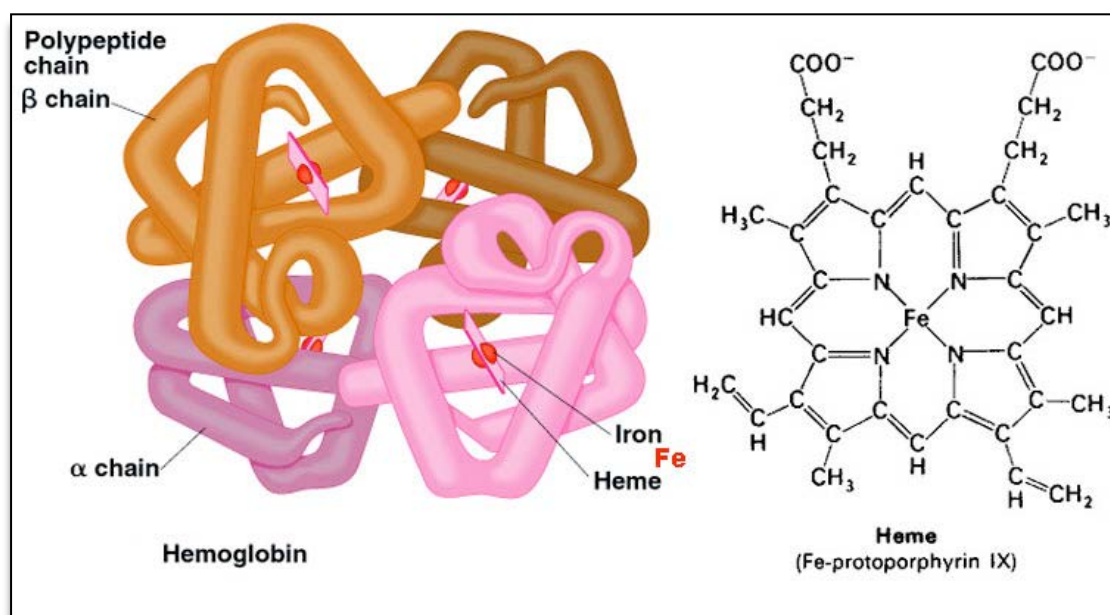
## 2.Μεσογειακά Σύνδρομα

### 2.1Εισαγωγή

Τα μεσογειακά σύνδρομα αποτελούν το πιο κοινό μονογονιδιακό νόσημα με 270 εκατομμύρια φορείς παγκοσμίως. Η εξάπλωση των παθολογικών αλληλομόρφων ευνοήθηκε στις τροπικές και υποτροπικές περιοχές, εξ'αιτίας της ανθεκτικότητας των φορέων στην ελονοσία.

Η μετακίνηση των πληθυσμών όμως, καθώς και η εφαρμογή αποτελεσματικών προγραμμάτων πρόληψης έχουν αλλάξει τον επιδημιολογικό χάρτη της γης για τα μεσογειακά σύνδρομα.

Τα μεσογειακά σύνδρομα περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα διαταραχών που χαρακτηρίζονται από μειωμένη σύνθεση μιας ή περισσότερων αλυσίδων αιμοσφαιρίνης, οι οποίες σχηματίζουν το μόριο της αιμοσφαιρίνης των ερυθρών κυττάρων. Οι αιμοσφαιρίνες είναι τετραμερή μόρια που αποτελούνται τα 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες.



Εικόνα 6.

Οι δύο προέρχονται από τα γονίδια του συμπλέγματος των α αλυσίδων αιμοσφαιρίνης και οι άλλες δύο από τα γονίδια των β γονιδίων αιμοσφαιρίνης. Η κάθε μια αλυσίδα συνδέεται με μια ομάδα αίμης. Κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής και της ενήλικης ζωής παρατηρείται μια αλλαγή στους τύπους της αιμοσφαιρίνης που συντίθενται εξ' αιτίας της αλλαγής στην έκφραση των παραπάνω γονιδίων κατά την ανάπτυξη.

Στους φυσιολογικούς ενήλικες η αιμοσφαιρίνη Α (Hb Α (α<sub>2</sub>β<sub>2</sub>)) αναλογεί περίπου στο 97.5% της ολικής αιμοσφαιρίνης των ερυθροκυττάρων, ενώ δυο άλλες αιμοσφαιρίνες η Α2 (Hb Α2



( $\alpha_2\delta_2$ ) και η F (Hb F ( $\alpha_2\gamma_2$ )) περιορίζονται περίπου σε ποσοστά <2.5% και 1-2% αντίστοιχα.

Τα μεσογειακά σύνδρομα κατατάσσονται σύμφωνα με το είδος της αλυσίδας της οποίας η σύνθεση υπολείπεται.

**Οι βασικές κατηγορίες περιλαμβάνουν την  $\alpha$ -Μεσογειακή Αναιμία ( $\alpha$ -MA) που οφείλεται σε μειωμένη σύνθεση των  $\alpha$  αλυσίδων αιμοσφαιρίνης και τη  $\beta$  Μεσογειακή Αναιμία ( $\beta$ -MA) που οφείλεται σε μειωμένη σύνθεση των  $\beta$ . Συχνή επίσης είναι και η  $\delta\beta$  Μεσογειακή Αναιμία ( $\delta\beta$ -MA), που οφείλεται σε μειωμένη σύνθεση των  $\beta$  και  $\delta$  αλυσίδων αιμοσφαιρίνης, ενώ σπανιότερα συναντώνται οι:  $\gamma$ -MA,  $\gamma\delta\beta$ -MA,  $\delta$ -MA, και  $\epsilon\gamma\delta\beta$ -MA.**

## **2.2 $\alpha$ -Μεσογειακή Αναιμία**

### **Εισαγωγή**

Η  $\alpha$ -μεσογειακή αναιμία (MA) χαρακτηρίζεται από μειωμένη παραγωγή των  $\alpha$ -αλυσίδων της αιμοσφαιρίνης. Είναι κληρονομική νόσος και μεταβιβάζεται με τον υπολειπόμενο αυτοσωματικό χαρακτήρα. Οι  $\alpha$  αλυσίδες αποτελούν το απαραίτητο συστατικό όλων των αιμοσφαιρινών από την 6η εβδομάδα της κύησης έως την ενήλικη ζωή, δηλ. της Hb Gower 2 ( $\alpha_2\epsilon_2$ ), της HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ), της HbA2 ( $\alpha_2\delta_2$ ) και της HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ) με αποτέλεσμα η ανεπάρκειά τους, εφ' όσον είναι σημαντική, να εκδηλώνεται τόσο στο έμβρυο, όσο και στον ενήλικα. Το κλινικό φάσμα της  $\alpha$ -MA είναι ιδιαίτερος ευρύ και κυμαίνεται από ασυμπτωματική έως βαρύτερη συνδρομή που είναι ασύμβατη με τη ζωή και προκαλεί ενδομήτριο θάνατο. Η σύνθεση των  $\alpha$  αλυσίδων της αιμοσφαιρίνης κατευθύνεται (ελέγχεται) από την παρουσία δύο  $\alpha$  γονιδίων ( $\alpha_2$  και  $\alpha_1$ ) που βρίσκονται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 16 ( $5'-\zeta_2-\psi_1-\psi_2-\psi_1-\alpha_2-\alpha_1-\theta_1-3'$ )<sup>1</sup>. Έτσι κάθε φυσιολογικό άτομο έχει 4  $\alpha$  γονίδια. Η  $\alpha$ -θαλασσαιμία είναι αποτέλεσμα μοριακών διαταραχών στα  $\alpha$  γονίδια.

Προκαλείται συχνότερα από ελλείμματα τμημάτων του DNA (deletions), τα οποία άλλοτε μειώνουν ( $\alpha^+$ ) και άλλοτε εμποδίζουν τελείως ( $\alpha^0$ ) την παραγωγή των  $\alpha$ -αλυσίδων από το παθολογικό αλληλίο. Πιο σπάνια προκαλείται όμως και από μεταλλάξεις που αδρανοποιούν το  $\alpha$  γονίδιο (μη ελλειμματικές – nondeletional,  $\alpha T$ ). Όντως, οι περισσότερες περιπτώσεις  $\alpha$ -θαλασσαιμικών φαινοτύπων συνδυάζονται με τρία ελλείμματα, **το  $-\alpha 3.7 \alpha^+$  (πιο συνηθισμένο στην Αφρική, Μεσόγειο, Μ. Ανατολή και Ασία), το  $-\alpha 4.2 \alpha^+$  (σε Ασία, Μεσόγειο, Μ. Ανατολή, ΝΑ. Ασία και Ειρηνικό) και το  $-- SEA \alpha^0$  (κυρίως Κίνα και ΝΑ. Ασία).**

Υπάρχουν 4 βασικές φαινοτυπικές κατηγορίες  $\alpha$ -μεσογειακής αναιμίας ως εξής:

1. Η απώλεια ή αδρανοποίηση ενός από τα τέσσερα α γονίδια δεν συνοδεύεται από αιματολογικές διαταραχές και ονομάζεται ετερόζυγος α-θαλασσαιμία-2 ή ήπια ετερόζυγος α-MA.

2. Η έλλειψη δύο α γονιδίων από το ίδιο χρωμόσωμα ονομάζεται ετερόζυγος α-θαλασσαιμία-1 ή βαρειά ετερόζυγος α-MA.

Το άτομο είναι ασυμπτωματικό, αλλά συνήθως εμφανίζει μια ήπια υπόχρωμη, μικροκυτταρική αναιμία.

Τον ίδιο αιματολογικό φαινότυπο εμφανίζουν και οι *ομοζυγώτες α-θαλασσαιμίας-2* (απώλεια 2 γονιδίων, ένα από κάθε χρωμόσωμα).

3. **H αιμοσφαιρινοπάθεια H** είναι η πιο σοβαρή μορφή της α-μεσογειακής αναιμίας που είναι συμβατή με την ζωή. Οφείλεται σε συνδυασμό μεταλλάξεων που έχουν σαν αποτέλεσμα τη μείωση της παραγωγής των α-αλυσίδων στο περίπου 25% της φυσιολογικής.

Η σχετική περίσσεια των β-αλυσίδων σχηματίζει ένα τετραμερές γνωστό σαν Hb H (β4), απ' όπου η νόσος πήρε το όνομά της<sup>2</sup>. Στην εμβρυϊκή και νεογνική περίοδο η σχετική περίσσεια των γ-αλυσίδων σχηματίζει ένα άλλο τετραμερές γνωστό σαν Hb Bart's (γ4).

Η κλινική έκφραση της νόσου ποικίλλει, από ήπια αναιμία μέχρι τόσο σοβαρή που να απαιτεί μεταγγίσεις και περιγράφεται με λεπτομέρεια παρακάτω.

4. Η απώλεια και των τεσσάρων α γονιδίων είναι ασύμβατη με την ζωή, καθώς το έμβρυο είτε αποβιώνει ενδομητρίως, είτε αναπτύσσει ύδρωπα και αποβιώνει μετά τον τοκετό. Η αδυναμία παραγωγής α αλυσίδων έχει σαν αποτέλεσμα την αντικατάσταση των φυσιολογικών αιμοσφαιρινών από την Hb Portland (ζ2γ2) και Hb Bart's (γ4)<sup>3</sup>.

Η α-θαλασσαιμία είναι πολύ συχνή σε άτομα που κατάγονται από τη ΝΑ Ασία, τη Μεσόγειο και την Αφρική. Η συχνότητα των φορέων θαλασσαιμικών αλληλίων ποικίλλει από 10-20% σε περιοχές της υποσαχάριας Αφρικής, >40% σε πληθυσμούς της Μέσης Ανατολής και της Ινδίας και φτάνει μέχρι το 80% στη βόρεια Παπούα-Νέα Γουινέα και απομονωμένες ομάδες στην ΝΑ Ινδία<sup>4</sup>. Στην Ελλάδα 7% του γενικού πληθυσμού είναι φορείς α+ MA (έλλειμμα 3.7 κιλobάσεις -α3.7) και άλλο 1% είναι φορείς κάποιου α0 ελλείμματος ή πιο σπάνια μετάλλαξης που αδρανοποιεί ένα α γονίδιο (nondeletional, αT).

Οι φορείς των μεταλλάξεων στα α-γονίδια είναι δύσκολο να διαγνωσθούν καθώς οι αιματολογικές τους παράμετροι είναι συνήθως εντός φυσιολογικών ορίων και επίσης δεν παρατηρείται αύξηση στα επίπεδα της HbA2 ή της HbF. Η ανάπτυξη όμως των σύγχρονων μοριακών τεχνικών συνέβαλε τα μέγιστα στην διάγνωσή τους καθώς και στη συσχέτιση γονοτύπου-φαινοτύπου.

Με βάση την ανάλυση των γονοτύπων σε ασθενείς με HbH, **οι συχνότερες βλάβες στον Ελληνικό πληθυσμό σε ότι αφορά στα ελλείμματα, είναι η -α3.7 (σε ποσοστό >50% των παθολογικών αλληλομόρφων), η -MED, -α20.5, και σπανιότερα οι -α4.2 και -α5.2. Οι**

συχνότερες μη ελλειμματικές μοριακές βλάβες στην Ελλάδα είναι η αTSAUDI, με μετάλλαξη στο σήμα πολυαδενυλίωσης (Poly A (A>G); AATAAA>AATAAG, και η πεντανουκλεοτιδική έλλειψη GGTGA στην 5' θέση δότη στο πρώτο εσώνιο του α2 γονιδίου, η αHph. Σε μικρότερη συχνότητα η αTPA, η αAgr και αIc.5-10.

### 2.2.2 Μοριακή Βάση της α-Μεσογειακής Αναιμίας

Έχουν περιγραφεί, παγκοσμίως, περισσότερες από 80 διαφορετικές μεταλλάξεις οι οποίες προκαλούν α MA (<http://globin.cse.psu.edu/hbvar/menu.html>). Η πλειοψηφία των διαταραχών αυτών είναι ελλείμματα τα οποία απομακρύνουν ολόκληρο ή μέρος του συμπλέγματος των α γονιδίων. Πιο σπάνιες είναι οι σημειακές μεταλλάξεις ή τα μικρά ελλείμματα μέσα στα δυο α γονίδια αιμοσφαιρίνης. Οι μεταλλάξεις εκείνες οι οποίες αποφέρουν μερική απώλεια στη σύνθεση των α αλυσίδων από το παθολογικό χρωμόσωμα είναι γνωστές ως μεταλλάξεις α+ (ή α MA 2), ενώ εκείνες που προκαλούν ολοκληρωτική απώλεια της σύνθεσης των α γονιδίων είναι γνωστές ως μεταλλάξεις α0 (ή α MA 1).

Χρησιμοποιείται συγκεκριμένος τρόπος για το συμβολισμό των διαφόρων τύπων μεταλλάξεων. **Ο συμβολισμός «αα» αντιπροσωπεύει ένα φυσιολογικό αλληλόμορφο με δυο α γονίδια, ο συμβολισμός «-α» αντιπροσωπεύει έλλειμμα ενός α γονιδίου, ο «--» έλλειμμα και των δύο α γονιδίων από το ίδιο αλληλόμορφο, και ο «αΤα» ή «ααΤ» αντιπροσωπεύει γονίδια με σημειακή μετάλλαξη στο α2 ή στο α1 γονίδιο αντίστοιχα.**

Χρησιμοποιείται συχνά εκθέτης για να δηλώσει το μέγεθος του ελλείμματος ή τη φύση της σημειακής μετάλλαξης ή του πληθυσμού στον οποίο πρωτοπεριγράφηκε η μετάλλαξη π.χ. -α3.7 δηλώνει ένα έλλειμμα α+ στο οποίο λείπουν 3.7kb, ή --SEA, δηλώνει ένα κοινό έλλειμμα α0 που πρωτοπεριγράφηκε σε πληθυσμό της ΝΑ Ασίας, ή αPolyAα δηλώνει μια σημειακή μετάλλαξη στο α2 γονίδιο που επηρεάζει τη θέση πολυαδενυλίωσης.

Οι πιο συχνές μεταλλάξεις που ευθύνονται για α MA αφορούν ελλείμματα τα οποία αφήνουν ένα μόνο λειτουργικό α γονίδιο στο χρωμόσωμα. Η ύπαρξη διπλασιασμένων ομόλογων περιοχών εκατέρωθεν των α γονιδίων ευνοεί φαινόμενα άνισων επιχιασμών κατά τη διάρκεια της μείωσης, όταν τα ομόλογα χρωμοσώματα δεν βρίσκονται σε σωστή «ευθυγράμμιση» (αντιστοίχιση) μεταξύ τους.

Αποτέλεσμα του άνισου επιχιασμού είναι η δημιουργία ελλειμμάτων. Τρεις τύποι Ελλειμμάτων, μεγέθους 3.7kb δημιουργούνται μεταξύ των γονιδίων α1 και α2, εξ αιτίας άνισου επιχιασμού (ανασυνδυασμού) μεταξύ των περιοχών Z (Σχήμα 2) και είναι τα: -α3,7I, -α3,7II, -α3,7III, με αντίστοιχη φαινοτυπική ετερογένεια. Τα δυο πρώτα έχουν σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός γονιδίου που ομοιάζει με το α1 και το τρίτο σε ένα υβριδικό

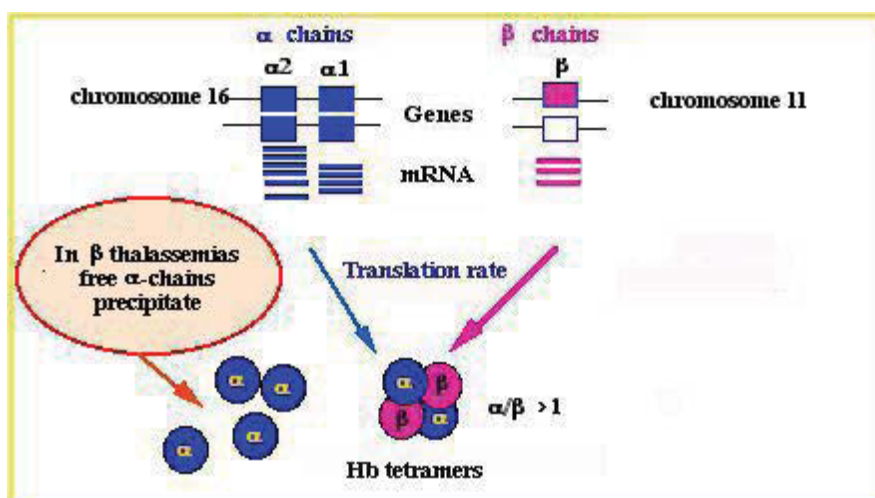
γονίδιο που ομοιάζει με το  $\alpha 2$ . Αντίστοιχα, άνισος επιχιασμός μεταξύ των περιοχών X (Σχήμα 2) οδηγεί στη δημιουργία ελλείμματος 4.2kb το οποίο αφαιρεί ολόκληρο το γονίδιο  $\alpha 2$ . Και στις δύο περιπτώσεις άνισου επιχιασμού προκύπτουν δύο χρωμοσώματα εκ των οποίων το ένα υπολείπεται ενός γονιδίου  $\alpha$  και το άλλο έχει ένα επιπλέον  $\alpha$  γονίδιο ( $\alpha\alpha\alpha\alpha\text{anti}3.7$  και  $\alpha\alpha\alpha\alpha\text{anti}4.2$ ). Υπάρχουν περισσότεροι από 250 εκατομμύρια φορείς  $\alpha^+$  MA στον κόσμο, με μεγαλύτερη συχνότητα στους πληθυσμούς της Ινδίας, της ΝΑ Ασίας και της Αφρικής. Η νόσος συναντάται λιγότερο συχνά στη Μεσόγειο και τη Μέση Ανατολή.

Η πλειοψηφία των ελλειμμάτων της  $\alpha$  MA που προκύπτουν εξ αιτίας άνισου ανασυνδυασμού συνήθως αφαιρούν και τα δύο  $\alpha$  γονίδια στο χρωμόσωμα που πλήττεται και σε κάποιες περιπτώσεις ολόκληρο το σύμπλεγμα των  $\alpha$  γονιδίων αιμοσφαιρίνης δημιουργώντας το γενετικό αίτιο για  $\alpha 0$  MA. Έχουν περιγραφεί περισσότερα από 20 τέτοια ελλείμματα παγκοσμίως.

Τα ελλείμματα αυτά δεν παρουσιάζουν περιοχές με εμφανή ομολογία στα σημεία κοπής τους και μπορούν να καταταγούν σε τρεις επί μέρους ομάδες που αφορούν αυτά που πρόέκυψαν από:

- α) επανασύνδεση μη ομόλογων θραυσμάτων
- β) ανασυνδυασμό μεταξύ επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών Alu
- γ) τελομερική σταθεροποίηση τμημάτων στα οποία αποκόπηκε το τελικό άκρο του χρωμοσώματος 16.

Επί πλέον έχουν χαρακτηριστεί διάφορα ελλείμματα, τα οποία αφήνουν ανέπαφα τα  $\alpha$  γονίδια αλλά αφαιρούν ρυθμιστικές περιοχές όπως την περιοχή HS-40, μαζί με διαφορετικού μεγέθους γειτονικές περιοχές. Στις περιπτώσεις αυτές, ενώ τα  $\alpha$  γονίδια υπάρχουν, δεν εκφράζονται προκαλώντας φαινότυπο  $\alpha$  MA.



Εικόνα 7.

Τέλος έχει περιγραφεί, σε ένα περιστατικό, ένα έλλειμμα περίπου 18kb, που αφαιρεί μόνο τα α1 και q γονίδια και προκαλεί α0 MA. Το υπόλοιπο σύμπλεγμα των α γονιδίων περιλαμβανομένου του α2 γονιδίου και των ρυθμιστικών περιοχών παραμένει ανέπαφο αλλά παραδόξως το α2 γονίδιο παραμένει, μεταγραφικά ανενεργό.

Όταν υπάρχει το έλλειμμα αφαιρείται ένα τμήμα του γονιδίου *LUC7L* και ταυτόχρονα προσεγγίζει το α2 γονίδιο. Το γονίδιο αυτό εκφράζεται προς την αντίθετη κατεύθυνση από ότι τα α γονίδια. Το τροποποιημένο μετάγραφο του RNA από το *LUC7L* προάγει τη μεθυλίωση της νησίδας CpG του α2 γονιδίου καταστέλλοντας την έκφραση του. Ο μηχανισμός αυτός προσομοιάζει αυτόν της απενεργοποίησης του χρωμοσώματος X και της γονιδιακής αποτύπωσης αποκαλύπτοντας έναν καινούργιο παθογενετικό μηχανισμό6.

Τα περισσότερα ελλείμματα που προκαλούν α0 MA είναι σποραδικά αν και τέσσερα είναι τα πιο συχνά:

***Τα ελλείμματα --Med και (-α)20.5 που συναντώνται στους μεσογειακούς πληθυσμούς και τα --SEA και --FIL στη ΝΑ Ασία.***

Υπάρχουν περισσότερες από 40 σημειακές νουκλεοτιδικές αλλαγές που προκαλούν α MA. Οι μεταλλάξεις αυτές εντοπίζονται πιο συχνά στο α2 γονίδιο και λιγότερο στο α1. Περίπου οι μισές από τις διαταραχές αυτές επηρεάζουν την επεξεργασία του RNA ή τη μετάφραση.

Υπάρχει επίσης μια ενδιαφέρουσα ομάδα μεταλλάξεων η οποία προκαλεί μεταμεταφραστική αστάθεια του αιμοσφαιρικού πολυπεπτιδικού παραγώγου με φαινότυπο α MA, αφού η σύνθεση της α αλυσίδας αιμοσφαιρίνης είναι μειωμένη.

Πολλές μεταλλάξεις που επηρεάζουν τις συντηρημένες αλληλουχίες στις περιοχές αποκοπής και επανασυγκόλλησης του mRNA έχουν περιγραφεί τόσο στο α1 όσο και στο α2 γονίδιο, και όλες έχουν σαν αποτέλεσμα την ολοκληρωτική καταστολή της παραγωγής της α αλυσίδας από το παθολογικό γονίδιο. Ένα κοινό παράδειγμα περιλαμβάνει το έλλειμμα πέντε νουκλεοτιδίων που αφαιρεί το δινουκλεοτίδιο GT (θέση δότη κατά την επεξεργασία του mRNA) στο 5' άκρο του ιντρονίου 1 του α2 γονιδίου (α2 IVS1 GAGGGTGAGG>GAGG, γνωστό ως αHpha).

Υπάρχουν ωστόσο τουλάχιστο τέσσερεις γνωστές μεταλλάξεις που επηρεάζουν την επεξεργασία του RNA στις οποίες περιλαμβάνονται νουκλεοτιδικές αλλαγές στην ουρά πολυαδενυλίωσης του α2 γονιδίου (π.χ. AATAAA>AATAAG και AATAAA> AATGAA). Οι αλλαγές αυτές φαίνεται να συνοδεύονται με έναν σχετικά βαρύ φαινότυπο α MA, προφανώς εξ αιτίας της καταστολής της μεταγραφής και από το α1 γονίδιο που είναι αποτέλεσμα του μηχανισμού της μεταγραφικής αλληλεπίδρασης των δύο γονιδίων7.

Οι διαταραχές κατά τη μετάφραση του RNA προκαλούνται από μεταλλάξεις:

1. στο κωδικόνιο έναρξης,
2. στο κωδικόνιο τερματισμού

### 3.σε μεταλλάξεις μετατοπισμένου πλαισίου ή μη νοηματικές μεταλλάξεις. Μεταλλάξεις

Μεταλλάξεις στο κωδικόνιο έναρξης έχουν βρεθεί και στα δύο  $\alpha$  γονίδια, ενώ έχει περιγραφεί και στο μοναδικό  $\alpha$  γονίδιο που είχε παραμείνει σε ένα χρωμόσωμα με έλλειμμα που προκαλεί  $\alpha^+$  MA. Πέντε διαφορετικές σημειακές μεταλλάξεις έχουν αναφερθεί στο κωδικόνιο τερματισμού οι οποίες όλες πλήττουν το  $\alpha 2$  γονίδιο. Όλες οι μεταλλάξεις στο κωδικόνιο τερματισμού έχουν σαν αποτέλεσμα αντί για τον τερματισμό της μεταγραφής, την ενσωμάτωση ενός αμινοξέος και την παραγωγή μιας παθολογικής  $\alpha$  αλυσίδας αιμοσφαιρίνης (από 31 αμινοξέα). Αυτές οι επιμηκυμένες  $\alpha$  αλυσίδες συντίθενται σε χαμηλότερα επίπεδα αλλά έχουν την τάση να κατακρημνίζονται στα ερυθροκύτταρα προκαλώντας διαταραχές στη λειτουργία των ερυθροκυττάρων και των κυτταρικών μεμβρανών. Οι πιο κοινές παθολογικές αιμοσφαιρίνες που οφείλονται σε μεταλλάξεις στο κωδικόνιο λήξης του  $\alpha 2$  γονιδίου είναι: η Hb Constant Spring ( $\alpha 2$  cd142 TAA>CAA) η οποία συναντάται συχνά στη ΝΑ Ασία, Η Hb Icaria ( $\alpha 2$ cd142TAA>AAA) η οποία δεν είναι σπάνια στην Ελλάδα. Άλλες μεταλλάξεις που εμπλέκονται στην μετάφραση του RNA είναι μεταλλάξεις μετατοπισμένου πλαισίου ή μη νοηματικές μεταλλάξεις που συναντώνται κυρίως στο  $\alpha 2$  γονίδιο και κάποιες φορές στο  $\alpha 1$ . Υπάρχει ένας αυξανόμενος αριθμός μεταλλάξεων που αφορούν σημειακές αντικαταστάσεις ή μικρά ελλείμματα και προκαλούν τη σύνθεση ασταθών  $\alpha$  αλυσίδων αιμοσφαιρίνης. Στις περισσότερες περιπτώσεις, αυτές οι παθολογικές αλυσίδες είναι τόσο ασταθείς που δεν ανιχνεύονται καν σε πρωτεϊνικό επίπεδο και γίνονται αντιληπτές μόνο στην αλληλουχία του DNA του γονιδίου. Οι παθολογικές αυτές αλυσίδες είναι αιματολογικά «σιωπηρές» στους φορείς, όταν όμως συνδυαστούν με άλλες μεταλλάξεις  $\alpha$  MA μπορεί να προκαλέσουν ένα μεγάλο εύρος φαινοτύπων όπως αιμοσφαιρινοπάθεια H ή ενδιάμεση MA8-10. Σε σπάνιες περιπτώσεις οι μεταλλάξεις αυτές σε ομόζυγη κατάσταση ή σε συνδυασμό με ελλείμματα  $\alpha 0$  μπορεί να προκαλέσουν εμβρυϊκό ύδρωπα 11,12.

Τυπικά παραδείγματα τέτοιων μεταλλάξεων είναι οι: **Hb Quong Sze ( $\alpha 2$  cd125 CTG>CCG, Leu>Pro), Hb Agrinio ( $\alpha 2$ cd29 CTG>CCG, Leu>Pro) και η Hb Taybe ( $\alpha 1$  cd38 ή cd39 delACC, Thr).**

Στην περίπτωση του ελληνικού πληθυσμού η ανάλυση των γονοτύπων σε περιστατικά με HbH αποκάλυψε ότι το πιο συχνό έλλειμμα που συναντάται σε ποσοστό >50% των παθολογικών αλληλομόρφων είναι το  $-\alpha 3.7$ .

Ακολουθούν τα  $-\text{MED}$  και  $-\alpha 20.5$  ενώ σπανιότερα είναι τα  $-\alpha 4.2$  και  $-\alpha 5.2$ .

Οι συχνότερες σημειακές νουκλεοτιδικές αλλαγές που προκαλούν  $\alpha$  MA στην Ελλάδα είναι η  ***$\alpha$  TSAUDI***, που εντοπίζεται στην ουρά πολυαδενυλίωσης του  $\alpha 2$  (AATAAA>AATAAG), και η  ***$\alpha$  Hph***. Σε μικρότερη συχνότητα συναντώνται η  ***$\alpha$  TPA*** στην ουρά πολυαδενυλίωσης του  $\alpha 2$  (AATAAA>AATAAA) καθώς και οι μεταλλάξεις που προκαλούν τις υπερασταθείς



αιμοφαιρίνες *Hb Agrinio*, και *Hb Icaria*<sup>9</sup>. Σπανιότερα συναντώνται μεταλλάξεις στο α1 ή το α2 γονίδιο που προκαλούν τη σύνθεση των υπερασταθών αιμοσφαιρινών και συνοδεύονται με εικόνα α MA όπως η *Hb Taybe*, η *Hb Heraklion* (α1, cd36/37 delCCC, Pro), η *Hb Adana* (α1 ή α2, cd59 GGC>GAC, Gly>Asp)<sup>13-15</sup>.

### 2.2.3 Παραλλαγές της α-Μεσογειακής Αναιμίας

Υπάρχουν δύο είδη α MA που συνοδεύονται από πνευματική καθυστέρηση, γνωστές ως σύνδρομο ATR-16 και ATR-X (OMIM #141750 και OMIM #301040, αντίστοιχα). Οι ασθενείς που πάσχουν από το σύνδρομο ATR-16 είναι φορείς μεγάλων ελλειμμάτων (1-2 Mb) στο τελομερικό άκρο του βραχέως σκέλους του χρωμοσώματος 16, στο οποίο περιλαμβάνεται και το σύμπλεγμα των α γονιδίων. Το σύνδρομο έχει εκδήλωση α MA με ποικίλης βαρύτητας επιπτώσεις τόσο σε επίπεδο ανάπτυξης όσο και νοητικής υστέρησης. Οι ανωμαλίες που παρατηρούνται στο σύνδρομο αυτό οφείλονται προφανώς στην έλλειψη γονιδίων που εμπλέκονται σε διάφορους μηχανισμούς που σχετίζονται με την ανάπτυξη<sup>5</sup>.

Το σύνδρομο ATR-X είναι ένα φυλοσύνδετο νόσημα που οφείλεται σε μεταλλάξεις στο γονίδιο ATR-X που βρίσκεται στη θέση Xq13.3. Οι άρρενες ασθενείς παρουσιάζουν ήπιας βαρύτητας α MA με βαρύτερη πνευματική καθυστέρηση, χαρακτηριστικό προσωπείο και άλλες συγγενείς ανωμαλίες. Η πρωτεΐνη ATRX είναι μια πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης (chromatin-associated remodelling), που επιδρά στην έκφραση πολλών άλλων γονιδίων κατά την ανάπτυξη. Φαίνεται ότι η πρωτεΐνη αυτή είναι απαραίτητη για την έκφραση των α γονιδίων αιμοσφαιρίνης αλλά όχι για την έκφραση των β 16.

Υπάρχουν επίσης πάρα πολύ σπάνια περιστατικά μιας επίκτητης μορφής α MA, που σχεδόν πάντα συνοδεύονται από μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο (MDS).

Έχουν αναγνωριστεί δύο τουλάχιστον μηχανισμοί για την επίκτητη α MA:

α) η δημιουργία επίκτητου ελλείμματος στο σύμπλεγμα των α γονιδίων αιμοσφαιρίνης που εμφανίζεται μεμονωμένα σε νεοπλασματικό κλώνο και συχνότερα β) ή δημιουργία σωματικών μεταλλάξεων στο γονίδιο της ρυθμιστικής πρωτεΐνης ATRX που την απενεργοποιεί, με αποτέλεσμα την καταστολή της έκφρασης των α γονιδίων<sup>17-19</sup>.

Τέλος περιγράφηκε μια σπάνια μορφή α MA που οφείλεται σε μια σημειακή μετάλλαξη (SNP) μεταξύ των ζ και ψζ γονιδίων και δημιουργεί έναν καινούριο υποκινητή που αναγνωρίζεται από τον ερυθροειδικό μεταγραφικό παράγοντα GATA1 έχοντας σαν αποτέλεσμα την έκφραση μιας εξωγονιδιακής περιοχής. Ο υποκινητής αυτός ανταγωνίζεται τους υποκινητές των α γονιδίων στο ίδιο χρωμόσωμα περιορίζοντας, σε μεγάλο βαθμό, την έκφρασή τους<sup>20</sup>.

#### 2.2.4. Σπάνιες α-αιμοσφαινοπάθειες που οφείλονται σε ασταθείς α-αλυσίδες

Σπανιότερα, σημειακές μεταλλάξεις που αφορούν σε αλλαγές νουκλεοτιδίων στο α1 ή στο α2 γονίδιο, έχουν σαν αποτέλεσμα την παραγωγή πολύ ασταθών α-αλυσίδων που οδηγεί σε εικόνα παρόμοια των υπολοίπων α-θαλασσαιμικών μεταλλάξεων.<sup>28</sup> Υπήρχε η εντύπωση ότι οι μεταλλάξεις αυτές είναι σχετικά σπάνιες.

Σ' αυτό συνέβαλλε το γεγονός ότι στους φορείς αυτών των μεταλλάξεων δεν παρατηρούνται μη-φυσιολογικά αιματολογικά ευρήματα και μόνο σπάνια έχουν ήπια αναιμία ή χαμηλούς ερυθροκυτταρικούς δείκτες (κυρίως MCH).

Η διερεύνηση επίσης αυτών των περιστατικών απαιτούσε εξειδικευμένα εργαστήρια. Όμως η αυξανόμενη γνώση και η βελτιούμενη τεχνολογία, έχουν αυξήσει τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον για τις μεταλλάξεις αυτές που οδηγούν σε μια ποικιλία α-θαλασσαιμικών φαινοτύπων. Στις περιπτώσεις αυτές η δομική μεταβολή που προκαλείται από την μετάλλαξη αφορά στην περιοχή που εφάπτονται οι αλυσίδες α1β1. Όπως ήδη αναφέρθηκε οι φορείς είναι είτε ασυμπτωματικοί ή έχουν οριακά μόνο αιματολογικά ευρήματα. Η εικόνα της ήπιας αιμολυτικής αναιμίας μπορεί να εμφανιστεί, όταν ο πρωτεολυτικός μηχανισμός του ερυθροκυττάρου αδυνατεί να απομακρύνει το ασταθές μετουσιωμένο αιμοσφαιρινικό προϊόν.

Πιο εμφανής φαινότυπος προκύπτει όταν οι ασθενείς αυτοί είναι ομοζυγώτες για ασταθείς α-αλυσίδες ή διπλοί ετεροζυγώτες με μια άλλη α-θαλασσαιμική μετάλλαξη. Έτσι υπάρχει ένας συνεχώς αυξανόμενος αριθμός περιπτώσεων που περιγράφονται στην βιβλιογραφία και αφορούν περιπτώσεις αιμοσφαιρινοπάθειας H ή ενδιάμεσης μεσογειακής αναιμίας ή ακόμη και εμβρυϊκού ύδρωπα που προήλθαν από φορείς γονείς που δεν είχαν διαγνωσθεί.

Σαν αποτέλεσμα του συστηματικού ελέγχου διαλογής (screening) και του προγεννητικού ελέγχου σε πληθυσμούς υψηλού κινδύνου ταυτοποιούνται ολοένα και περισσότερες «ποικιλίες» α-θαλασσαιμικών φαινοτύπων με οριακές αιματολογικές διαταραχές. Οι πιθανότητες για συνδυασμούς «ασταθών» ή άλλων θαλασσαιμικών ποικιλιών με κλασσικά ελλείμματα α-θαλασσαιμίας, είναι προφανές ότι είναι περισσότερες σε περιοχές που η θαλασσαιμία ενδημεί αν και οι μετακινήσεις των πληθυσμών και η μετανάστευση έχουν αλλοιώσει τα δεδομένα.

***Η Hb Taybe [codons 38/39 (-ACC) Thr→θ (α1)] περιγράφηκε για πρώτη φορά (και έκτοτε αρκετές φορές) στους Άραβες του Ισραήλ, όπου απαντάται αρκετά συχνά σε ομόζυγη κατάσταση.*** Τα άτομα με Hb Taybe σε ομόζυγη ή διπλή-ετερόζυγη κατάσταση με άλλες μεταλλάξεις α-μεσογειακής αναιμίας, εμφανίζουν ένα ευρύ φάσμα φαινοτύπων που κυμαίνεται από ήπια χρόνια αιμολυτική αναιμία μέχρι εμβρυϊκό ύδρωπα και η φαινοτυπική αυτή ετερογένεια αφορά και σε άτομα με τον ίδιο γονότυπο, αντανακλώντας την πιθανή



συνεισφορά άλλων γενετικών παραγόντων όπως του πρωτεολυτικού μηχανισμού του ερυθροκυττάρου.

**Στον Ελλαδικό χώρο έχουν περιγραφεί 4 περιπτώσεις διπλών ετεροζυγωτών Hb Taybe σε διπλή ετεροζυγωτία με την κοινή ελλειμματική βλάβη  $\alpha^{+3.7kb}$  στις 3 περιπτώσεις και την μετάλλαξη  $\alpha H\eta\eta$  στην 4η. Οι τρεις από τα 4 περιστατικά προέρχονταν από την Κρήτη.**

Όλοι οι πάσχοντες είχαν ήπια αναιμία με μορφολογικές αλλοιώσεις των ερυθρών που δεν απαιτούσε μεταγγίσεις και σπληνομεγαλία σαν το μόνο κλινικό εύρημα. Οι τιμές των Hb A2 και Hb F, ήταν εντός φυσιολογικών ορίων και δεν παρατηρήθηκαν παθολογικά κλάσματα. Στην ίδια μελέτη περιγράφηκαν και τέσσερις φορείς (οι τρεις ήταν γονείς των ασθενών και ο τέταρτος ανεξάρτητος τυχαία ανακαλυφθείς φορέας). Εκτός από ήπιες μορφολογικές αλλοιώσεις δεν είχαν κανένα άλλο παθολογικό αιματολογικό ή κλινικό εύρημα.

**Η Hb Taybe χαρακτηρίζεται από την έλλειψη του αμινοξέος θρεονίνη στην  $\alpha 1\beta 1$  περιοχή. Επιπρόσθετα η θρεονίνη 38 αλληλεπιδρά με την Glu35 και το Asp36 της AHSP, την πρωτεΐνη η οποία προστατεύει τις αλυσίδες που σχηματίστηκαν και συμμετέχει στην σωστή τους αναδίπλωση<sup>29-31</sup>.**

**Η Hb Heraklion (codons 36/37 (-CCC); Pro→0 ( $\alpha 1$ )), έχει περιγραφεί μέχρι σήμερα σε 4 περιπτώσεις που προέρχονται από την Κρήτη. Όπως και στις άλλες περιπτώσεις υπερασταθών αιμοσφαιρινών, αυτές ανιχνεύθηκαν όταν συνυπήρχαν με άλλες κοινές α θαλασσαιμικές μεταλλάξεις, την  $\alpha H\eta\eta$  στις 3 περιπτώσεις και την  $\alpha 3.7$  στην τέταρτη *in trans*.**

Όλοι οι ασθενείς διαγνώστηκαν στην παιδική τους ηλικία. Είχαν μέτρια αναιμία, χωρίς όμως ανάγκη τακτικών μεταγγίσεων με μορφολογικές αλλοιώσεις, χωρίς όμως παθολογικά αιμοσφαιρινικά κλάσματα. Οι τρεις από τους τέσσερις είχαν σπληνομεγαλία και υπερχλοερυθριναιμία. Η προλίνη  $\alpha 37$  στην κεντρική κοιλότητα της  $\alpha$  αλυσίδας φυσιολογικά εμπλέκεται στην  $\alpha 1\beta 1$  επιφάνεια επαφής των δύο αλυσίδων μέσω του δεσμού της με την ιστιδίνη  $\beta 147$ . Επίσης βρίσκεται εγγύς της αργινίνης 31 και της φαινυλαανίνης 36 της  $\alpha$  αλυσίδας στην επιφάνεια  $\alpha 1\beta 1$  και συμβάλλει στην σταθεροποίηση του μορίου της αιμοσφαιρίνης στην T στερεοδιάταξη.

Η μετάλλαξη προκαλεί αστάθεια και αναμένεται να αλλάζει την χημική συγγένεια με το οξυγόνο. Οι απλοί φορείς όμως δεν έχουν κανένα παθολογικό κλινικό ή εργαστηριακό εύρημα που να τους διαφοροποιεί και να συμβάλλει στην ανίχνευσή τους. Πρόκειται πάντως για μια μάλλον σπάνια μετάλλαξη της οποίας η κλινική εικόνα στους διπλούς ετεροζυγώτες μπορεί να θεωρηθεί ήπια και έτσι δεν θεωρείται σκόπιμο να συμπεριλαμβάνεται στον έλεγχο διαλογής (screening test) του γενικού πληθυσμού<sup>32,33</sup>.

**Η Hb Adana ( $\alpha 59(E8)Gly \rightarrow Asp, GGC > GAC$  ( $\alpha 2$  ή  $\alpha 1$ )) ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά σε δύο Τούρκους ασθενείς σε συνδυασμό με μια  $\alpha 0$  μετάλλαξη (έλλειμμα). Στην χώρα μας**

περιγράφηκαν δύο ασθενείς Αλβανικής καταγωγής, και οι δύο με τον ίδιο ακριβώς γονότυπο, δηλ. το 3.7kb α<sup>+</sup> έλλειμμα σε συνδυασμό με την Hb Adana στο α2 γονίδιο. Και οι δύο διαγνώστηκαν νωρίς στην παιδική τους ηλικία με αναιμία και αιμόλυση στην δεύτερη περίπτωση, καθώς και την ανίχνευση ταχέων αιμοσφαιρινικών κλασμάτων. Η κλινική εικόνα της ενδιάμεσης μεσογειακής αναιμίας δεν απαιτήσε παρά μόνο σποραδικές μεταγγίσεις στην πρώτη περίπτωση, ενώ στην δεύτερη που αφορά σε ένα παιδί 2 ετών, ακολουθείται πρόγραμμα τακτικών μεταγγίσεων.

Ενδεχομένως άλλοι τροποποιητικοί παράγοντες επηρεάζουν την κλινική έκφραση του συνδυασμού αυτού. Στην βιβλιογραφία έχει περιγραφεί και περίπτωση εμβρυϊκού ύδρωπα σαν αποτέλεσμα της συνύπαρξης της Hb Adana στο α2 γονίδιο με μια α0 μετάλλαξη *in trans*. Αντίθετα η συνύπαρξη της Hb Adana στο α1 γονίδιο με μια α0 μετάλλαξη προκάλεσε εικόνα αιμοσφαιρινοπάθειας H με ανιχνεύσιμα επίπεδα Hb Bart's.

Η διαφορά αποδίδεται στην κυρίαρχη έκφραση του α2 γονιδίου. Η μετάλλαξη θεωρείται ότι παρεμποδίζει την αναδίπλωση της α αλυσίδας επηρεάζοντας κάποιες θέσεις επαφής εντός αυτής 34,35.

Στις α-ασταθείς αιμοσφαιρινοπάθειες-HbH η φαινοτυπική ποικιλομορφία επηρεάζεται δυνητικά από τις μοριακές βλάβες στα αλληλεπιδρώντα α γονίδια και από τον μηχανισμό της πρωτεϊνικής αστάθειας ανάλογα με την παθολογική α αλυσίδα. Αν και οι α θαλασσαιμικοί γονότυποι στους ασθενείς με κλασσική αιμοσφαιρινοπάθεια H σχετίζονται ισχυρά με τον κλινικό και αιματολογικό φαινότυπο 11 οι γονότυποι σε ασθενείς με υπερασταθείς ποικιλίες δεν συνδέονται ξεκάθαρα με τον σχηματισμό HbH. Πιθανώς ο ακριβής μηχανισμός της πρωτεϊνικής αστάθειας διαφέρει για κάθε μια από τις υπερασταθείς αιμοσφαιρίνες που περιγράψαμε και αυτό μπορεί να παίζει καθοριστικό ρόλο στη φαινοτυπική τους έκφραση.

Περισσότερες από 20 υπερασταθείς α αιμοσφαιρίνες έχουν περιγραφεί, οι οποίες όταν συνδυάζονται με άλλες μεταλλάξεις του α γονιδίου έχουν σαν αποτέλεσμα αιμοσφαιρινοπάθεια H ή αιμολυτική αναιμία<sup>36</sup>. Ένας τρίτος διακριτός φαινότυπος είναι αυτός της ενδιάμεσης μεσογειακής αναιμίας με εκσεσημασμένη δυσερυθροποίηση.

Η απουσία ανιχνεύσιμων παθολογικών αιμοσφαιρινικών κλασμάτων, συμπεριλαμβανομένης και της HbH, προκαλεί σύγχυση και απαιτούν DNA ανάλυση για τον ακριβή χαρακτηρισμό τους.

## 2.2.5 Κινηκή αντιμετώπιση της α-Μεσογειακής Αναιμίας

Στην πλειοψηφία των ασθενών τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης βρίσκονται γύρω στα 8-10g/dl και παραμένουν σχετικά σταθερά. Πτώση της τιμής της αιμοσφαιρίνης παρατηρείται κατά την διάρκεια εμπύρετων επεισοδίων, οπότε μπορεί να απαιτηθεί μετάγγιση. *Σε σπάνιες περιπτώσεις απαιτούνται τακτικές μεταγγίσεις επειδή τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης παραμένουν σταθερά χαμηλά ακόμη και χωρίς κάποιο εμπύρετο επεισόδιο.* Στις περιπτώσεις αυτές υπάρχει μεγαλύτερη σπληνομεγαλία και πιο έντονες οστικές αλλοιώσεις. *Συνήθως συστήνεται η λήψη φυλλικού οξέος (2-5 mg/ημ), ιδιαίτερα στα παιδιά προκειμένου να ανταποκριθούν στις ανάγκες της αυξημένης ερυθροποίησης.*

Η οξεία αιμόλυση μπορεί να είναι τόσο απότομη όσο και στην περίπτωση της έλλειψης G-6-PD και να οδηγήσει τον ασθενή σε βαρύτερη κλινική εικόνα. Σπάνια αναφερόμενη είναι και η απλαστική κρίση μετά από λοίμωξη συνοδεύεται από δικτυοερυθροκυτταροπενία, σημείο διαφορικής διάγνωσης από την οξεία αιμόλυση.

Παρά το γεγονός ότι οι περισσότεροι ασθενείς έχουν σπληνομεγαλία, *η σπληνεκτομή δεν συστήνεται όταν διατηρούν σταθερά επίπεδα αιμοσφαιρίνης και δεν απαιτούν συχνές μεταγγίσεις, δεν έχουν υπερσπληνισμό ή πιεστικά φαινόμενα λόγω του μεγέθους του σπληνός.*

Η σπληνεκτομή συνοδεύεται συνήθως από σημαντική αύξηση της αιμοσφαιρίνης και είναι αυτονόητο ότι μετεγχειρητικά λαμβάνονται όλα τα απαραίτητα μέτρα για την αποφυγή βακτηριακών λοιμώξεων και φλεβικής θρόμβωσης.

Οι ασθενείς με βαρύτερη κλινική εικόνα που μεταγγίζονται συστηματικά πρέπει να έχουν τη φροντίδα των πολυμεταγγιζομένων ασθενών, με έμφαση στην αποσιδήρωση.

Χολόλιθοι ανιχνεύονται στο >30% των ασθενών με αιμοσφαιρινοπάθεια Η και αποτελούν αιτία χολοκυστίτιδος και ανιούσης χολαγγειίτιδος<sup>37</sup>.

## 2.3β-Μεσογειακή Αναιμία

### 2.3.1 Μοριακή Βάση της β-Μεσογειακής Αναιμίας

Περισσότερες από **200** μεταλλάξεις έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα ότι επηρεάζουν την έκφραση των β γονιδίων αιμοσφαιρίνης (<http://globin.cse.psu.edu/hbvar/menu.html>).

Σε αντίθεση με την α MA η πλειοψηφία των μεταλλάξεων αυτών είναι σημειακές νουκλεοτιδικές αλλαγές για παράδειγμα αντικαταστάσεις μιας βάσης, ελλείμματα ή ενθέσεις λίγων νουκλεοτιδίων. Στους πληθυσμούς τους οποίους η MA είναι συχνή, την πλειοψηφία

των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων καλύπτουν λίγες κοινές μεταλλάξεις και στα υπόλοιπα παθολογικά αλληλόμορφα συναντάται ένας μεγαλύτερος αριθμός σπάνιων μεταλλάξεων.

Οι μεταλλάξεις οι οποίες περιορίζουν τη σύνθεση των β αλυσίδων αιμοσφαιρίνης είναι γνωστές ως μεταλλάξεις β<sup>+</sup> MA, ενώ αυτές οι οποίες καταργούν ολοκληρωτικά τη σύνθεσή τους ως μεταλλάξεις β<sup>0</sup> MA. Κάποιες μεταλλάξεις που επιτρέπουν σε ένα μεγάλο βαθμό τη σύνθεση των β αλυσίδων είναι γνωστές ως μεταλλάξεις β<sup>++</sup>. Οι περισσότερες μεταλλάξεις β<sup>0</sup> και β<sup>+</sup> έχουν επίπτωση στον αιματολογικό φαινότυπο των φορέων όπως σχετική αύξηση του αριθμού των ερυθροκυττάρων με μειωμένο μέσο όγκο, (MCV 60-70fl) και αιμοσφαιρίνη ανά κύτταρο (MCH 19-23pg) καθώς και χαρακτηριστική αύξηση των επιπέδων της αιμοσφαιρίνης A2, (Hb A2) συνήθως μεταξύ 4-6%. Παρ' όλα αυτά υπάρχουν εξαιρέσεις του φαινοτύπου αυτού όπως στις περιπτώσεις των «σιωπηρών φορέων» με φυσιολογικό ή σχεδόν φυσιολογικό φαινότυπο ή φορείς με μειωμένο MCV και MCH άλλες φορές με φυσιολογικά επίπεδα Hb A2 (<3.4%) ή συχνά με αυξημένα επίπεδα Hb A2 (>6%). Ορισμένοι φορείς συγκεκριμένων μεταλλάξεων β MA έχουν ελαφρώς αυξημένα επίπεδα Hb F (>2% - <5%), και οι φορείς δβ MA συνήθως έχουν ελαφρώς μειωμένους ερυθροκυτταρικούς δείκτες με αξιοσημείωτη αύξηση της Hb F (>5% και <10%) και φυσιολογικά ή ελαφρώς μειωμένα επίπεδα Hb A2. Οι μεταλλάξεις που προκαλούν πολλές από τις μη τυπικές μορφές β MA συνοψίζονται στον Πίνακα 3.

Οι σημειακές μεταλλάξεις που ευθύνονται για τη β MA ομαδοποιούνται με βάση το μηχανισμό που τροποποιούν τη σύνθεση των β αλυσίδων δηλαδή τη μεταγραφή, την επεξεργασία ή τη μετάφραση του RNA.

Οι μεταλλάξεις που επηρεάζουν τη μεταγραφή εντοπίζονται είτε στις συντηρημένες περιοχές του DNA στον υποκινητή του β γονιδίου (π.χ. στην θέση TATA, τη CCAAT ή τις αλληλουχίες CACCC) ή στην περιοχή των 50 νου-κλεοτιδίων στη 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου (5'UTR). Γενικά αυτές προκαλούν μια ήπια έως πολύ μικρή επίπτωση στην παραγωγή των β αλυσίδων και μερικές από αυτές σε ετερόζυγη κατάσταση δεν προκαλούν επίπτωση στον αιματολογικό φαινότυπο

(βλ. Πίνακα 3).

Υπάρχουν πάνω από 50 διαφορετικές μεταλλάξεις που επιδρούν σε διάφορα στάδια της επεξεργασίας του RNA, όπως **μεταλλάξεις στις θέσεις κοπής και επανασυγκόλλησης (μάτισμα), μεταλλάξεις μέσα στις συντηρημένες περιοχές στα άκρα των ιντρονίων, καθώς και εκείνων που ενεργοποιούν εναλλακτικές θέσεις ματίσματος του RNA** μέσα στα εξώνια ή τα ιντρόνια. Οι μεταλλάξεις που αλλάζουν τα δινουκλεοτίδια (GT στο 5' άκρο και AG στο 3') των ιντρονίων, αποτρέπουν τη σύνθεση του φυσιολογικού ώριμου RNA και προκαλούν β<sup>0</sup> MA.

*Τέτοιες μεταλλάξεις είναι η IVSI-1G>A η οποία είναι πολύ κοινή στις μεσογειακές χώρες, τη Μέση Ανατολή και την Ανατολική Ευρώπη, ή την IVSI-1G>T που είναι κοινή στην Ινδία και την Κίνα.*

<b>ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ</b>	<b>ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΔΙΑΤΑΡΑΧΗ</b>
Οριακά ή φυσιολογικά αιματολογικά ευρήματα	Μεταλλάξεις στις 5' και 3' μη μεταφραζόμενες περιοχές του γονιδίου: 1) -101 (C®T), -92 (C®T), 2) +33 (C®G), IVS2-844 (C®G), 3) +1480 (C®G)
Μειωμένοι ερυθροκυτταρικοί δείκτες & φυσιολογική ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρινών (περιλαμβανομένης της Hb A2)	1) Ετεροζυγωτία ήπιας μετάλλαξης b MA (κάποιες φορές οριακά αυξημένη A2) π.χ. Cap+1 (A®C), IVS1-6 (T®C) 2) συγκληρονόμηση μετάλλαξης d MA με τυπική μετάλλαξη b MA (cis ή trans) π.χ. αλληλόμορφο με την IVSI-5G>A και σε θέση cis το έλλειμμα 7.2kb που αφαιρεί το d γονίδιο (διαταραχή γνωστή ως db-Corfu) 3) Ετεροζυγωτία gdb ή egdb MA
Φυσιολογικοί ή μειωμένοι ερυθροκυτταρικοί δείκτες με Hb A2 >6,1%	Ελλείμματα ή σημειακές μεταλλάξεις στον υποκινητή του b Γονιδίου
Φυσιολογικοί ή μειωμένοι ερυθροκυτταρικοί δείκτες με αυξημένη Hb F και φυσιολογική HbA2	Ετεροζυγωτία db MA (περιλαμβάνεται η μετάλλαξη db-Lepore) ή HPFH

**Πίνακας 3.**

Μεταλλάξεις στις συντηρημένες περιοχές στα άκρα των ιντρονίων μειώνουν την αποτελεσματικότητα του ματίσματος, σε διαφορετικό βαθμό η κάθε μια προκαλώντας διαφορετικού βαθμού παραγωγή β αλυσίδων και δημιουργώντας φαινότυπο β<sup>+</sup> από ήπιο έως βαρύ. *Παραδείγματα είναι η IVSI-5G>C η οποία είναι βαριά μετάλλαξη και πιο συχνή στην Ινδία, Κίνα και Μέση Ανατολή, η IVS I-5 G->A που απαντάται στο πληθυσμό μας, ενώ η IVSI-6T>C που συνήθως προκαλεί έναν φαινότυπο β<sup>++</sup> MA και συναντάται σε όλα τα κράτη γύρω από τη Μεσόγειο, τη Μέση Ανατολή και την Ανατολική Ευρώπη.* Υπάρχουν πολλές μεταλλάξεις β MA που ενεργοποιούν εναλλακτικές θέσεις ματίσματος του RNA οι οποίες ανταγωνίζονται, στην πράξη, τις φυσιολογικές κατά τη διαδικασία της επεξεργασίας του πρώιμου RNA. Η βαρύτητά τους εξαρτάται από τη σχετική ποσότητα του φυσιολογικού σε σχέση με το παθολογικό RNA. Οι περισσότερες μεταλλάξεις που ενεργοποιούν εναλλακτικές θέσεις ματίσματος μέσα στα ιντρόνια ευθύνονται για βαριές μεταλλάξεις β<sup>+</sup> MA. *Τέτοιες μεταλλάξεις είναι η IVSII10G>A, η οποία είναι κοινή στη Μεσόγειο, τη Μέση Ανατολή και την Ανατολική Ευρώπη ή η IVSII-654C>T που είναι κοινή στη ΝΑ Ασία και την Κίνα.* Οι μεταλλάξεις που ενεργοποιούν εναλλακτικές θέσεις ματίσματος σε εξώνια συνήθως προκαλούν πιο ήπιο φαινότυπο β<sup>+</sup> ή β<sup>++</sup>, ενώ αυτές που

κωδικοποιούν την αλλαγή ενός αμινοξέως (παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις), προκαλούν την παραγωγή μιας παθολογικής β αλυσίδας.

Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η μετάλλαξη στο **κωδικόνιο 26 (GAG>AAG)** η οποία ενεργοποιεί μια εναλλακτική περιοχή θέσης ματίσματος στο εξόνιο 1 και παράλληλα δημιουργεί **την παθολογική αιμοσφαιρίνη Hb E (β26 Glu->Lys) η οποία είναι συχνή στην ΝΑ Ασία.**

Άλλες μεταλλάξεις που επηρεάζουν την επεξεργασία του RNA εντοπίζονται στην πόλυ Α ουρά του γονιδίου (AATAAA) ή στην 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου δημιουργώντας αλληλόμορφα με φαινότυπο β<sup>+</sup> MA. Κάποια από αυτά συνοδεύονται με φυσιολογικό φαινότυπο σε ετερόζυγη κατάσταση όπως η αντικατάσταση μιας βάσης στο έκτο νουκλεοτίδιο μετά το κωδικόνιο τερματισμού (+1480G>C)<sup>22</sup>.

Περίπου οι μισές από τις μεταλλάξεις που ευθύνονται για β MA επηρεάζουν τη μετάφραση του RNA και όλες έχουν σαν αποτέλεσμα β<sup>0</sup> MA. Οι διαταραχές αυτές μπορεί να προκαλούν είτε άμεσα ένα πολύ πρόωρο κωδικόνιο τερματισμού, είτε μετατοπίζοντας το πλαίσιο ανάγνωσης να δημιουργούν κωδικόνιο τερματισμού και πρόωρο τερματισμό της πρωτεϊνικής αλυσίδας μέσα στο εξόνιο 1 και 2. Τέτοιες μεταλλάξεις συνοδεύονται από την παρουσία ελάχιστων επιπέδων β mRNA στα ερυθροκύτταρα, εξ αιτίας μιας επιταχυνόμενης αποδόμησης ανώμαλων mRNA, ενός φαινομένου γνωστού ως «*nonsense-mediated mRNA decay*» (NMD)<sup>23</sup>. Στους ετεροζυγώτες τέτοιων μεταλλάξεων δεν παράγεται β αλυσίδα από το παθολογικό αλληλόμορφο και εμφανίζεται μόνο η φυσιολογική β αλυσίδα έχοντας σαν αποτέλεσμα έναν κλασσικό β θαλασσαιμικό φαινότυπο. Σε αντίθεση, μεταλλάξεις στο εξόνιο 3, που επιτρέπουν την παράταση της μετάφρασης, δημιουργούν μεγαλύτερου μήκους πρωτεϊνικά παράγωγα και δεν παρατηρείται το φαινόμενο NMD. Στις περιπτώσεις αυτές παράγεται μεγάλο ποσό παθολογικής πρωτεΐνης-αιμοσφαιρίνης. Ετεροζυγώτες τέτοιων μεταλλάξεων τείνουν να έχουν βαρύτερη φαινοτυπική εικόνα σε σχέση με τους απλούς φορείς β MA, στους οποίους υπάρχει μειωμένη σύνθεση και αποτελούν τη μορφή της β MA που κληρονομείται με επικρατητικό τρόπο. Τέλος υπάρχουν κάποιες μεταλλάξεις στο κωδικόνιο έναρξης (ATG) που επηρεάζουν την έναρξη της μεταγραφής του RNA και έχουν σαν αποτέλεσμα β<sup>0</sup> MA.

Λιγότερο συχνές είναι οι μεταλλάξεις β MA που οφείλονται σε ελλείμματα στο σύμπλεγμα των β γονιδίων αιμοσφαιρίνης. Υπάρχουν ελλείμματα που αφαιρούν μέρος ή ολόκληρο το β γονίδιο, των οποίων το μέγεθος ποικίλει από 290 bp έως και περισσότερο από 60 Kb. Από τα ελλείμματα αυτά ένα κομμάτι 619 bp στο 3' άκρο του β γονιδίου είναι κοινό για όλα και εντοπίζεται κυρίως σε περιορισμένους πληθυσμούς στο Πακιστάν και στην Ινδία. Τα υπόλοιπα ελλείμματα είναι πολύ σπάνια. Τα ελλείμματα που αφαιρούν ένα μέρος του υποκινητή του β γονιδίου που περιέχει τις αλληλουχίες CACCC, CCAAT και TATA συχνά



συνοδεύονται με ασυνήθιστα αυξημένα επίπεδα Hb A2, στους ετεροζυγώτες. Ο μηχανισμός που προκαλεί την αύξηση αυτή φαίνεται να σχετίζεται με την αφαίρεση του υποκινητή με την οποία καταργείται ο ανταγωνισμός του β γονιδίου στην αλληλεπίδραση με την περιοχή LCR η οποία αλληλεπιδρά με τα γ και δ γονίδια που βρίσκονται σε θέση cis και κατά συνέπεια ενισχύεται η έκφραση των γονιδίων αυτών. Ο μηχανισμός αυτός προφανώς εξηγεί την αύξηση των επιπέδων της Hb F που συνήθως παρατηρείται στα ελλείμματα αυτής της ομάδας αλλά και στις μεταλλάξεις β MA στην περιοχή του υποκινητή του β γονιδίου. Αν και η αύξηση της Hb F ποικίλει στους ετεροζυγώτες, είναι συχνά ικανή να αντισταθμίσει την ολοκληρωτική έλλειψη της β αλυσίδας στους ομοζυγώτες.

Η έκφραση του β γονιδίου μπορεί επίσης να κατασταλεί από ελλείμματα στο σύμπλεγμα των β γονιδίων αιμοσφαιρίνης όπως τα εγδβ0 MA. Τα ελλείμματα αυτά διακρίνονται σε δυο ομάδες

Στη μια ομάδα ανήκουν ελλείμματα που αφαιρούν ολόκληρο ή το μεγαλύτερο μέρος του συμπλέγματος των β γονιδίων μαζί με το β γονίδιο.

Στην άλλη τα ελλείμματα αφαιρούν περιοχή προς το 5' άκρο του συμπλέγματος αφήνοντας ανέπαφο το β γονίδιο. Η καταστολή της έκφρασης στις περιπτώσεις αυτές οφείλεται στην απουσία της LCR περιοχής. Οι ετεροζυγώτες για εγδβ0 MA τείνουν να είναι περισσότερο αναιμικοί με μεγαλύτερο βαθμό μικροκυττάρωση και υποχρωμία από αυτή των απλών ετεροζυγωτών β MA και επί πλέον έχουν φυσιολογικά επίπεδα Hb A224.

Οι γενετικές διαταραχές που ευθύνονται για τη β MA, στον Ελληνικό χώρο, παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια.

Από μελέτες που έχουν γίνει σε ασθενείς με β MA και μεγάλο αριθμό ετεροζυγωτών έχουν καταγραφεί περίπου 35 σημειακές μεταλλάξεις που εντοπίζονται στο β γονίδιο αιμοσφαιρίνης από τις οποίες οι 11 εξ αυτών καλύπτουν περίπου το 98% των παθολογικών αλληλομόρφων 25-27.

Population	Geographic region or ethnic group	Gene	Disease	Mutation	Frequency	Curator (submission)
8Greek	HBB	141900	HBB	c.*+111A>G	0.1000%	HbVar (1)
Greek	HBB	141900	HBB	c.-137C>G	1.9200%	HbVar (1)
Greek	HBB	141900	HBB	c.-151C>T	0.3000%	HbVar (1)
Greek	HBB	141900	HBB	c.-80T>A	0.1000%	HbVar (1)
Greek	HBB	141900	HBB	c.118C>T	19.5100%	HbVar (1)
Greek	HBB	141900	HBB	c.17_18delCT	0.6100%	HbVar (1)
Greek	HBB	141900	HBB	c.20delA	2.8300%	HbVar (1)
Greek	HBB	141900	HBB	c.25_26delAA	0.9100%	HbVar (1)
Greek	HBB	141900	HBB	c.27_28insG	0.1000%	HbVar (1)
Greek	HBB	141900	HBB	c.315+1G>A	2.0200%	HbVar (1)

<u>Greek</u>	<u>HBB</u>	<u>141900</u>	<u>HBB</u>	<b>c.316-106C&gt;G</b>	<b>4.3500%</b>	HbVar (1)
<u>Greek</u>	<u>HBB</u>	<u>141900</u>	<u>HBB</u>	<b>c.316-3C&gt;A</b>	<b>0.2000%</b>	HbVar (1)
<u>Greek</u>	<u>HBB</u>	<u>141900</u>	<u>HBB</u>	<b>c.76_92+27del</b>	<b>0.2000%</b>	HbVar (1)
<u>Greek</u>	<u>HBB</u>	<u>141900</u>	<u>HBB</u>	<b>c.92+1G&gt;A</b>	<b>13.6500%</b>	HbVar (1)
<u>Greek</u>	<u>HBB</u>	<u>141900</u>	<u>HBB</u>	<b>c.92+5G&gt;A</b>	<b>0.3000%</b>	HbVar (1)
<u>Greek</u>	<u>HBB</u>	<u>141900</u>	<u>HBB</u>	<b>c.92+6T&gt;C</b>	<b>8.1900%</b>	HbVar (1)
<u>Greek</u>	<u>HBB</u>	<u>141900</u>	<u>HBB</u>	<b>c.93-21G&gt;A</b>	<b>42.9700%</b>	HbVar (1)
<u>Greek</u>	<u>HBB</u>	<u>141900</u>	<u>HBB</u>	<b>Uncharacterized</b>	<b>1.7400%</b>	HbVar (1)

Πίνακας 4

Συχνότερες μεταλλάξεις στην Ελλάδα.

### 2.3.2 Παραλλαγές της β-Μεσογειακής Αναιμίας

Υπάρχουν κάποιες σπάνιες μορφές β MA που κληρονομούνται με επικρατητικό τρόπο. Σε αυτό τον τύπο κληρονομικότητας ένα και μόνο παθολογικό αλληλόμορφο προκαλεί την κλινική εκδήλωση της νόσου. Οι ετεροζυγώτες αυτοί έχουν κλινικά και αιματολογικά χαρακτηριστικά ενδιάμεσης MA και εμφανίζουν συχνά έγκλειστα στα πρόδρομα ερυθροκύτταρα και αιμόλυση στο περιφερικό αίμα. Έχουν αναφερθεί περισσότερα από 30 τέτοια αλληλόμορφα β MA. Πολλά από αυτά βρέθηκαν σε μεμονωμένες οικογένειες αλλά και κάποια εντοπίστηκαν σε περιστατικά όπου η αλλαγή δημιουργήθηκε «de novo».

Στα αλληλόμορφα αυτά περιλαμβάνονται ένα πλήθος μοριακών βλαβών από παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις έως δημιουργία «κολοβών» β αλυσίδων σαν αποτέλεσμα μη νοηματικών μεταλλάξεων. *Η νουκλεοτιδική αλλαγή που εντοπίζεται σε όλες τις περιπτώσεις προκαλεί σύνθεση ιδιαίτερα ασταθών β αλυσίδων οι οποίες είναι, συνήθως, μη ανιχνεύσιμες σε πρωτεϊνικό επίπεδο, και η ύπαρξή τους εντοπίζεται μόνο στο DNA.* Η κλινική βαρύτητα αυτής της μορφής β MA εξαρτάται από την αστάθεια των παθολογικών β αλυσίδων αιμοσφαιρίνης<sup>28</sup>.

Σε πολλές οικογένειες η ανάλυση σύνδεσης απέδειξε ότι ο φαινότυπος της β MA κληρονομείται ανεξάρτητα από το σύμπλεγμα των β αλυσίδων αιμοσφαιρίνης, υποδεικνύοντας ότι η γενετική διαταραχή ανήκει σε παράγοντες που επιδρούν από άλλες περιοχές του γονιδιώματος (trans-acting). Περίπου το 1% των περιπτώσεων της β MA μπορεί να ανήκει σε αυτή την κατηγορία. Μεταλλάξεις στον αντιγραφικό παράγοντα *GATA 1* στο χρωμόσωμα X έχει αναφερθεί ότι προκαλεί β MA μαζί με θρομβοπενία.

Αυτό ήταν το πρώτο παράδειγμα β MA στον άνθρωπο που οφείλονταν σε μετάλλαξη ενός ερυθροειδικού μεταγραφικού παράγοντα<sup>29</sup>.

Πρόσφατα βρέθηκε ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο *XPD* που προκαλεί μελαχρωματική ξηροδερμία συχνά συνοδεύονται από φαινότυπο ετερόζυγης β MA, δηλαδή μειωμένη



παραγωγή β αλυσίδων και μειωμένα επίπεδα β mRNA. Έχει διαπιστωθεί ότι η πρωτεΐνη XPD αποτελεί μια υπομονάδα του βασικού μεταγραφικού παράγοντα TF11H ο οποίος εμπλέκεται και στη διόρθωση του DNA30.

Ένας άλλος μηχανισμός ενδιάμεσης MA, που έχει αναφερθεί, είναι η δημιουργία σωματικής μετάλλαξης στο β γονίδιο. Η διαταραχή αυτή έχει περιγραφεί σε ένα πολύ περιορισμένο αριθμό ασθενών με κλινικό φαινότυπο ενδιάμεσης MA στους οποίους εντοπίζεται ετερόζυγη μορφή β MA και φυσιολογικός γονότυπος α MA

Η διερεύνηση των περιστατικών αυτών αποκάλυψε ότι σε ένα ποσοστό των σωματικών κυττάρων τους, είχαν έλλειμμα στο χρωμόσωμα 11p15, στο οποίο περιλαμβάνονταν και το σύμπλεγμα των β γονιδίων αιμοσφαιρίνης.

Αυτό σημαίνει ότι στα περιστατικά αυτά κάποια σωματικά κύτταρα διέθεταν ένα β γονίδιο ενώ άλλα (με το έλλειμμα) κανένα. Σαν αποτέλεσμα, η συνολική ποσότητα του β γονιδίου που παράγονταν στον οργανισμό ήταν μικρότερη από αυτή ενός κοινού ετεροζυγώτη β MA31,32.

Τέλος μεταθετά στοιχεία μπορούν περιστασιακά να διαταράξουν την έκφραση ανθρώπινων γονιδίων και να τα οδηγήσουν σε απενεργοποίηση. *Η εισαγωγή τέτοιου στοιχείου, (retrotransposition) της οικογένειας που ονομάζεται L1, έχει αναφερθεί σε ένα περιστατικό με φαινότυπο β+ MA33.*

### 2.3.3 Ενδιάμεση β-Μεσογειακή Αναιμία

#### Εισαγωγή

Αρκετά χρόνια μετά την πρώτη περιγραφή της MA από τον Cooley, ο Sturgeon περιέγραψε ένα μικρό αριθμό ασθενών με κλινικά χαρακτηριστικά πολύ ήπια για να χαρακτηρίσουν ασθενείς με μείζονα MA, αλλά και αρκετά σοβαρά για να χαρακτηρίσουν φορείς της νόσου1.

Πρότεινε, τότε, τον όρο «ενδιάμεση μεσογειακή αναιμία» για να περιγράψει τους ασθενείς αυτούς.

Η ενδιάμεση μεσογειακή αναιμία (EMA) είναι ένας κλινικός ορισμός που καθορίζει την ενδιάμεσης βαρύτητας μορφή της μεσογειακής αναιμίας (MA), που παρουσιάζει έναν ευρύ κλινικό φάσμα το οποίο κινείται ανάμεσα στην ασυμπτωματική φορεία και τη μεταγγισιοεξαρτώμενη μείζονα MA2. Η σημαντική κλινική ετερογένεια της EMA είναι αποτέλεσμα αντίστοιχης μοριακής ετερογένειας, αλλά και παρουσίας επιπρόσθετων ρυθμιστικών παραγόντων. Τα τελευταία χρόνια έχει συντελεστεί σημαντική πρόοδος στην

κατανόηση της μοριακής και παθοφυσιολογικής βάσης των ενδιάμεσων μορφών της μεσογειακής αναιμίας.

### **Γονότυπος-Φαινότυπος**

Αν και ο όρος EMA παραμένει έως και σήμερα, ουσιαστικά, κλινικός, τα τελευταία χρόνια οι γνώσεις πάνω στην μοριακή βάση της νόσου έχουν προχωρήσει ση-

μαντικά. Είναι γνωστό, ότι για να μπορέσει να λειτουργήσει η αιμοσφαιρίνη σωστά θα πρέπει ο αριθμός των  $\alpha$ -αλυσίδων να είναι ίσος με τον αριθμό των  $\beta$ -αλυσίδων.

Ανάλογα με το ποια αλυσίδα υπολείπεται καθορίζεται και ο τύπος της MA σε  $\alpha$ - και  $\beta$ -. Το μέγεθος της καταστολής ποικίλει από ασθενή σε ασθενή, καθορίζει τον κλινικό

φαινότυπο και έχει γονοτυπική βάση. Η φυσική ιστορία της EMA εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ανισορροπία παραγωγής μεταξύ των  $\alpha$ - και  $\beta$ - αλυσίδων. Έτσι,

σε καταστάσεις που θα έπρεπε να εκδηλώνονται ως μείζονα MA, οποιοσδήποτε παράγοντας σχετίζεται με μείωση αυτής της ανισότητας, οδηγεί σε εκδήλωση ηπιότερης κλινικής εικόνας.

Κατ' αντιστοιχία, παράγοντες οι οποίοι επιδεινώνουν την ανισορροπία μπορούν να μετατρέψουν μία συνήθως ασυμπτωματική κατάσταση ετεροζυγωτίας σε κλινικά σημαντική EMA.

***Οι περισσότεροι ασθενείς με  $\beta$ -EMA είναι ομοζυγώτες ή διπλοί ετεροζυγώτες μεταλλάξεων του  $\beta$ -γονιδίου, δηλαδή, φέρουν βλάβη και στα δύο  $\beta$ -γονίδια που ευθύνονται για την παραγωγή των  $\beta$ -αλυσίδων.***

Τα ήπια κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με  $\beta$ -EMA σχετίζονται με έναν ή περισσότερους από τους ακόλουθους μηχανισμούς:

1. *Κληρονόμηση* μίας, τουλάχιστον, σιωπηλής ή ήπιας μετάλλαξης. Οι μεταλλάξεις αυτές οδηγούν σε ήπια μόνο μείωση στη σύνθεση των  $\beta$ -αλύσεων και συνοδεύονται από μη τυπικό φαινότυπο σε ετερόζυγη κατάσταση.

Σ' αυτή την κατηγορία συμπεριλαμβάνονται μεταλλάξεις «σιωπηρού τύπου» οι οποίες χαρακτηρίζονται *από φυσιολογικές τιμές HbA2 και HbF και αιματολογικών δεικτών*. Όλες οι μεταλλάξεις που αφορούν τη «σιωπηρού» τύπου  $\beta$ -Μεσογειακή αναιμία εκδηλώνονται φαινοτυπικά μόνον όταν κληρονομούνται συγχρόνως με μία βαριά  $\beta$ -μετάλλαξη και η πλειοψηφία αυτών των ασθενών παρουσιάζει μία ήπια μη εξαρτώμενη από μεταγίσεις ενδιάμεση μεσογειακή αναιμία, με σπάνιες εξαιρέσεις. ***Οι ήπιες  $\beta$ + μεταλλάξεις +1480 G>C και -101C>T αποτελούν κοινά αίτια «σιωπηρού» τύπου  $\beta$ -Μεσογειακής αναιμίας.***

Χαρακτηριστικά, σε 12 ασθενείς διπλοί ετεροζυγώτες  $\beta$ + +1480 G>C και μιας 2ης μετάλλαξης στο  $\beta$ -γονίδιο, μέσης ηλικίας 7,4 ετών, είχαν μέση Hb 9 g/dl, MCV65.2 fl, HbF 11.2% και HbA2 5,6%. Αντίστοιχα, 25ασθενείς διπλοί ετεροζυγώτες  $\beta$ + -101 C>T και μιας

2ης μετάλλαξης στο β-γονίδιο, είχαν μέση Hb 9,6 g/dl, MCV 62,4 fl, HbF 13,9% και HbA2 6,4%<sup>11-13</sup>.

2. *Συνκληρονόμηση* ομόζυγης β-MA και παραγόντων που σχετίζονται με αυξημένη παραγωγή γ-αλυσίδων (HPFH, πολυμορφισμός XmnI): Στις περιπτώσεις αυτές, οι παραγόμενες γ-αλυσίδες βοηθούν στην «εξουδετέρωση» του μεγάλου αριθμού των ελεύθερων α-αλυσίδων.

3. *Συνκληρονόμηση* ομόζυγης β- MA με κάποια μορφή α-MA: Στην περίπτωση αυτή, υπάρχει καταστολή της παραγωγής α-αλυσίδων και περιορισμός της ανισότητας μεταξύ των α- και β-αλυσίδων.

4. *Παρουσία διπλής ετεροζυγωτίας* β-MA και δβ-MA ή ομοζυγωτίας δβ-MA.

5. *Διπλή ετεροζυγωτία για β ή δβ θαλασσαιμία και δομικές παραλλαγές της β-αλυσίδας όπως αιμοσφαιρίνη E.11*

Σε σπάνιες περιπτώσεις, παρατηρείται βλάβη σε ένα μόνον από τα δύο β-γονίδια<sup>4</sup>. Η εκδήλωση EMA σε ασθενείς που φέρουν μετάλλαξη μόνο στο ένα β-γονίδιο μπορεί να σχετίζεται με έναν από τους ακόλουθους μηχανισμούς<sup>12-19</sup>:

1. *Συνκληρονόμηση* ετεροζυγωτίας β-MA και τριπλασιασμένου ή τετραπλασιασμένου α-γονιδίου.

Σε ετεροζυγώτες β-MA, η συνύπαρξη τριπλασιασμένου α-γονιδίου<sup>10</sup> και επομένως η αύξηση της περισσειας των α-αλυσίδων που ήδη υπάρχει, επιβαρύνει τις αιματολογικές παραμέτρους που συνήθως χαρακτηρίζουν τους απλούς φορείς της νόσου. Πολύ περισσότερο, ο συνδυασμός ετερόζυγης β-MA και ομοζύγου τριπλασιασμένου α-γονιδίου έχει σαν αποτέλεσμα ακόμη μεγαλύτερη ανισορροπία των αλυσίδων σφαιρίνης που συγκρίνεται με αυτήν που παρατηρείται σε πάσχοντες από β-MA. Τέτοιοι ασθενείς έχουν κλινικές εκδηλώσεις και αιματολογικούς δείκτες συμβατά **με ενδιάμεση μεσογειακή αναιμία, χωρίς την ανάγκη συστηματικών μεταγγίσεων**. Τα αιματολογικά χαρακτηριστικά 17 ασθενών με αυτό τον γονότυπο έδειξαν μέση Hb 9,95 g/dl, MCV 63,4 fl, και HbF 4,9%<sup>14-16</sup>.

2. *Κληρονόμηση* μορφών β-MA που μεταδίδονται με τον κυρίαρχο σωματικό χαρακτήρα

3. *Μεταλλάξεις* που οδηγούν σε ασταθείς β-αλυσίδες γίνονται εμφανείς κλινικά ακόμη και σε ετερόζυγο μορφή με εικόνα EMA με βαριά δυσερυθροποιητική αναιμία και σπληνομεγαλία.

Αντίστοιχα, η μη έκφραση 3 από τα 4 α-γονίδια οδηγεί κατά κανόνα σε α-EMA. Ο κλινικός φαινότυπος εξαρτάται από το συνδυασμό των μεταλλάξεων στα α-γονίδια, που μπορεί να οδηγεί σε πλήρη ή μερική απώλεια παραγωγής α-αλυσίδας από τα αντίστοιχα γονίδια (αιμοσφαιρινοπάθεια H) ή παραγωγή μεταλλαγμένης ασταθούς αλυσίδας (π.χ. Αιμοσφαιρίνη Αγρίνιο).

Οι γονότυποι που σχετίζονται με την εκδήλωση EMA ποικίλλουν στους διάφορους πληθυσμούς, ενώ νέες γενετικές μεταβολές στα σχετιζόμενα γονίδια, αλλά και νέοι εμπλεκόμενοι μηχανισμοί αποκαλύπτονται διαρκώς<sup>24-25</sup>. Επιπρόσθετοι γενετικοί

παράγοντες, ανεξάρτητοι των μεταλλάξεων που αφορούν στην παραγωγή των σφαιρικών αλυσίδων, μπορεί να επιδράσουν στον κλινικό φαινότυπο της νόσου. Τέτοιοι παράγοντες **είναι πολυμορφισμοί που σχετίζονται με τον οστικό μεταβολισμό, με το μεταβολισμό του σιδήρου αλλά και με το μεταβολισμό της χολερυθρίνης.**

Λόγω, λοιπόν, της αλληλεπίδρασης πολλαπλών γενετικών παραγόντων στην εκδήλωση του κλινικού φαινοτύπου, η διάγνωση της EMA παραμένει, βασικά, κλινική με κύριο στοιχείο της διάγνωσης τη μη εξάρτηση του ασθενούς από μεταγγίσεις<sup>27</sup>. Ως αποτέλεσμα της φαινοτυπικής ετερογένειας, ποικίλλει και η ηλικία διάγνωσης της νόσου.

Σε ασθενείς με ήπια εικόνα η διάγνωση μπορεί να καθυστερήσει αρκετά, αφού η νόσος παραμένει ασυμπτωματική κατά την παιδική ηλικία, με εμφάνιση μόνον ήπιας αναιμίας. Αντίθετα, σε ασθενείς με σοβαρό φαινότυπο η διάγνωση τίθεται συνήθως σε ηλικία 2-6ετών και, παρά το ότι αυτοί επιβιώνουν χωρίς την εφαρμογή τακτικών μεταγγίσεων, παρατηρούνται σκελετικές διαταραχές και καθυστέρηση της σωματικής αύξησης.

Για τον ακριβή καθορισμό της βαρύτητας του κλινικού φαινοτύπου, πολλοί μελετητές χρησιμοποιούν κλινικά και εργαστηριακά κριτήρια, όπως είναι η ηλικία διάγνωσης, ο βαθμός της αναιμίας, ο επηρεασμός της σωματικής αύξησης, η μυελική υπερπλασία, η σπληνομεγαλία και οι ανάγκες σε μεταγγίσεις<sup>5,30</sup> (Πίνακας 5). Η υιοθέτηση μιας κοινής ταξινόμησης θα ήταν εξαιρετικά χρήσιμη για τη δημιουργία συγκεκριμένων θεραπευτικών πρωτοκόλλων, καθώς μέχρι στιγμής η αντιμετώπιση των ασθενών εξατομικεύεται, με κίνδυνο συχνά υπερ- ή υπο-θεραπείας, ανάλογα με τις συνήθειες κατά τόπους πρακτικές.

<b>ΚΡΙΤΗΡΙΑ</b>	<b>ΒΑΡΥΣ ΤΥΠΟΣ</b>	<b>ΗΠΙΟΣ ΤΥΠΟΣ</b>
Ηλικία διάγνωσης	2-6	6-12
Αιμοσφαιρίνη (g/dl)	6-8	8-10
Διαταραχή ανάπτυξης	+ μέχρι ++	0 μέχρι +
Οστικές αλλοιώσεις	+ μέχρι +++	0 μέχρι ++
Σπληνομεγαλία	+ μέχρι +++	+ μέχρι ++
Μεταγγίσεις	Σποραδικά	Καμία

Πίνακας 5.

Βαθμός βαρύτητας 0=κφ, +=ήπια, ++=ενδιάμεση, +++=βαριά

\*Hb>8g/dl μέχρι ηλικίας 6 ετών

### 2.3.3.1 Παθοφυσιολογία των κλινικών εκδηλώσεων

Τρεις είναι οι κύριοι παράγοντες που ευθύνονται για τις κλινικές εκδηλώσεις της EMA:

1. Η μη αποδοτική ερυθροποίηση
2. Η χρόνια αιμολυτική αναιμία
3. Η υπερφόρτωση με σίδηρο 6,29.

Ο βαθμός της μη αποδοτικής ερυθροποίησης αποτελεί τον πλέον καθοριστικό παράγοντα για την ανάπτυξη της αναιμίας, ενώ η περιφερική αιμόλυση των ώριμων ερυθροκυττάρων επιδρά δευτερευόντως<sup>31</sup>. **Η αναιμία είναι άλλοτε άλλου βαθμού και μπορεί να επιδεινωθεί σε ειδικές καταστάσεις και κυρίως στη φάση λοιμώξεων και έντονου σωματικού στρες.** Ακόμα αποτέλεσμα της μη αποδοτικής αιμοποίησης **είναι η υπερπλασία του μυελού των οστών και η εμφάνιση εξωμυελικών θέσεων αιμοποίησης<sup>2,32,33</sup>.** Η μυελική υπερπλασία οδηγεί σε χαρακτηριστικές σκελετικές ανωμαλίες του κρανίου και του προσώπου, καθώς και σε λέπτυνση του οστικού φλοιού με εκδήλωση παθολογικών καταγμάτων.

Αν και η περιφερική αιμόλυση δεν επηρεάζει σημαντικά το βαθμό της αναιμίας, ωστόσο, έχει συσχετιστεί με σοβαρές επιπλοκές της νόσου **όπως είναι η πνευμονική υπέρταση και η εκδήλωση θρομβοεμβολικών επεισοδίων.** Αναλυτικότερα, τα κατεστραμμένα ερυθρά που προκύπτουν από τη διαδικασία της αιμόλυσης, η παρουσία ενεργοποίησης αιμοπεταλίων, ενδοθηλιακών κυττάρων και μονοκυττάρων και η συνυπάρχουσα δυσλειτουργία του μηχανισμού της πήξης, δημιουργούν, τελικά, μία κατάσταση υπερπηκτικότητας, ιδιαίτερα σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε σπληνεκτομή. Τέλος, η αιμόλυση σχετίζεται με διαταραχή της ομοιοστατικής ρύθμισης του νιτρικού οξειδίου, γεγονός που έχει συσχετιστεί με την εκδήλωση πνευμονικής υπέρτασης. Η περιφερική αιμόλυση συμβάλλει και στην ανάπτυξη σημαντικής σπληνομεγαλίας.

Σε αντίθεση με τη μείζονα β-MA στην οποία η υπερφόρτωση με σίδηρο είναι βασικό επακόλουθο των μεταγγίσεων, στην EMA η αιμοσιδήρωση είναι, κυρίως, αποτέλεσμα αυξημένης εντερικής απορρόφησης σιδήρου.

Στους πολυμεταγγιζόμενους θαλασσαιμικούς ασθενείς ο σίδηρος συσσωρεύεται αρχικά στα δικτυοενδοθηλιακά κύτταρα και ακολούθως στα παρεγχυματικά κύτταρα.

Η εναπόθεση σιδήρου στα δικτυοενδοθηλιακά μακροφάγα οδηγεί σε αυξημένη σύνθεση φερριτίνης και απελευθέρωσή της στην κυκλοφορία.

Στην EMA, αντίθετα, ο συνδυασμός μη αποδοτικής ερυθροποίησης και χρόνιας αναιμίας/υποξίας οδηγεί σε καταστολή της ενζιμικής, σε αύξηση της εντερικής απορρόφησης του σιδήρου και σε αυξημένη απελευθέρωση ανακυκλούμενου σιδήρου από το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα. Αυτό συνεπάγεται ελάττωση του μακροφαγοκυτταρικού σιδήρου, σχετικά χαμηλά επίπεδα φερριτίνης και επιλεκτική αιμοσιδήρωση των

παρεγχυματικών κυττάρων. Χαρακτηριστικά, οι ασθενείς με EMA σε σχέση με μεταγγισιοεξαρτώμενους ασθενείς με MA και παρόμοια επίπεδα φερριτίνης, παρουσιάζουν σημαντικά υψηλότερη υπερφόρτωση με σίδηρο στο ήπαρ. Αντίστροφα, σπανιότατα εμφανίζουν φόρτωση στην καρδιά.<sup>42</sup> Οι ασθενείς, λοιπόν, με EMA μπορεί να παρουσιάσουν ποικίλες επιπλοκές ως αποτέλεσμα αιμοσιδήρωσης, έστω και αν αυτή επιτελείται με βραδύτερο ρυθμό σε σχέση με αυτόν που παρατηρείται στους μεταγγισιοεξαρτώμενους ασθενείς. Οι επιπλοκές αυτές αφορούν κυρίως τους ενδοκρινείς αδένες (*υποθυρεοειδισμό, υποπαραθυρεοειδισμό, σακχαρώδη διαβήτη, υπογοναδισμό, κ.λπ.*) και το ήπαρ (*σταδιακή ίνωση ως και κίρρωση*). Οι επιπλοκές αυτές είναι κατά κανόνα συσσωρευτικές και η συχνότητα τους αυξάνει με τη ηλικία.

### 2.3.3.2 Εργαστηριακή Διερεύνηση

Στις δομικές αιμοσφαιρινοπάθειες, οι δείκτες των ερυθρών είναι σημαντικοί για τη διάγνωση των αιμοσφαιρινοπαθειών. *Αυτοί οι δείκτες περιλαμβάνουν την αιμοσφαιρίνη, τον αριθμό των ερυθρών και την κατανομή των ερυθρών.* Είναι γνωστό ότι, οι θαλασσαιμίες ανήκουν στις υπόχρωμες μικροκυτταρικές αναιμίες. Ο μέσος όγκος ερυθρών (**MCV**) είναι το κλειδί και ένας από τους σημαντικότερους δείκτες της διάγνωσης. Οι θαλασσαιμικοί ασθενείς έχουν ελαττωμένο MCV<sup>5</sup> και μία μελέτη έχει δείξει ότι MCV 72fL είναι ένας δείκτης πολύ ευαίσθητος και ειδικός για μια πιθανή διάγνωση θαλασσαιμικού συνδρόμου.

*Το RDW (εύρος κατανομής όγκου των ερυθρών)* είναι ένας δείκτης που φανερώνει την ποικιλία του μεγέθους των ερυθρών (ανισοκυττάρωση). Πολλές υπόχρωμες μικροκυτταρικές αναιμίες χαρακτηρίζονται από αύξηση του RDW, ενώ αντίθετα στις θαλασσαιμίες παράγεται ένας μοναδικός μικροκυτταρικός πληθυσμός ερυθρών, χωρίς συνεπακόλουθη αύξηση του RDW με εξαίρεση την αιμοσφαιρινοπάθεια H και την ετερόζυγη δβ-Μεσογειακή αναιμία. Παρ' όλα αυτά το RDW είναι ένας χρήσιμος δείκτης αλλά όχι μοναδικός για τη διάγνωση των θαλασσαιμικών συνδρόμων.

Ένας άλλος δείκτης που είναι επίσης χρήσιμος, είναι *ο αριθμός των ερυθρών*, γιατί η μικροκυτταρική αναιμία της Μεσογειακής αναιμίας συνοδεύεται από αυξημένο αριθμό ερυθρών αιμοσφαιρίων. Επίσης στη μείζονα και ενδιάμεση Μεσογειακή αναιμία υπάρχει μέτρια ή σοβαρή ελάττωση της συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης.

Για το χαρακτηρισμό του αιματολογικού φαινοτύπου, συνεκτιμώνται *οι τιμές της αιμοσφαιρίνης, του αιματοκρίτη, του αριθμού των ερυθρών, των ερυθροκυτταρικών δεικτών (MCV, MCH) και τα επίπεδα της HbA2 και HbF.*

Σημαντικό ρόλο παίζουν *τα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης* κατά τη διάγνωση της ενδιάμεσης Μεσογειακής αναιμίας καθώς και *η σύνθεση της αιμοσφαιρίνης. Αξιολογώντας αυτά τα*

στοιχεία που προσφέρονται από την γενική αίματος και την ηλεκτροφόρηση της Hb, μπορεί να γίνει σχετικά αξιόπιστη εκτίμηση για το γονότυπο του ασθενούς (Πίνακας 6.Γραφική παράσταση 1).

MCV fL	< 78	< 78	≤ 78		89.5±4.9	κφ	κφ	
MCH pg	< 27	< 27	≤ 27		29.8±1.5	κφ	κφ	
Hb pattern	A+F(0.1-7%) +A <sub>2</sub> >3.5%	A+A <sub>2</sub> <3.5% Fe φυσιολ.	A+F(3-16%) +A <sub>2</sub> <3.2%	A+παθολ. Hb+A <sub>2</sub>	HbA <sub>2</sub> 2.8-3.5	HbA <sub>2</sub> κφ HbF κφ	κφ	Ασταθής β-άλυσίδα Heinz +
Διάγνωση	Ετερόζυγος β		Ετερόζυγος δβ ή HPFH	S,C,D,G,O,E, Lepore	β <sup>thal</sup> silent	β <sup>thal</sup> silent	Φορέας τριπλασιασμένου α (aaa/aa)	DNA έλεγχος για ασταθή β- άλυσίδα
Περαιτέρω έλεγχος	Ανάλυση DNA (β <sup>+</sup> ή β <sup>0</sup> )	DNA για α- MA						

**Ενδιάμεση β-Μεσογειακή Αναμία**

Ετερόζυγος β-MA(β<sup>0</sup>, β<sup>+</sup>, β<sup>+</sup>)

Κυριότεροι συνδυασμοί β και α-θαλασσαιμικών γονιδίων Ενδιάμεσης Μεσογειακής Αναμίας

β <sup>+</sup> /β <sup>+</sup>	β <sup>+</sup> /β <sup>+</sup> ή β <sup>0</sup> /β <sup>+</sup> --/aa ή --/a
β <sup>0</sup> /β <sup>+</sup>	β <sup>+</sup> /β <sup>+</sup> ή β <sup>0</sup> /β <sup>+</sup> non del α2
β <sup>0</sup> /β <sup>silent</sup>	β <sup>+</sup> /β <sup>+</sup> ή β <sup>0</sup> /β <sup>+</sup> -a/aa ή --/aa
β <sup>silent</sup> /β <sup>silent</sup>	

Στο επίχρισμα του περιφερικού αίματος εμφανίζονται όλες οι χαρακτηριστικές αλλοιώσεις των ερυθρών:

- 1.υποχρωμία
- 2.ανισοκυττάρωση
- 3.μικροκυττάρωση
- 4.ποικολοκυττάρωση
- 5.σχιστοκυττάρωση,
- 6.πυκνοκυττάρωση σε έντονο βαθμό και συχνά υπάρχουν και ερυθροβλάστες.

Η HbF στη διάγνωση μπορεί να ποικίλει σύμφωνα με το γενετικό έλλειμμα από 5-100%. Οι βο ομοζυγώτες έχουν σχεδόν 100% HbF, ενώ στους ομοζυγώτες β+ η HbA παρουσιάζεται με ποικίλα ποσά. Η HbA2 είναι >4%.<sup>2</sup>

Από τον έλεγχο των γονέων, ο ένας ή και οι δύο γονείς είναι άτυποι φορείς β-Μεσογειακής αναιμίας με υψηλά επίπεδα HbF ή οριακές τιμές HbA2.

**Η παραδοσιακή ηλεκτροφόρηση** είναι η μέθοδος για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των ποικιλιών των αιμοσφαιρινών. Χρησιμοποιούνται ηλεκτροφορητικές μέθοδοι που επιτρέπουν το διαχωρισμό των αιμοσφαιρινών σε διαφορετικά ηλεκτροφορητικά μέσα και τιμών pH (π.χ. οξεική κυτταρίνη pH 8.5-9.0, κιτρικό άγαρ pH 6.5κ.α). Σε πολλά εργαστήρια χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των αιμοσφαιρινών



ηλεκτροφορητικές τεχνικές σε συνδυασμό με HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

Οι ασθενείς με EMA πρέπει να ελέγχονται συστηματικά για υπερφόρτωση σιδήρου. Οι κυριότεροι βιοδείκτες που αφορούν το μεταβολισμό του σιδήρου στην Ενδιάμεση Μεσογειακή αναιμία είναι επηρεασμένοι σε πολλούς ασθενείς. Ενδεικτικά, όπως περιγράφηκε πρόσφατα σε ομάδα ασθενών, που παρακολουθούνται στο Νοσοκομείο Παιδών 'Η Αγία Σοφία', οι μέσες τιμές της φερριτίνης ( $439 \pm 517 \mu\text{g/L}$ ), των επιπέδων του μη-δεσμευμένου με τρανσφερρίνη σιδήρου (NTBI) ( $1,92 \pm 2 \mu\text{mol/L}$ ) και των επιπέδων του διαλυτού υποδοχέα της τρανσφερρίνης (sTfR) ( $11,4 \pm 3,4 \text{ mg/L}$ ) ήταν σημαντικά υψηλότερες των μαρτύρων ( $117 \pm 51 \mu\text{g/L}$ ), ( $1,23 \pm 0,2 \text{ mg/L}$ ) και ( $0,12 \pm 0,02 \mu\text{mol/L}$ ), αντίστοιχα. Σε περίπτωση ενδείξεων υπερφόρτωσης σιδήρου, δηλαδή επί αυξημένων ή οριακών επιπέδων φερριτίνης ή/και αυξημένο κορεσμό τρανσφερρίνης, θα πρέπει να εκτιμάται η εναπόθεση του σιδήρου τουλάχιστον στο ήπαρ με ειδικές τεχνικές μαγνητικής απεικόνισης.

### 2.3.3.3 Θεραπευτική αντιμετώπιση

Η αντιμετώπιση των ασθενών με EMA πρέπει να εξατομικεύεται, μια και οι ασθενείς παρουσιάζουν σημαντική κλινική ετερογένεια. Η αντιμετώπιση έχει δύο παράλληλους στόχους: **την βελτίωση των παθογενετικών μηχανισμών, που θα οδηγήσει και σε πρόληψη μακροχρόνιων προβλημάτων και την αντιμετώπιση των επιπλοκών.**

Ριζική θεραπεία με σκοπό την ίαση μπορεί να γίνει μόνο μέσω **μεταμόσχευσης αρχεγόνων αιμοποιητικών κυττάρων**. Δεδομένου όμως της τοξικότητας της επέμβασης, η θεραπεία εαυτή πρέπει να γίνεται μόνο σε ασθενείς με βαριά κλινική εικόνα και επισφαλή πρόγνωση και μόνο με απόλυτα συμβατό συγγενή δότη. Μεταμοσχεύσεις από εναλλακτικούς δότες αποτελούν άκρα πειραματικές μέθοδες με αδικαιολόγητα υψηλή τοξικότητα.

#### *Αντιμετώπιση της Αναιμίας*

Η αναιμία αποτελεί το πρωταρχική αιτία της νόσου. Η αντιμετώπιση της οδηγεί σε βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών και μπορεί να αποτρέψει τις επιπλοκές της νόσου.

#### *Μεταγγίσεις*

Ο βασικός τρόπος αντιμετώπισης της αναιμίας είναι οι μεταγγίσεις συμπυκνωμένων ερυθρών. Πριν ξεκινήσουν οι μεταγγίσεις είναι απαραίτητα να γίνει εκτενής φαινοτυπικός

χαρακτηρισμός των ερυθροκυττάρων, δεδομένου ότι τα ποσοστά αλλοανοσοποίησης στους ασθενείς αυτούς είναι ιδιαίτερα υψηλότερα σε σχέση με ασθενείς με μείζονα μεσογειακή αναιμία<sup>46</sup>. Οι μεταγγίσεις χορηγούνται επί συγκεκριμένων ενδείξεων και πρέπει να γίνονται με φειδώ. Κατά κανόνα, στην EMA μεταγγίσεις απαιτούνται σε απότομη πτώση αιμοσφαιρίνης, όπως κατά τη διάρκεια λοιμώξεων, για χειρουργικές επεμβάσεις και σε εγκυμοσύνη. ***Τακτικές μεταγγίσεις είναι απαραίτητες για παιδιά με καθυστέρηση ανάπτυξης ή σοβαρές οστικές αλλοιώσεις ή για την αντιμετώπιση επιπλοκών, όπως κλινικά σημαντικές εξωμυελικές εστίες και πνευμονική υπέρταση.***

Το χρονικό διάστημα των τακτικών μεταγγίσεων ποικίλλει ανάλογα με το υποκείμενο αίτιο. Είναι γεγονός ότι η βελτίωση της θεραπείας αποσιδήρωσης έχει κάνει τις ενδείξεις για μεταγγίσεις λιγότερο αυστηρές. Ενδεικτικό αυτού είναι ότι για αρκετούς ασθενείς με οριακό φαινότυπο μεταξύ μείζονας και ενδιάμεσης μεσογειακής αναιμίας, υπάρχει η τάση για έναρξη συστηματικών μεταγγίσεων σε αντίθεση με ότι συνέβαινε παλαιότερα.

Η τάση αυτή υποστηρίζεται και από νεώτερα δεδομένα από εκτενείς μελέτες που δείχνουν ότι ασθενείς με EMA που έχουν λάβει μεταγγίσεις έχουν λιγότερα προβλήματα από αυτούς που δεν έχουν λάβει.

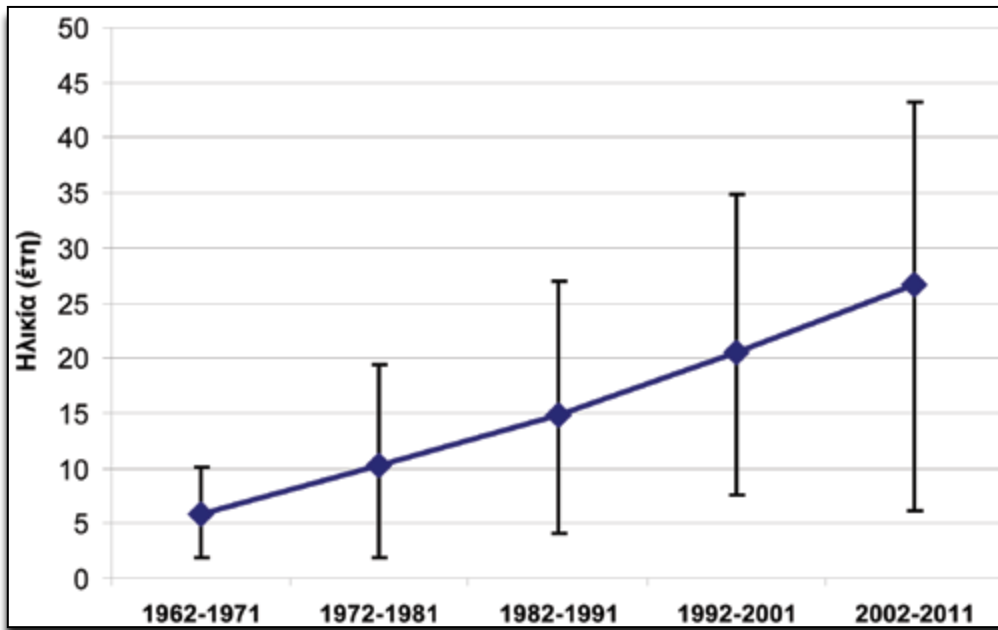
### **Σπληνεκτομή**

Ο σπλήνας υπερπλάσσεται στους ασθενείς με EMA λόγω εξωμυελικής αιμοποίησης και διέγερσης του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος λόγω της χρόνιας αιμόλυσης. ***Ενδείξεις σπληνεκτομής αποτελούν η υπέρμετρη διόγκωση του σπλήνα που κινδυνεύει να ραγεί ή που δίνει συμπτώματα πόνου ή δυσπεπτικά ενοχλήματα, κλινική εικόνα υπερσπληνισμού με λευκοπενία και θρομβοπενία και η προϊούσα αύξηση αναγκών σε μεταγγίσεις.***

Μετά τη σπληνεκτομή, υπάρχει βελτίωση της αναιμίας για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα. Δεδομένου όμως, ότι η σπληνεκτομή έχει συσχετισθεί με αυξημένη πιθανότητα επιπλοκών, όπως θρομβοεμβολικά επεισόδια και πνευμονική υπέρταση, πρέπει να γίνεται μετά από σοβαρό προβληματισμό και εξάντληση άλλων εναλλακτικών τρόπων θεραπείας. Προ της σπληνεκτομής πρέπει να γίνονται οι απαραίτητοι εμβολιασμοί συμπεριλαμβανομένων και των νεωτέρων συζευγμένων εμβολίων έναντι του πνευμονιόκοκκου, μηνιγγιτιδοκόκκου και αιμόφιλου της γρίπης τύπου Β. Αντιβιοτική χημειοπροφύλαξη και έγκαιρη αντιμετώπιση των λοιμώξεων πρέπει να συνιστάται στους σπληνεκτομηθέντες ασθενείς.

## Γραφική Παράσταση 2.

Διάρθρωση τιμής ηλικίας 263 πασχόντων με μείζονα Μεσογειακή Αναιμία κατά τη σπληνεκτομή.



## Αιμοσιδήρωση

Οι ασθενείς με ενδιάμεση μεσογειακή αναιμία εμφανίζουν υπερφόρτωση σιδήρου κυρίως ως συνέπεια της αυξημένης γαστρεντερικής απορρόφησης σιδήρου που επάγεται από την έντονη ερυθροποίηση και από τις περιστασιακές μεταγγίσεις αίματος, που μπορεί να χρειασθούν. Η υπερφόρτωση σιδήρου συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης επιπλοκών που έχουν σχέση με την υπερφόρτωση σιδήρου. Οι

επιπλοκές αυτές αφορούν κυρίως βλάβη του ήπατος και ενδοκρινική δυσλειτουργία. Σε σύγκριση με τους ασθενείς που υποβάλλονται τακτικά σε μεταγγίσεις, οι επιπλοκές εμφανίζονται σε μεγαλύτερη ηλικία (2η-4η δεκαετία) και η καρδιακή σιδήρωση και δυσλειτουργία εμφανίζεται σε μικρότερο ποσοστό.

Είναι εύλογο ότι η αιμοσιδήρωση δεν μπορεί να αντιμετωπισθεί με αιμαφαιρέσεις, όπως σε ασθενείς με συγγενή αιμοχρωμάτωση, λόγω της αναιμίας. Συνεπώς, η θεραπεία με χημικούς παράγοντες δέσμευσης του σιδήρου αποτελεί τη μόνη μέθοδο για να μειωθεί ή να διατηρηθεί σταθερό το φορτίο σιδήρου στον οργανισμό αυτώντων ασθενών. **Και οι 3 παράγοντες αποσιδήρωσης, που είναι σήμερα διαθέσιμοι, δηλαδή δεφεροξαμίνη, δεφεριπρόνη**

*(Ferriprox)* και *δεφερασιρόξη (Exjade)* έχουν χρησιμοποιηθεί, όχι όμως συστηματικά, καθώς οι μελέτες αυτές αφορούν κυρίως αναφορές περιπτώσεων ή μικρές μη τυχαιοποιημένες δοκιμές.

Σε μία μελέτη 6 μηνών, χρήση δεφεροξαμίνης σε 10 ασθενείς οδήγησε σε μείωση των επιπέδων φερριτίνης. Η χρήση της δεφεριπρόνης βελτίωσε τα επίπεδα της φερριτίνης ορού και του ηπατικού σιδήρου, καθώς και κάποιες αιματολογικές παραμέτρους και παραμέτρους μεταβολισμού του σιδήρου, όπως την αιμοσφαιρίνη, την ερυθροποιητίνη και τον ασταθή σίδηρο πλάσματος (LPI), ο οποίος είναι συστατικό του μη συνδεδεμένου με τρανσφερρίνη σιδήρου (NTBI) που αντανακλά την παρουσία δυνητικά τοξικού σιδήρου στο πλάσμα. Αντίστοιχα, η χρήση δεφερασιρόξης βελτίωσε σημαντικά τα επίπεδα φερριτίνης και τη συγκέντρωση του σιδήρου ήπατος μετά από 1 ή 2 χρόνια θεραπείας σε 2 μικρές ομάδες ασθενών. Μια τυχαιοποιημένη, διπλή-τυφλή, ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο, μελέτη φάσης II, στη χρήση δεφερασιρόξης αναμένεται να ολοκληρωθεί σύντομα (*Αριθμός EUDRACT 2007-007000-15*) και θα αποτελέσει την πρώτη συστηματική μελέτη αποσιδήρωσης στους ασθενείς με EMA.

### **Εναλλακτικές προσεγγίσεις στη θεραπεία της θαλασσαιμίας**

Μέχρι σήμερα, δεν υπάρχει ριζική θεραπεία για τις αιμοσφαιρινοπάθειες, εκτός από την μεταμόσχευση μυελού.

Η επιλογή αυτή είναι διαθέσιμη μόνο σε μια μειοψηφία πασχόντων που έχουν κατάλληλο δότη και βρίσκονται σε καλή κλινική κατάσταση.

Μια άλλη ελπιδοφόρα προσέγγιση είναι η *χρήση φαρμάκων για τη διόρθωση της διαταραχής των αλύσων σφαιρίνης στη β-θαλασσαιμία, μέσω επανενεργοποίησης των γονιδίων εμβρυϊκής σφαιρίνης.*

Η εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη είναι η κυρίαρχη μη α-σφαιρίνη που παράγεται στους ανθρώπινους οργανισμούς μέχρι τον έκτο περίπου μήνα, οπότε συνήθως καταστέλλεται η παραγωγή της και αυξάνεται η παραγωγή β-σφαιρίνης.

Αυτή η πορεία είναι ο κανόνας ακόμα και όταν τα γονίδια είναι μεταλλαγμένα, όπως στη β-θαλασσαιμία.

Πάσχοντες με β-θαλασσαιμία οι οποίοι συνεχίζουν να παράγουν υψηλά επίπεδα εμβρυϊκής σφαιρίνης, όπως ασθενείς με κληρονομική παραμονή της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης, έχουν μικρότερη διαταραχή στην ισορροπία της σφαιρίνης και λιγότερο σοβαρή αναιμία.

Η θεραπευτική διέγερση της εμβρυϊκής σφαιρίνης θα μπορούσε συνεπώς να ωφελήσει πολλούς πάσχοντες, ακόμα και στο να τους απαλλάξει σε κάποιο βαθμό από τη μετάγγιση.

Πολλές υποψήφιες θεραπείες προσφέρουν σήμερα το ενδεχόμενο να διορθωθεί ή να προσαρμοστεί η υποκείμενη παθολογία.

### **Κυτταροτοξικοί παράγοντες**

Με βάση την παρατήρηση ότι η σύνθεση της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης ενεργοποιείται κατά την φάση ανάκαμψης μετά από καταστολή του μυελού με τη χρήση κυτταροτοξικών φαρμάκων, θεωρήθηκε ότι, οι κυτταροτοξικοί παράγοντες μεταβάλλοντας τον τύπο της ερυθροποίησης θα μπορούσαν να ευνοήσουν την αντιμετώπιση σοβαρών αιμοσφαιρινοπαθειών.

Τα τελευταία 20-25 χρόνια έχουν ερευνηθεί πολλοί κυτταροτοξικοί παράγοντες που τροποποιούν την ερυθροποίηση, ευνοώντας την έκφραση των εμβρυϊκών γονιδίων γ-σφαιρίνης και αυξάνοντας κατ' αυτό τον τρόπο τον αριθμό των ερυθρών κυττάρων που περιέχουν HbF (F-κύτταρα) (*Pace and Zei, 2006; Fathallahand Atweh, 2006; Gambari and Fibach, 2007*).

Οι απομεθυλιωτικοί παράγοντες 5-αζακυτιδίνη και δεκταβίνη έχουν χορηγηθεί σε κάποιους πάσχοντες β-θαλασσαιμίας με καλή ανταπόκριση, αυξάνοντας τα συνολικά επίπεδα αιμοσφαιρίνης κατά μέσο όρο 2,5 g/dl πάνω από τις τιμές έναρξης και επιμηκύνοντας εμφανώς τις ζωές ασθενών σε τελευταίο στάδιο (*Lowrey, 1993; Dunbar, 1989; Ley, 1982*).

Η μεταλλαξιογόνος δράση και αστάθεια των σκευασμάτων 5-αζακυτιδίνης έχουν περιορίσει την μελέτη της. Υψηλότερες δόσεις δια στόματος της δεκταβίνης έχουν αποτελέσματα στους βαβουίνους (*Lavelle, 2006*) και μελέτες έχουν σχεδιαστεί για επιλεγμένους πάσχοντες.

**Η υδροξουρία** έχει μελετηθεί σε πάσχοντες με HbE/ β-θαλασσαιμία, επιτυγχάνοντας ανταπόκριση μικρότερου ρυθμού αλλά μείωση της αιμόλυσης (*Fuchareon, 1996; Zeng, 1995*).

Η υδροξουρία είχε λιγότερα αποτελέσματα στην ενδιάμεση θαλασσαιμία σε σχέση με τη δρεπανοκυτταρική νόσο, όπου μειώθηκε ο αριθμός επώδυνων κρίσεων και βελτιώθηκαν οι συνολικοί δείκτες υγείας. Τα μικρότερα οφέλη για τη θαλασσαιμία ενδεχομένως να οφείλονται στο γεγονός ότι η κυτταροστατική δράση της υδροξουρίας έχει περιορισμένη αξία στην ασθένεια αυτή.

### **Άλλοι παράγοντες**

Οι ερυθροποιητίνες (EPO) αυξάνουν τα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης σε μερικούς πάσχοντες με ενδιάμεση θαλασσαιμία, σε σημείο που εκμηδένισαν τις απαιτήσεις για μετάγγιση σε ορισμένα παιδιά. Συνεπώς, οι EPO μπορούν να βοηθήσουν ιδιαίτερα ασθενείς με σχετικά

χαμηλά επίπεδα ενδογενούς ερυθροποιητίνης σε σχέση με τον βαθμό της αναιμίας τους (Bourantas, 1997; Nisli, 1996 and 1997; Rachmilevitz, 1998; Singer, 2003). Η EPO προάγει την επιβίωση των ερυθρών κυττάρων και μπορεί να αντιμετωπίσει το γρήγορο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση) που οφείλεται στην καθίζηση του πλεονάσματος των αλυσίδων α-σφαιρίνης στη β-θαλασσαιμία (επιθεώρηση Silva, 1996; Perrine, 2005).

### **Παράγωγα λιπαρών Οξέων**

Τα παράγωγα των λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου επάγουν τον προαγωγό γονιδίων εμβρυϊκής σφαιρίνης, οδηγώντας σε αύξηση του mRNA της εμβρυϊκής σφαιρίνης κατά δύο έως έξι φορές σε ορισμένους ασθενείς, ειδικά σε εκείνους που έχουν τουλάχιστον μία μετάλλαξη β0-θαλασσαιμίας και επίπεδα EPO >140mU/ml (Collins, 1995; Perrine, 2005). Τα αποδεκτό προφίλ τοξικότητάς τους προστίθεται στην ιδιότητά τους ως πιθανών μακροχρόνιων θεραπευτικών παραγόντων.

Πολλές προκαταρκτικές μελέτες με ενδοφλέβιο βουτυρικό οξύ και ενώσεις φαινυλοβουτυρικού νατρίου που χορηγήθηκαν δια στόματος έχουν δείξει αυξήσεις στα εμβρυϊκά και συνολικά επίπεδα αιμοσφαιρίνης σε ασθενείς με θαλασσαιμία ενδιάμεσου τύπου, ενώ μερικοί πάσχοντες με θαλασσαιμία σοβαρού τύπου που εξαρτιόνταν προηγουμένως από μεταγγίσεις μπόρεσαν να μην χρειάζονται μετάγγιση με κατ' οίκον θεραπεία για 5-7 χρόνια. Η χορήγηση της ισοβουτυραμίδης επέφερε εμβρυϊκή σφαιρίνη και μειωμένες απαιτήσεις σε μετάγγιση σε περιπτώσεις ενδιάμεσης και μείζονος θαλασσαιμίας (Cappellini, 2000; Reich, 2000).

Η μέχρι τώρα πιο αποτελεσματική ένωση είναι η **αργινίνη βουτυρικού οξέος**, αλλά απαιτείται ενδοφλέβια έγχυσή της λόγω του γρήγορου μεταβολισμού της. Οι μηχανισμοί με τους οποίους τα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου διεγείρουν την παραγωγή γ-σφαιρίνης έχουν διεκρινησθεί. Ορισμένα νέα παράγωγα μετατοπίζουν ένα σύμπλεγμα καταστολέα και προκαλούν ειδικά ακετυλίωση του προαγωγού γονιδίων εμβρυϊκής σφαιρίνης (Mankidy et al, 2006).

Το φαινυλοβουτυρικό νάτριο και το βουτυρικό οξύ προκαλούν υπερακετυλίωση ιστονών, γεγονός που αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και είναι αντίστροφα παραγωγικά στη θαλασσαιμία, απαιτώντας περιορισμένη έκθεση (θεραπεία ώσεως).

Παράγοντες νέας γενιάς που προάγουν την επιβίωση των ερυθρών κυττάρων και που μπορούν να χορηγηθούν καθημερινά προσφέρουν σημαντικά περισσότερα ενδεχόμενα οφέλη σε σχέση με τα πρωτότυπα πρώτης γενιάς.

### *Συνδυασμένη θεραπεία*

Σε πειραματικές μελέτες, για παράδειγμα, ένας απομεθυλιωτικός παράγοντας μαζί με βουτυρικό οξύ παρουσιάζουν συνεργατική δραστηριότητα πολύ μεγαλύτερη από τις επιμέρους δραστηριότητες τους (Constantoulakis, 1989). Αυτοί οι συνδυασμοί μπορούν να διαθέτουν εξαιρετικές δυνατότητες για πάσχοντες με διάφορα σύνδρομα.

Στην παρούσα φάση, είναι δυνατόν να υπάρξει μία προσέγγιση με εξορθολογισμένους συνδυασμούς φαρμάκων, βασισμένους στη βασική τιμή HbF ενός ασθενούς, τα επίπεδα συνολικής αιμοσφαιρίνης και EPO (Perrine, 2005). Οι κλινικές δοκιμές θα πρέπει να προγραμματίζονται για την εξεύρεση των ιδανικών συνδυασμών φαρμάκων στα διαφορετικά υποσύνολα πασχόντων.

#### **2.3.3.4 Γονιδιακή Θεραπεία: Παρούσα φάση και Μελλοντικές Προοπτικές**

Η ιδέα της χρήσης της γονιδιακής θεραπείας για να θεραπευτούν οι αιμοσφαιρινοπάθειες (θαλασσαιμία και δρεπανοκυτταρική νόσος) είναι κατ' αρχήν εστιασμένη. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια (RBC) ανανεώνονται συνεχώς από τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα (HSC) του μυελού των οστών. Συνεπώς, η σταθερή μεταφορά ενός κανονικού αντιγράφου της β-σφαιρίνης στα HSC του ίδιου του ασθενή θα μπορούσε να καταλήξει στην παραγωγή φυσιολογικών αντί παθολογικών RBC (Σημείωση: δεν χρειάζεται μυελός των οστών από δότη).

*Οι πολλές σημαντικές ανακαλύψεις και τεχνικές εξελίξεις στη γονιδιακή θεραπεία τα τελευταία 20 χρόνια, ιδιαίτερα μετά το 2000, προλέγουν ότι, επιτέλους, η γονιδιακή θεραπεία για τις αιμοσφαιρινοπάθειες έχει σοβαρές πιθανότητες να πραγματοποιηθεί στο όχι και τόσο μακρινό μέλλον.*

Το 1987, μια ομάδα υπό την καθοδήγηση του Καθ. Frank Grosveld ανακάλυψε τον βασικό ρυθμιστή της οικογένειας γονιδίων β-σφαιρίνης, γνωστό και ως 'περιοχή ελέγχου του γονιδιακού τόπου' (LCR). Ανακαλύφθηκε ότι ο συνδυασμός του LCR με το σύμπλοκο των γονιδίων β-σφαιρίνης δίνει τη δυνατότητα στο γονίδιο να είναι επαρκές και ενεργοποιημένο αναπαραγωγικά και να παράγει ένα επαρκώς υψηλό επίπεδο πρωτεΐνης β-σφαιρίνης ώστε να είναι θεραπευτικά ωφέλιμο, εάν αναπαραχθεί στα πλαίσια γονιδιακής θεραπείας (Levings and Bungert, 2002; Stamatoyannopoulos 2005).

Η σταθερή εισαγωγή της δομικής μονάδας LCR και γονιδίων β-σφαιρίνης στα HSC του ασθενή γίνεται μέσω ενός ρετροϊκού φορέα, καταλήγοντας στη μόνιμη συναρμογή ή την ενσωμάτωση του γονιδίου της θεραπείας στο DNA των HSC, όπου και διατηρείται δια βίου. Συνολικά, το πρωτόκολλο της γονιδιακής θεραπείας χρησιμοποιεί μία 'ex vivo' διαδικασία.



Τα HSC απομονώνονται από τον μυελό των οστών του ασθενή και διαμολύνονται ή εμποτίζονται με ρετροϊκό φορέα της LCR-γονίδιο β-σφαιρίνης. Κατόπιν, τα διορθωμένα κύτταρα εγχύονται στον ασθενή, ο οποίος στο μεταξύ έχει υποβληθεί σε χημειοθεραπεία (όπως και σε μεταμοσχεύσεις μυελού των οστών που προέρχεται από δότη) για να καταστραφεί μερικώς ή ολοκληρωτικώς ο παθολογικός μυελός των οστών του (Persons and Tisdale, 2004).

Οι αρχικές μελέτες με ρετροϊκό φορέα της LCR-γονίδιο β-σφαιρίνης βασίστηκαν στον ιό MoLV και χρησιμοποιώντας μία διαδικασία *ex vivo* σε ζωικά μοντέλα, απέδειξαν την ορθότητα του πειραματικού μοντέλου. Ωστόσο, αποδείχτηκε πολύ δύσκολο να φιλοξενηθούν μονάδες LCR-γονίδιο β-σφαιρίνης μέσα στους ρετροϊκούς φορείς MoLV και να παρασκευαστούν. Επιπλέον οι μονάδες γονιδιακής θεραπείας LCR-γονίδιο β-σφαιρίνης που θα μπορούσαν να ενσωματωθούν σε αυτό το σύστημα φορέα ήταν αναποτελεσματικές στην παραγωγή ενός συνεχούς και επαρκώς υψηλού επιπέδου πρωτεΐνης β-σφαιρίνης με θεραπευτική αξία (Antonioni and Grosveld, 1999).

Ωστόσο, το 2000 πραγματοποιήθηκε ένα σημαντικό επίτευγμα, όταν το εργαστήριο του Καθ. Michel Sadelain ανέφερε εργασία που εμπεριείχε τη δοκιμή μίας μονάδας γονιδίου θεραπείας LCR-γονίδιο β-σφαιρίνης μέσα σε μία κατηγορία ρετροϊών που είναι γνωστή ως φορέας λεντιϊού HIV (LV) (Εικόνα 1; May et al, 2000).

Ο Καθ. Sadelain απέδειξε για πρώτη φορά ότι ο φορέας LV μπορεί να φιλοξενήσει άμεσα μία μεγαλύτερη και πιο αποτελεσματική έκδοση του γονιδίου θεραπείας β-σφαιρίνης που συνδέεται με τα τρία πιο ισχυρά στοιχεία του LCR (HS2, HS3, HS4) και ότι η εφαρμογή αυτού του φορέα σε μία διαδικασία μεταμόσχευσης μυελού των οστών *ex vivo* θα μπορούσε να θεραπεύσει εντελώς ή να διασώσει από την κατάσταση β-θαλασσαιμίας τα μοντέλα ποντικών με αυτή την ασθένεια (May et al, 2000; Rivella et al, 2003).

Από τότε, πολλές ομάδες στις ΗΠΑ και την Ευρώπη παρασκεύασαν τις δικές τους εκδοχές για τον φορέα LV της LCR-γονίδιο β-σφαιρίνης (Persons and Tisdale, 2004; von Kalle C et al, 2004; Sadelain et al, 2006).

Η πιο μικρή εκδοχή του φορέα LV της LCR-γονίδιο β-σφαιρίνης περιελάμβανε στο σχέδιό της μόνον τα στοιχεία HS2 και HS3 του LCR, γεγονός που βελτίωσε σημαντικά την ευκολία παρασκευής του φορέα (Miccio et al, 2006).

Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις, οι ερευνητές έχουν αποδείξει καλή αποτελεσματικότητα στα μοντέλα ποντικών με β-θαλασσαιμία ή μεδρεπανοκυτταρική νόσο. Επιπλέον, κάποιες ομάδες απέδειξαν ότι, σε συνθήκες εργαστηρίου, η μεταγωγή του ανθρώπινου HSC που προέρχεται από τον μυελό των οστών πασχόντων με θαλασσαιμία σοβαρού τύπου με τον φορέα LV του γονιδίου LCR-β-σφαιρίνη μπορεί να διορθώσει την διαταραχή στην ισορροπία

της αλυσίδας σφαιρίνης στα παραγόμενα RBC (Persons and Tisdale, 2004; Sadelain et al, 2006; von Kalle C et al, 2004; Roselli et al, 2006).

Μεταξύ των υπόλοιπων προβλημάτων τα οποία πρέπει να αντιμετωπιστούν για να βελτιωθεί και η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια του φορέα LV της LCR-γονίδιο β-σφαιρίνης είναι τα εξής: (i) η αναπαραγωγικότητα της λειτουργίας του φορέα. Προς το παρόν υπάρχει μία σημαντική μεταβλητότητα στην έκφραση της LCR-γονίδιο β-σφαιρίνης (συμπεριλαμβανομένης και της ολοκληρωτικής απενεργοποίησής του), η οποία εξαρτάται από τον χώρο στον οποίο έχει ενσωματωθεί (May et al, 2000; Miccio et al, 2006; Han et al, 2007), (ii) η μεταλλαξιόγόνος δράση μέσω ενσωμάτωσης: η ενσωμάτωση του φορέα LV της LCR-γονίδιο β-σφαιρίνης στο DNA των HSC έχει τη δυνατότητα να επηρεάσει τη λειτουργία του γονιδίου του κυττάρου ξενιστή προκαλώντας, σε ακραία περίπτωση, μία κατάσταση τύπου λευχαιμίας (von Kalle C et al, 2004), όπως έχει παρατηρηθεί στις κλινικές δοκιμές όπου χρησιμοποιήθηκαν ρετροϊκοί φορείς για τη γονιδιακή θεραπεία φυλοσύνδετης σοβαρής συνδυασμένης ανοσολογικής ανεπάρκειας (SCID-X1. Βλ. Nienhuis et al, 2006), η οποία στοχοποιεί και τα HSC του ασθενούς. Συνεπώς, μερικοί ερευνητές συμπεριέλαβαν το cHS4 του στοιχείου LCR-β-σφαιρίνης όρνιθας στη παραγωγή του φορέα LV για να προσπαθήσουν να ~~κώσουν~~ ~~β-σφαιρίνη, δε γονιά~~ ~~στο LCR~~ οδήγησε σε μερικές βελτιώσεις στην αναπαραγωγικότητα της λειτουργίας (Persons and Tisdale, 2004 von Kalle C et al, 2004; Sadelain et al, 2006).

Επιπλέον, υποστηρίζεται ότι το στοιχείο cHS4 μπορεί να έχει δράση στην προστασία των γονιδίων του ξενιστή εντός των HSC από παρεμβολές μέσω της μονάδας του γονιδίου θεραπείας και έτσι να προάγεται η ασφάλεια, παρόλο που αυτό δεν έχει ακόμα γίνει αποδεκτό από όλους τους ερευνητές.

**Αυτές οι μελέτες οδήγησαν το 2006 στην έναρξη της πρώτης κλινικής δοκιμής γονιδιακής θεραπείας Φάσης I/II για τις αιμοσφαιρινοπάθειες.** Η δοκιμαστική μελέτη γίνεται υπό την καθοδήγηση του Καθ. Philippe Leboulch στο Παρίσι και στοχεύει στη θεραπεία πέντε πασχόντων από β-θαλασσαιμία και πέντε πάσχόντων με δρεπανοκυτταρική νόσο ηλικίας 5-35 ετών. Όπως ήταν αναμενόμενο, το πρωτόκολλο περιλαμβάνει μία ex vivo προσέγγιση, με τους πάσχοντες να λαμβάνουν ένα πλήρες πρόγραμμα προετοιμασίας χημειοθεραπείας με Busulfex για να καταστραφεί ο παθολογικός μυελός των οστών τους (Bank et al, 2005).

Μέχρι το τέλος του 2006, είχαν θεραπευτεί δύο πάσχοντες με β-θαλασσαιμία. Είναι υπερβολικά νωρίς στην πορεία της μελέτης για να γνωρίζουμε εάν έχει προκύψει κάποιο όφελος.

Η μελέτη αμφισβητήθηκε κυρίως γιατί χρησιμοποιείται ένα πλήρες πρόγραμμα προετοιμασίας χημειοθεραπείας υψηλού κινδύνου ως μέρος ενός πρωτοκόλλου η επιτυχία

του οποίου απέχει πολύ από το να χαρακτηριστεί σίγουρη, πέρα από τη σύγκριση με τα τρέχοντα επιτεύγματα της μεταμόσχευσης μυελού των οστών από δότη-αδερφό/ή.

*Αδημονούμε να δούμε το αποτέλεσμα αυτών των μελετών καθώς και να ξεκινήσουν μελλοντικές μελέτες με σχέδια φορέα LV με προφίλ υψηλότερης αποτελεσματικότητας και ασφάλεια*

## 2.4 Δρεπανοκυτταρική Αναιμία

### 2.4.1 Εισαγωγή-Ιστορική Αναδρομή

Ο όρος δρεπανοκυτταρική νόσος (SCD) περιλαμβάνει μια ποικιλία από παθολογικές καταστάσεις που προκύπτουν από την κληρονομικότητα του HbS γονίδιο είτε ως ομόζυγο είτε ως σύνθετο ετεροζυγώτο που αλληλεπιδρά με άλλα μη φυσιολογικά γονίδια αιμοσφαιρίνης.

Η Δρεπανοκυτταρική Νόσος προκύπτει από την αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου στην έκτη θέση της β αλυσίδας της αιμοσφαιρίνης (GTG στη θέση του GAG), με αποτέλεσμα την έκφραση βαλίνης στη θέση του γλουταμινικού οξέος, και την παραγωγή μιας τροποποιημένης β αλυσίδας, της βs.

Σε συνθήκες υποξίας η αιμοσφαιρίνη S (HbS) πολυμερίζεται και ο πολυμερισμός αυτός αποτελεί ένα από τους βασικούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην παθογένεση της νόσου.

#### Ιστορική αναδρομή

Η πρώτη κλινική περιγραφή της νόσου οφείλεται στον Herrick ο οποίος το 1910 δημοσίευσε άρθρο με τον τίτλο *«Peculiar elongated and sickle shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia»*, όπου ανέφερε μερικές από τις κλινικές και εργαστηριακές διαταραχές που παρουσίαζε ένας εικοσαετής Νέγρος φοιτητής από την Grenada (Herrick, 1910).

Στα επόμενα 12 χρόνια ανακοινώθηκαν άλλες 3 περιπτώσεις. Ο Mason το 1922 κατέληξε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για μία νέα νοσολογική οντότητα, την οποία ονόμασε δρεπανοκυτταρική αναιμία (Mason, 1922). Στη δεκαετία του 1940 αποκαλύφθηκε ο γενετικός χαρακτήρας της νόσου (Neel 1947), ενώ το 1949 ο Pauling εισήγαγε τον όρο «μοριακή νόσος» και ανέφερε ότι το αίμα των πασχόντων χαρακτηρίζεται από την παρουσία ενός ανωμάλου τύπου αιμοσφαιρίνης που διαφέρει από την αιμοσφαιρίνη των υγιών ατόμων ως προς την ηλεκτροφορητική κινητικότητα σε αλκαλικό pH (Pauling et al, 1949).

Το 1956 ο Ingram απέδειξε ότι η μοριακή βλάβη οφείλεται στην αντικατάσταση του γλουταμινικού οξέος στο κωδικόνιο 6 της αλυσού β από βαλίνη (Ingram, 1956). Η αναγνώριση του γενετικού κώδικα έδειξε ότι η αντικατάσταση αυτή είναι αποτέλεσμα της μετάλλαξης του κωδικονίου GAG σε GTG στην αντίστοιχη θέση της πρώτης εκφραζόμενης

αλληλουχίας του β-γονιδίου, με αποτέλεσμα τη σύνθεση βs S, HbS), που πολυμερίζονται εύκολα όταν αποξυγονωθούν  $\alpha_2\beta_2^S$

#### 2.4.2 Παθολογία

Είναι εντυπωσιακό, ότι στην Δρεπανοκυτταρική νόσο μία και μόνο αλλαγή βάσης στο DNA που αλλάζει ένα και μόνο αμινοξύ σε μία και μόνο πρωτεΐνη σε ένα και μόνο τύπο κυττάρου προκαλεί τέτοια ποικιλία κλινικών εκδηλώσεων. Τελικά επιπρόσθετοι περιβαλλοντικοί και γενετικοί παράγοντες επηρεάζουν την πορεία αυτής της γενετικά απλής μα τόσο πολύπλοκης κλινικά διαταραχής.

Τα παθοφυσιολογικά επακόλουθα της νόσου οφείλονται στην κακή διαλυτότητα της HbS, η οποία όταν βρεθεί σε περιβάλλον φτωχό σε οξυγόνο μετατρέπεται στην αναχθείσα μορφή, η οποία πολυμερίζεται και καθιζάνει στο ερυθρό αιμοσφαίριο σαν αναχθείσα δεσοξυ-μορφή, σχηματίζοντας μακριά, παράλληλα ινίδια, ενώ τα ερυθρά αιμοσφαίρια μετατρέπεται σε μια επιμήκη ημισελινοειδή μορφή που μοιάζει με δρεπάνι (Φερτάκης και Τραυλός, 1998). Η βλάβη αυτή στην αρχή είναι ανατάξιμη, οι επαναλαμβανόμενες όμως δρεπανώσεις των ερυθρών αιμοσφαιρίων οδηγούν τελικά σε διαταραχές της λειτουργίας της μεμβράνης τους με απώλεια ύδατος και καλίου, με αποτέλεσμα η βλάβη να μην είναι ανατάξιμη. Όσο περισσότερη HbS έχει το ερυθροκύτταρο, τόσο πιο εύκολα γίνεται δρεπανοκύτταρο. Η παρουσία της HbF όχι μόνο «αραιώνει» την HbS, αλλά και δρα ανασταλτικά στην καθίζηση της (Schechter, 1987, Chiang and Frenette, 2005). Η δρεπάνωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων έχει δύο βασικά επακόλουθα

- Προκαλείται μείωση της ευκαμψότητας των ερυθροκυττάρων, που συνεπάγεται αυξημένη καταστροφή τους από το σπλήνα και βράχυνση του χρόνου επιβίωσής τους (χρόνια αιμόλυση).
- Εξαιτίας της συνάθροισης πολλών δρεπανοκυττάρων στα μικροτριχοειδή της κυκλοφορίας αυξάνει τοπικά τη γλοιότητα του αίματος και προκαλείται επιβράδυνση της κυκλοφορίας και υποξία.

Η υποξία έχει ως συνέπεια σχηματισμό νέων δρεπανοκυττάρων (φαύλος κύκλος) που οδηγεί τελικά σε απόφραξη των τριχοειδών ή και μεγαλύτερων αγγείων και δημιουργία **εμφράκτων**. Τα έμφρακτα αυτά είναι συχνότερα εκεί που η αγγείωση είναι φτωχή (κεφαλή του μηριαίου οστού). Ο σχηματισμός δρεπανοκυττάρων είναι ευκολότερος και σε περιπτώσεις στις οποίες το ερυθροκύτταρο χάνει νερό, (στο υπερτονικό περιβάλλον της μυελώδους μοίρας του νεφρού), (Φερτάκης και Τραυλός, 1998).

### 2.4.3 Αιμοσφαιρινοπάθεια S-Δρεπανοκυτταρικά σύνδρομα

Ο όρος δρεπανοκυτταρικά σύνδρομα (ΔΚΣ) περιλαμβάνει τις παθολογικές καταστάσεις που οφείλονται στην παρουσία HbS.

**Οι περισσότεροι γνωστοί γονότυποι είναι οι ακόλουθοι:**

1. Η ομόζυγη δρεπανοκυτταρική αναιμία ( στην συνέχεια HbS/HbS )
2. Ετερόζυγη δρεπανοκυτταρική αναιμία (HbA / HbS)
3. Η σύνθετη ετερόζυγη κατάσταση αιμοσφαιρινοπάθειας S και αιμοσφαιρινοπάθειας C (HbS /HbC ) .
4. Σπανιότερα, οι συνδυασμοί HbS /HbD-Punjab και HbS/HbO-Arab. Επίσης η διπλή μετάλλαξη ( β6Glu-Val και β73Asp-Asn ) που δημιουργεί την HbC-Harlem με βραδεία κινητικότητα στην ηλεκτροφόρηση όπως η HbC (Moo-Pen et al, 1975).
5. Η σύνθετη ετερόζυγη κατάσταση HbS και διαφόρων τύπων β-Μεσογειακής αναιμίας με κύριο παράδειγμα τον συνδυασμό HbS και β-MA (μικροδρεπανοκυτταρική αναιμία, β-MA/HbS). Ο συνδυασμός αυτός χαρακτηρίζεται ως βHbA, βHbA και βHbA είναι σχετικά μεγαλύτερο. Στο ίδιο πλαίσιο περιλαμβάνονται οι σπανιότεροι συνδυασμοί :HbS /δβ – MA και HbLepore / Πύλος και HbS / HPFH (κληρονομική παραμονή εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης στον ενήλικο ). <sup>0</sup> όταν η βλάβη της β-MA αναστέλλει ολοσχερώς την σύνθεση <sup>+</sup> όταν η β-MA επιτρέπει την σύνθεση ελάχιστου ποσού <sup>++</sup> όταν το ποσό της
6. Τέλος, η HbS συνδυάζεται με διάφορες μορφές α – MA και άλλες παραλλαγές των α – αλύσων που είναι συχνές στους Νέγρους ( Hb Stanleyville II, Hb G Philadelphia και Hb Memphis ).

#### Διπλή ετεροζυγωτία ή Μικροδρεπανοκυτταρική Αναιμία

Ιδιαίτερη αναφορά στην Διπλή ετεροζυγωτία ή Μικροδρεπανοκυτταρική Αναιμία γίνεται, εξαιτίας της συχνότητας της στις χώρες της Μεσογείου και συνεπώς και στον Ελλαδικό χώρο, όπου το γονίδιο της β Θαλασσαιμίας είναι συχνό (Loukopoulos, 1996 Weatherall, 2001, Αγγελάκη-Γλαβίνα, 2009). Η καταγωγή και η μετανάστευση του παθολογικού γονιδίου βs παρουσιάζει ιδιαίτερο προγνωστικό και διαγνωστικό ενδιαφέρον, γιατί οι γεωγραφικές περιοχές με μεγάλη συχνότητα του βs HbS στις αντίστοιχες πληθυσμιακές ομάδες και περιοχές, οφείλεται μάλλον όπως προαναφέρθηκε σε ένα είδος φυσικής επιλογής λόγω του προστατευτικού ρόλου της ετεροζυγωτίας HbS απέναντι στην ενδοκυττάρια είσοδο του του πλασμοδίου faciparium. **Η διασπορά του γονιδίου βMA/HbS δεδομένου ότι η β-Μεσογειακή αναιμία που ενδημεί επίσης στην Ελλάδα παρουσιάζει παρόμοια γεωγραφική κατανομή (Σχίζας και συν, 1977).**

Η συχνότητα παρουσίας της μεταλλαγής βs στον ελληνικό πληθυσμό έχει υπολογιστεί στο 11,8% του συνόλου των συχνότερων μοριακών βλαβών σε φορείς κληρονομικών αιμοσφαινοπαθειών, όπου την πρώτη θέση καταλαμβάνουν (85,3%) οι θαλασσαιμικές μεταλλαγές (Παπανικολάου, 2008).

Η αιμοσφαιρινοπάθεια αυτή είναι διπλή ετερόζυγη κατάσταση γονιδίων δρεπανοκυτταρικής και μεσογειακής αναιμίας όπου οι πάσχοντες κληρονομούν το γονίδιο της πρώτης πάθησης από τον ένα γονέα και της δεύτερης από τον άλλο (Φερτάκης και Τραυλός, 1998).

Η κλινική εικόνα της νόσου είναι παρόμοια με την ομόζυγο δρεπανοκυτταρική αναιμία, αλλά συνήθως έχει λιγότερες επώδυνες κρίσεις και συχνότερη εμφάνιση υπερπλαστικής αμφιβληστροειδοπάθειας και ισχαιμικής νέκρωσης. Η διαφορετική βαρύτητα της Μικροδρεπανοκυτταρικής αναιμίας καθορίζεται από τον τύπο του γονιδίου της β Θαλασσαιμίας, συχνά είναι βαριά, με όλο το φάσμα της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας.

Η βαρύτητα των εκδηλώσεων της νόσου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το ποσό της HbA που μπορεί να παραχθεί. Εάν παράγεται μειωμένη ποσότητα HbA, όπως στη βHbA, δηλαδή στην περίπτωση συνδυασμού βo θαλασσαιμία, ο ασθενής θα παρουσιάζει βαριά αναιμία και σπληνομεγαλία. Στην περίπτωση δε που η η γονιδιακή βλάβη του β-σφαιρινικού γονιδίου προάγει την παραγωγή ποσότητας HbF, τότε τα επώδυνα επεισόδια θα είναι ηπιότερα (Πάγκαλης, 2008)

#### 2.4.4 Κλινική Εικόνα

Το τελικό αποτέλεσμα όλων των παραπάνω κυτταρικών ανωμαλιών είναι η εξαιρετική μείωση του χρόνου ζωής των ερυθρών και τα διαλείποντα επεισόδια αγγειακής απόφραξης, τα οποία προκαλούν οξεία και χρόνια ιστική δυσλειτουργία.

Η νοσηρότητα και η θνησιμότητα των ΔΚΣ είναι αποτέλεσμα της αγγειοαπόφραξης από δρεπανοκύτταρα της μικροκυκλοφορίας διαφόρων οργάνων, της απόφραξης αρτηριών, της αιμολυτικής αναιμίας και των λοιμώξεων.

Οι σημαντικότερες κλινικές εκδηλώσεις της Δρεπανοκυτταρικής νόσου μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες:

##### A) Συνέπειες της Αιμόλυσης:

Τα συμπτώματα και ευρήματα που οφείλονται στην αιμόλυση είναι παρόμοια με εκείνα των άλλων χρόνιων αιμολυτικών αναιμιών: χρόνια αναιμία, ίκτερος, χολολιθίαση. Εδώ τονίζεται η πιθανότητα ταχείας επιδείνωσης της ήδη υπάρχουσας αναιμίας στις απλαστικές κρίσεις (λοίμωξη από parvovirus).



## B) Συνέπειες της Αγγειακής απόφραξης:

Τα αγγειοαποφρακτικά φαινόμενα εκδηλώνονται ως επώδυνες κρίσεις και ως χρόνια βλάβη οργάνων και σε αυτά αποδίδεται η αυξημένη βαρύτητα και κυρίως η θνητότητα της νόσου. Στους ενήλικες δρεπανοκυτταρικούς η συχνότερη αιτία θανάτου σχετίζεται με τις επιπλοκές της αγγειακής απόφραξης όπως το Αγγειακό Εγκεφαλικό Επεισόδιο και το Οξύ Θωρακικό Σύνδρομο, ενώ ακολουθεί η Νεφρική Ανεπάρκεια.

Οι επώδυνες κρίσεις είναι το “δηλητήριο” στη ζωή των ασθενών και οφείλονται σε απόφραξη των τριχοειδών από τα δρεπανοκύτταρα. Παρουσιάζονται απότομα σε οποιαδήποτε περιοχή του σώματος. Συνήθεις εντοπίσεις είναι στην κοιλιά, τον θώρακα και τα οστά. Προσβάλλονται κυρίως τα τμήματα των μακρών οστών που είναι κοντά στις αρθρώσεις (με οίδημα, ερυθρότητα, πόνο και αύξηση της θερμοκρασίας) καθώς και το στέρνο, οι πλευρές, οισπόνδυλοι και τα οστά της λεκάνης. Ως κοιλιακοί πόνοι συχνά δημιουργούν εικόνα οξείας χειρουργικής κοιλίας.

*Προδιαθεσικά αίτια είναι η λοίμωξη, η αφυδάτωση, οι αλλαγές της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος (ψύξη-καύσωνας), η άσχημη ψυχολογική κατάσταση, η κόπωση, το οινόπνευμα κ.λπ.* Σε αρκετές περιπτώσεις ο εκλυτικός παράγων είναι αδύνατο να προσδιορισθεί. Οι επώδυνες κρίσεις διαρκούν από μερικές ώρες μέχρι αρκετές μέρες και συχνά συνοδεύονται από πυρετό ο οποίος αποδίδεται σε ιστική νέκρωση.

Η διάρκεια, η βαρύτητα και η συχνότητα των κρίσεων διαφέρουν όχι μόνο από ασθενή σε ασθενή, αλλά και στον ίδιο τον ασθενή στην πορεία της νόσου.

Οι χρόνιες εκδηλώσεις μπορεί να προέρχονται από οποιοδήποτε όργανο, κυρίως από το σπλήνα, το ήπαρ, την καρδιά, τους πνεύμονες, τους νεφρούς, τα οστά και τους οφθαλμούς.

**Σπλήνας:** Ο σπλήνας είναι όργανο που παραβλάπτεται σημαντικά λόγω της αργής μικροκυκλοφορίας η οποία δημιουργεί ιδανικό περιβάλλον για τον πολυμερισμό της αιμοσφαιρίνης S. Σε πρώιμα στάδια ο σπλήνας έχει αυξημένο μέγεθος και μπορεί να προκαλέσει **κρίση εγκλωβισμού (sequestration)**, κατακρατώντας σημαντική αναλογία μάζας ερυθροκυττάρων με αποτέλεσμα την κατακρήμνιση των επιπέδων της αιμοσφαιρίνης και κίνδυνο θανάτου από περιφερειακή κυκλοφορική ανεπάρκεια.

Οι κρίσεις αυτές εμφανίζονται συχνότερα στην παιδική ηλικία, ενώ με την πάροδο των ετών μικρές τοπικές αιμορραγίες και έμφρακτα, οδηγούν σε ίνωση του οργάνου, μείωση του μεγέθους και τελικά αυτοσπληνεκτομή, συνέπεια της οποίας είναι η ευαισθησία στις μικροβιακές λοιμώξεις και ιδιαίτερα σε εκείνες που οφείλονται στον πνευμονιόκοκκο.

Σπληνικά έμφρακτα συμβαίνουν τόσο στην βHbS όσο και στην βHbS<sup>0</sup>-MA / <sup>+</sup>-MA/(Emond et al 1985).



**Ήπαρ:** Η ηπατομεγαλία διαπιστώνεται στο 40-80% των ασθενών και το 80-100% των νεκροτομικών περιπτώσεων. Η ανατομική βάση της ηπατομεγαλίας σχετίζεται με την διαστολή των κολποειδών από τα δρεπανοκυττάρια και πιθανώς με την διόγκωση των κυττάρων Kupffer λόγω φαγοκυττάρωσης.

Άλλο ιστολογικό εύρημα είναι η αυξημένη αιμοσιδήρωση και η εξωμυελική αιμοποίηση. Ενδοηπατικά αποφρακτικά επεισόδια προκαλούν ίκτερο. Στις περιπτώσεις αυτές τα επίπεδα της χολερυθρίνης είναι αυξημένα σε σχέση με εκείνα που διαπιστώνονται στους ίδιους ασθενείς εκτός κρίσης (Scao and Orringer, 1995, Ahn et al, 2005)

**Καρδιά:** Οι επιπλοκές από το καρδιαγγειακό σύστημα είναι ήδη γνωστές από τις αρχές του 20<sup>ου</sup> Tsironi and Aessopos, 2005). Οι δρεπανοκυτταρικοί ασθενείς παρουσιάζουν συχνά καρδιοαναπνευστικά ενοχλήματα. Η δύσπνοια προσπαθείας, η κόπωση στην αίσθημα παλμών που περιγράφουν αντανακλούν μειωμένα αποθέματα στο σύστημα μεταφοράς του οξυγόνου. Θωρακικό άλγος ενδεικτικό μυοκαρδιακής ισχαιμίας έχει περιγραφεί κατά τη διάρκεια αγγειοαποφρακτικών κρίσεων (Allison, 1954). Stevens M et al, 1985). Η καρδιομεγαλία είναι συχνό εύρημα σε παιδιά με ομόζυγο δρεπανοκυτταρική αναιμία ήδη από την ηλικία του ενός έτους. Η ανατομική βάση της καρδιομεγαλίας θεωρείται ότι είναι ένας συνδυασμός της καρδιακής διάτασης και υπερτροφίας που είναι αναγκαία για τη διατήρηση της αυξημένης καρδιακής παροχής (Stevens M et al, 1985).

Επιπλέον πλήθος παθολογοανατομικών μελετών ανέδειξε αύξηση βάρους της καρδιάς και διάταση. Η αύξηση της διαμέτρου των στεφανιαίων αγγείων, είναι πιθανή απάντηση στη χρόνια αναιμία και τον αυξημένο όγκο παλμού, ενώ συχνό εύρημα είναι η συσσώρευση δρεπανοκυττάρων στα τριχοειδή ( Tsironi, Aessopos, 2005).

Επίσης έχει διαπιστωθεί η παρουσία μυοκαρδιακής ισχαιμίας, τόσο κλινικά, ως οξεία στεφανιαία σύνδρομα όσο και απεικονιστικά, ως διαταραχές αιματώσεως στο σπινθηρογράφημα του μυοκαρδίου και μάλιστα επί απουσίας σημαντικών στενώσεων στις επικαρδιακές στεφανιαίες αρτηρίες. Έτσι εξαιτίας της δρεπανώσεως μπορεί να πυροδοτήσει επώδυνη κρίση στους μικροδρεπανοκυτταρικούς ασθενείς με φυσιολογικά στεφανιαία αγγεία (Aessopos et al, 2001).

**Πνεύμονες:** Οι πνευμονικές επιπλοκές της νόσου θεωρούνται μία από τις σημαντικότερες αιτίες νοσηρότητας και θνησιμότητας (Rubler and Fleischer, 1967 Collins and Orringer, 1982, Powars et al, 1988). Είναι βέβαια δύσκολο να γίνει πάντα σαφής διάκριση οξείας λοίμωξης, πνευμονικής εμβολής και / ή in situ πνευμονικής θρόμβωσης. Υπάρχουν αρκετές αναφορές στην αυξημένη πνευμονική αγγειακή αντίσταση που κάποιοι ασθενείς εκδηλώνουν μετά από επαναλαμβανόμενα επεισόδια πνευμονικής προσβολή.

Οι δυο πρώτες περιπτώσεις πνευμονικής καρδιάς σε δρεπανοκυτταρικούς έχουν αναφερθεί ήδη το 1936 (Yater and Hansmann, 1936). Οξεία πνευμονική καρδιά λόγω μαζικής

δρεπάνωσης στα πνευμονικά αγγεία αναφέρεται από τους Rubler και Fleischer, το 1967. Νεκροτομικές εκθέσεις σε ασθενείς που είχαν επαναλαμβανόμενα επεισόδια πνευμονικής συμμετοχής ανέδειξαν δεξιά κοιλιακή υπερτροφία και πολλαπλές αποφράξεις των μικρών πνευμονικών αρτηριών.

**Το οξύ θωρακικό σύνδρομο (acute chest syndrome)** χαρακτηρίζεται από έτερο- ή αμφίπλευρη πυκνωτική εικόνα η οποία δύσκολα διαφοροδιαγιγνώσκεται από λοίμωξη και έχει μεγάλη θνητότητα. Εκδηλώνεται με δυνατό πόνο, δύσπνοια, ταχύπνοια και βήχα (Vichinsky et al 2000).

Η αιτιολογία του οξέος θωρακικού συνδρόμου δεν είναι πάντα προφανής, ενώ συχνά είναι πολυπαραγοντική. Ενοχοποιούνται μικροβιακές και ιογενείς λοιμώξεις, η δρεπάνωση και η επακόλουθος αγγειακή απόφραξη στο πνευμονικό δίκτυο, η πνευμονική αλλά και η λιπώδης εμβολή. Τα επαναλαμβανόμενα επεισόδια οξέος θωρακικού συνδρόμου προδιαθέτουν στην εγκατάσταση χρόνιας πνευμονοπάθειας, πνευμονικής υπέρτασης και πνευμονικής καρδιάς (Machado, Giadwin, 2005).

**Νεφροί:** Στην δρεπανοκυτταρική νόσο σημειώνονται έμφρακτα στην μυελώδη μοίρα των νεφρών, με αδυναμία συμπύκνωσης των ούρων, υποσθενουρία και νεφρική ανεπάρκεια. Άλλη εκδήλωση είναι η αιματουρία από νέκρωση των θηλών (Stadius van Eps et al, 1970).

**Οστά:** Πολύ συχνή είναι η άσηπτη νέκρωση της κεφαλής του μηριαίου, ετερόπλευρη ή αμφοτερόπλευρη, με αξιόλογη αναπηρία και δύσκολη ή σχεδόν αδύνατη αποκατάσταση (Milner et al, 1997). Οι σπόνδυλοι λαμβάνουν χαρακτηριστικό αμφίκωλο σχήμα “δίκηνη σπονδύλων ιχθύων”.

**Οφθαλμοί:** Οι πρώτες περιγραφές για τις αιμορραγίες του αμφιβληστροειδούς αναφέρονται από τον Cook (1930). Άλλες βλάβες που έχουν περιγραφεί είναι μικροανευρύσματα του αμφιβληστροειδούς, σημειακές αγγειακές ισχαιμίες, αποκόλληση αμφιβληστροειδούς, παροδική ή και μόνιμη τύφλωση, γλαύκωμα, αγγειοειδείς ταινίες .

Άλλες επιπλοκές της νόσου είναι ο **πριαπισμός**, που καταλήγει συχνά σε ανικανότητα, και τα **άτονα έλκη των κνημών** (Mantadakis et al, 1999).

**Οι λοιμώξεις** είναι συχνές στους δρεπανοκυτταρικούς ασθενείς. Για την μείωση της αντίστασης προς τις λοιμώξεις ευθύνονται διάφοροι μηχανισμοί, όπως η ατροφία του σπλήνα και η υπολειτουργία του ΔΕΣ και των φαγοκυττάρων αφού τα δρεπανοκύτταρα έχουν αυξημένη τάση προσκόλλησης σε αυτά και παρεμποδίζουν την λειτουργία τους (Platt, 1994, Πάγκαλης, 2008).

### **Τροποποιητικοί παράγοντες της κλινικής εικόνας**

Η Δρεπανοκυτταρική νόσος αντανακλά μια περίπλοκη και σύνθετη παθοφυσιολογία. Η αρχική επικέντρωση στην πρωτοπαθή γενετική βλάβη δίνει μια περιορισμένη εξήγηση για το

ευρύ φάσμα της κλινικής βαρύτητας της νόσου, ακόμα και μεταξύ ασθενών με παρόμοια αιματολογικά και βιοχημικά ευρήματα.

Αν και ο φαύλος κύκλος της ερυθρόστασης των δρεπανοκυττάρων παραμένει αποδεκτή ερμηνεία για την παθοφυσιολογία και την κλινική εικόνα της νόσου, πλέον είναι γνωστό ότι οι μηχανισμοί που συμμετέχουν είναι ποικίλοι και αλληλοσχετιζόμενοι καθώς το δρεπανοκύτταρο αλληλεπιδρά, καταστρέφει και διεγείρει το αγγειακό ενδοθήλιο και τους περιβάλλοντες ιστούς και κύτταρα. Οι μηχανισμοί αυτοί αποτελούν επίκεντρο του ερευνητικού ενδιαφέροντος σήμερα, γιατί η δυνατότητα τροποποίησής τους θα μπορούσε να βελτιώσει την κατάσταση των ασθενών.

#### • Γενετικοί παράγοντες

Αιμοσφαιρίνη F. Η παρουσία αλύσων  $\gamma$  και  $\alpha$  μαζί με τις αλύσους  $\beta$  (Weatherall, 1964). Σε κλινικό επίπεδο, αυτό επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι οι δρεπανοκυτταρικοί ασθενείς που, για άλλους λόγους μπορούν να συνθέσουν και αρκετή HbF (σύνθετοι ετεροζύγωτες HbS / $\delta\beta$ -MA, HbS/HPFH, κ.α.), εμφανίζουν ηπιότερη κλινική εικόνα και σαφώς αραιότερες (ή και πολύ σπάνιες) επώδυνες κρίσεις (Benesh et al, 1980).<sup>S</sup> και  $\alpha$  στα ερυθροκύτταρα της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας μειώνει την τάση ενδοκυττάρου πολυμερισμού λόγω σχηματισμού υβριδίων  $\alpha_2\beta_2^S$

Εκτός των γενετικών παραγόντων (HbF,  $\alpha$ -MA,  $\beta$ -MA, άλλες αιμοσφαιρινικές παραλλαγές), είναι η μεγάλη κυτταρική ετερογένεια των δρεπανοκυτταρικών συνδρόμων που επηρεάζεται σημαντικά και από άλλους εξωγενείς παράγοντες οι οποίοι είναι καθοριστικοί για την δρεπάνωση.

- Η ενδοκυττάρια συγκέντρωση της HbS (MCHC)
- Οι μεταβολές του 2,3 DPG
- Το pH
- Η αύξηση των ιόντων  $Ca^{++}$  και τις μεταβολές άλλων ιόντων
- Η τάση προσκόλλησης των δρεπανοκυττάρων στο ενδοθήλιο
- Το ενδοθήλιο καθ' εαυτό
- Τα λευκά αιμοσφαίρια
- Τα αιμοπετάλια
- Η ενεργοποίηση των αιμοστατικών μηχανισμών
- Ο αγγειακός τόνος

### 2.4.5 Διάγνωση

Η διάγνωση της ΔΝ βασίζεται στην κλινική εικόνα, στο ατομικό οικογενειακό αναμνηστικό και επιβεβαιώνεται με την κλινική εξέταση και τον εργαστηριακό έλεγχο. Υψίστης σημασίας για την εργαστηριακή διάγνωση είναι η γνώση της συχνότητας διαταραχής της ΔΝ στον πληθυσμό, η ετερογένεια των γενετικών ατελειών σχέσης γονοτύπου/φαινοτύπου.

Η μεθοδολογία της εργαστηριακής διερεύνησης της ΔΝ είναι αυτή της διερεύνησης μιας αιμοσφαιρινοπάθειας και περιλαμβάνει:

- τον αιματολογικό έλεγχο
- τη βιοχημική μελέτη της αιμοσφαιρίνης
- τον ποσοτικό προσδιορισμό της HbA2 HbF και της εμβρυικής (HbF)
- τη δοκιμασία δρεπάνωσης
- τον έλεγχο ερυθροκυτταρικών εγκλείστων και
- την ωσμωτική αντίσταση των ερυθροκυττάρων

Η γενική εξέταση αίματος ( Hb, RBC, Hct, MCV, MCH, RDW) με ηλεκτρονικά συστήματα μέτρησης σε αξιόπιστο αιματολογικό αναλυτή, και η μορφολογία των ερυθροκυττάρων δίνουν πολύ σημαντικές πληροφορίες. Στην ετερόζυγο δρεπανοκυτταρική αναιμία αναμένονται φυσιολογικές οι αιματολογικές παράμετροι όπως η αιμοσφαιρίνη και οι ερυθροκυτταρικοί δείκτες (MCV, MCH, MCHC).

Στην ομόζυγο δρεπανοκυτταρική αναιμία παρατηρείται βαριά αναιμία με αιμοσφαιρίνη (Hb) 6-8g/dl, ορθόχρωμη ορθοκυτταρική ή μακροκυτταρική με σύγχρονη αύξηση των δικτυοερυθροκυττάρων, ανισοκυττάρωση ποικιλοκυττάρωση, πολυχρωματοφιλία, στοχοκυττάρωση και με χαρακτηριστική την ανεύρεση των δρεπανοκυττάρων και σωματίων Howell-jolly επί αυτόματης σπληνεκτομής. Στην διπλή ετεροζυγωτία ( μικροδρεπανοκυτταρική αναιμία) παρατηρείται αναιμία (Hb 7-12g/dl), με επηρεασμένους ερυθροκυτταρικούς δείκτες και χαρακτηριστική παθολογική μορφολογία ερυθροκυττάρων στο περιφερικό αίμα με θαλασαιμικές αλλοιώσεις, παρουσία δρεπανοκυττάρων και σωματίων Howell-jolly και ερυθροβλαστών. Η αντίχνευση κλάσματος Hb θα πρέπει να ολοκληρώνεται και με την ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης.

Οι μοριακές τεχνικές χρησιμοποιούνται κυρίως **στον προγεννητικό έλεγχο**, για την διερεύνηση των δρεπανοκυτταρικών συνδρόμων. Η προγεννητική διάγνωση είναι εφικτή από την 8<sup>η</sup> εβδομάδα με λήψη δείγματος από τις χοριακές λάχνες.

## Αντιμετώπιση Λοιμώξεων

Ο εμβολιασμός στα παιδιά είναι απαραίτητος για τον S. Pneumoniae, τον H. Influenzae, τον ιό της ηπατίτιδας B, ενώ η προφυλακτική χορήγηση πενικιλίνης από την νεογνική ηλικία έως την ηλικία των πέντε ετών, ελαττώνει τον κίνδυνο προσβολής από πνευμονία ή μηνιγγίτιδα (Austrian et al, 1972, Zarkowsky et al, 1986). Τα παθογόνα αίτια (συνήθως S. Pneumoniae, H. Influenzae, E. Coli, Parvo-ιός B19, Staphylococcus aureus, salmonella spp) των λοιμώξεων αποτελούν σημαντικό παράγοντα νοσηρότητας και θνητότητας σε ασθενείς με ΔΝ (Hord et al, 2002).

Η θνητότητα των λοιμώξεων είναι αυξημένη εξαιτίας της συχνής εγκατάστασης βακτηριαμίας που εξελίσσεται αιφνιδίως σε σήψη. Η έγκαιρη και ορθή αντιμετώπιση της λοίμωξης, είναι ουσιαστικής σημασίας για την επιβίωση του ασθενή. Συνήθως απαιτείται ενδονοσοκομειακή νοσηλεία με χορήγηση ενδοφλέβιας αντιβιοτικής αγωγής και ταυτόχρονη αναζήτηση της αιτίας της λοίμωξης με καλλιέργειες (αίματος, ούρων, πτυέλων, ENY) και απεικονιστικό έλεγχο (Πάγκαλης, 2008).

Εμπειρικά χορηγούνται υψηλές δόσεις πενικιλίνης ή κεφτριαζόνης παράλληλα με υποστηρικτική αγωγή, χορήγηση υγρών, Οξυγόνου κ.α (Stuart and Nagel, 2004). Οι λοιμώξεις αποτελούν σημαντικό πρόβλημα για τους ασθενείς με ΔΝ καθώς επηρεάζουν την ποιότητα ζωής τους και την επιβίωσή τους.

## Αντιμετώπιση επώδυνων κρίσεων

Στις επώδυνες κρίσεις η αντιμετώπιση πρώτης γραμμής περιλαμβάνει ανάπαυση, αυξημένη χορήγηση υγρών και επαρκή χορήγηση αναλγητικών. Η αναζήτηση του εκλυτικού αιτίου είναι σημαντικός παράγοντας στην επιλογή της κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής. Η πρόσληψη υγρών θεωρείται επαρκής εάν ο ασθενής λαμβάνει 60 ml/kg/υγρών 24ωρο. Η αναλγητική αγωγή περιλαμβάνει κατά προτεραιότητα ΜΣΑΦ (μη στερεοειδή αντιφλεγμονώδη) και με οπιοειδή. Η συμπληρωματική χορήγηση αγγειοδιασταλτικών, διττανθρακικών, όπως και η παρατεταμένη ανάπαυση με παράλληλη τοποθέτηση θερμών επιθεμάτων αποτελεί μέρος της θεραπευτικής αντιμετώπισης (Χαλεβελάκης, 1991, Weatherall, 2001, Πάγκαλης, 2008,).

Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται κατά την χορήγηση των οπιοειδών, για την πρόληψη εμφάνισης αναπνευστικής καταστολής ως παρενέργεια, με συχνή λήψη ζωτικών σημείων, καθώς και προοδευτική μείωση της αναλγητικής αγωγής.

## Μεταγγίσεις

Η απλή μετάγγιση συμπτωμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων πραγματοποιείται, τόσο για την αντιμετώπιση της βαριάς αναιμίας, (αιμοσφαιρίνη <4g/dl, η οποία συνοδεύει την επιδείνωση της αιμόλυσης ή την εμφάνιση της απλαστικής κρίσης), όσο και για τη μείωση των κυκλοφορούντων δρεπανοκυττάρων, (πχ σε αγγειοαποφρακτικά φαινόμενα ή προεγχειρητικά) (Πάγκαλης, 2008).

Ενδεικτικά απλή μετάγγιση συνιστάται σε οξύ νευρολογικό επεισόδιο, οξύ θωρακικό επεισόδιο, οξεία πολυοργανική ανεπάρκεια, σπληνικό εγκλωβισμό, πριαπισμό, υποτροπιάζουσες κρίσεις (Χαλεβελάκης, 1991, Weatherall, 2001, Πάγκαλης, 2008)

Η αφαιζομετάγγιση είναι μια πολύτιμη τεχνική, αλλά ίσως λιγότερο χρησιμοποιούμενη, η οποία μπορεί να ωφελήσει ασθενείς με σοβαρά αγγειοαποφρακτικά επεισόδια, όπως, εγκεφαλικό επεισόδιο, θωρακικό σύνδρομο, θρόμβωση μεσεντερίου, πριαπισμό και επιπλέον σε επείγουσες καταστάσεις (Χαλεβελάκης, 1991, Weatherall, 2001, Πάγκαλης, 2008). Ωστόσο η αφαιζομετάγγιση είναι αμφιλεγόμενη μέθοδος όσον αφορά τη θεραπεία του πριαπισμού, διότι κάποιες έρευνες έδειξαν αυξημένη συχνότητα εμφάνισης νευρολογικής καταστροφής, (τα στοιχεία όμως είναι ανεπαρκή για να οδηγήσουν σε κάποιο συμπέρασμα Swerddlow, 2006). Η αφαιζομετάγγιση μπορεί να περιορίσει τη δραματική αύξηση του ενδοαγγειακού όγκου, εν συγκρίσει με την απλή μετάγγιση και είναι χρήσιμη σε ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο, όπως επίσης συνηγορεί υπέρ της σταθερότητας των επιπέδων σιδήρου (Swerddlow, 2006).

Επιπλέον η απλή μετάγγιση ή αφαιζομετάγγιση έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα αποτελεσματική σε ασθενείς με ΔΝ κατά τη διάρκεια απλών χειρουργικών επεμβάσεων σε σύγκριση με αυτούς που δεν μεταγγίστηκαν καθόλου, καθώς ελαττώνει τον κίνδυνο μετεγχειρητικών επιπλοκών (Swerddlow, 2006).

Μακροπρόθεσμος προγραμματισμός μεταγγίσεων μπορεί να απαιτηθεί επί νευρολογικών επιπλοκών, προβλημάτων ανάπτυξης στην παιδική ηλικία και ενίοτε για την ελάττωση των επώδυνων κρίσεων.

Ασφαλή όρια κρίνονται σε αυτούς τους ασθενείς όταν η HbS κυμαίνεται σε επίπεδα <30% ή τα δρεπανοκύτταρα στο περιφερικό αίμα να είναι <30% (Weatherall, 2001). Επιπλέον κλινικές παρατηρήσεις και μελέτες της ομάδας Rombos et al, 2002, συμφωνούν ότι τα χαμηλά επίπεδα φερριτίνης συνοδεύονται από μείωση της συχνότητας και της βαρύτητας των επώδυνων κρίσεων (Ρόμπος και Καλότση, 2009). Πριν την μετάγγιση σκόπιμο είναι κατά τη διασταύρωση των μονάδων αίματος να γίνει πλήρης έλεγχος του φαινοτύπου των ερυθρών του δέκτη προς αποφυγή αλλοανοσοποίησης (που αναπτύσσεται συχνότερα σε ασθενείς με

ΔΝ από ότι σε άλλους μεταγγιζόμενους ασθενείς (Πάγκαλης, 2008, Ρόμπος και Καλότυχου, 2009).

Σε μεταγγιζόμενους ασθενείς πρέπει να ληφθεί υπόψη η υπερφόρτωση με σίδηρο καθώς και η πιθανή ανάγκη χορήγησης θεραπείας με χηλικούς παράγοντες, όταν τα επίπεδα της φερριτίνης ξεπερνούν τα 2000 mg/ml (Πάγκαλης, 2008).

Σε γενικές γραμμές οι ασθενείς με ΔΝ δεν εμφανίζουν προβλήματα με χαμηλά επίπεδα αιμοσφαιρίνης επομένως δεν απαιτούνται τακτικές μεταγγίσεις και αυτό οφείλεται στη χαμηλή συγγένεια του οξυγόνου και της αιμοσφαιρίνης S (Weatherall, 2001). Επιπλέον υπάρχουν πολλές ενδείξεις ότι η διατήρηση χαμηλών επιπέδων αιμοσφαιρίνης S συμβάλλουν στην πρωτογενή και δευτερογενή πρόληψη εγκεφαλικών επεισοδίων (Platt, 2005) ενώ αντίθετα η διακοπή προγραμματιών μετάγγισης ασθενών μπορεί να οδηγήσει σε εμφάνιση εγκεφαλικού επεισοδίου ή υποτροπή του.(Bader-Meunier, 2009). Επίσης οSwerddlow, 2006) και η σχέση κινδύνου/ωφελιμότητας από την μετάγγιση στην ανακούφιση από τις επώδυνες κρίσεις είναι θέμα υπό απόδειξη. Επιπρόσθετα η προφυλακτική μετάγγιση κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης δεν βρέθηκε να είναι αποτελεσματική. (Χαλεβελάκης, 1991, Swerddlow, 2006). ούτε η απλή μετάγγιση ούτε η αφαιζομετάγγιση είναι πιθανό να επιταχύνουν την επίλυση ενός οξέος επεισοδίου πόνου .

Επομένως η υπερφόρτωση σιδήρου, οι ενδείξεις της μετάγγισης οι οποίες τίθενται υπό αμφισβήτηση και ο φόβος των νοσημάτων που μπορεί να μεταδώσει η μετάγγιση προϊόντων αίματος, έλαβαν μια τελείως διαφορετική διάσταση σήμερα. (Ρόμπος και Καλότυχου 2009)

Με στόχο λοιπόν τη βέλτιστη παροχή περίθαλψης στον άρρωστο και την συνεχή βελτίωση της ΠΖ του, επιβάλλεται πλέον η συνεκτίμηση τριών παραγόντων: της ωφελιμότητας, του κινδύνου και του κόστους. Κάθε μετάγγιση που δεν θεωρείται επείγουσα θα πρέπει να τίθεται σήμερα σε ένα πλαίσιο κριτηρίων, που θα αξιολογείται από εξειδικευμένους επιστήμονες για την χρησιμότητά της με στόχο πάντα την βελτίωση της ΠΖ αυτής της ομάδας ασθενών.

### **Αντιμετώπιση αποφρακτικών κρίσεων**

Μέγιστης σημασίας είναι η πρόληψη των αποφρακτικών κρίσεων με συντηρητικά μέσα. Η σωστή ενυδάτωση, η αποφυγή υπερβολικής κόπωσης, η αποφυγή έκθεσης στο κρύο ή σε υψόμετρο καθώς και η αποφυγή οινοπνευματωδών είναι ενδεικτικά των συντηρητικών μέσων αντιμετώπισης τέτοιων κρίσεων (Χαβελάκης, 1991, Weatherall, 2001, Πάγκαλης, 2008.)



## Σπληνεκτομή-Χολοκυστεκτομή

Σε περιπτώσεις επιδείνωσης κρίσης εγκλωβισμού στον σπλήνα παρά την θεραπευτική αντιμετώπιση των συντηρητικών μέτρων διενεργείται επείγουσα σπληνεκτομή. Οι ενδείξεις για την χολοκυστεκτομή είναι οι συχνές κρίσεις χολοκυστίτιδας ή χολολιθίασης. Μπορεί επίσης να γίνει χολοκυστεκτομή σε περιπτώσεις προγραμματισμένης σπληνεκτομής (Weatherall, 2001, Πάγκαλης, 2008).

### Αντιμετώπιση άλλων εκδηλώσεων-καταστάσεων

Τα **άτονα έλκη** απαιτούν αντιβιοτική θεραπεία και χειρουργική φροντίδα. Τοπική αγωγή με σκευάσματα και βοηθά στην επούλωσή τους. Συνήθως όμως υποτροπιάζουν Η αντιμετώπιση της **άσηπτης νέκρωσης της κεφαλής του μηριαίου** είναι η χειρουργική αποκατάσταση και η θεραπευτική αντιμετώπιση της **αμφιβληστροειδοπάθειας** γίνεται με Laser. (Πάγκαλης, 2008).

**Στην κύηση** οι γυναίκες με συμπτωματική ΔΝ (πρόσφατες μείζονες επιπλοκές ή επώδυνες κρίσεις) ή παλαιότερο επιβαρυσμένο μαιευτικό ιστορικό, μπορεί να ωφεληθούν από πρόγραμμα αφαιζομεταγγίσεων με σκοπό την ελάττωση των επιπέδων της HbS προς αποφυγή της πιθανότητας εμφάνισης εμφράκτου στον πλακούντα, κυρίως αν υπάρχει ιστορικό αποβολής (Hassel, 2005, Πάγκαλης, 2008).

**Επί χειρουργικών επεμβάσεων**, σημαντική είναι η αποφυγή υποξίας και αφυδάτωσης. Ασθενείς βαρύτερα προσβεβλημένοι μπορούν να αντιμετωπιστούν προεγχειρητικά με πρόγραμμα μεταγγίσεων για την ελάττωση της HbS.

### Νεότερες θεραπευτικές προσεγγίσεις

#### Διέγερση της παραγωγής της HbF

Η αύξηση του επιπέδου της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης στα ερυθρά αιμοσφαίρια μπορεί να ελαττώσει τη βαρύτητα της νόσου. Πρόσφατες μελέτες με τον αντιμεταβολίτη υδροξουρία και το μόνο εγκεκριμένο φάρμακο από το FDA, είναι ενθαρρυντικές στην επίτευξη σημαντικής ελάττωσης της συχνότητας των επώδυνων κρίσεων, των μειζόνων επιπλοκών, των αναγκών μεταγγίσεων και των εισαγωγών στο νοσοκομείο.

Επιπλέον σε μελέτες του 2003 και του 2008 αποδείχθηκε ότι αυξάνεται ο χρόνος επιβίωσης και μειώνεται η θνησιμότητα των ασθενών (Steinberg et al, 2003, Voskaridou et al, 2008) HbF) HbS, MSH που είχε σαν δευτερεύοντα στόχο την επίδραση στην ΠΖ, έδειξε βελτίωση του αισθήματος της υπέρταση (Ballas et al, 2007). (Charache et al, 1995). Αυτό επιτυγχάνεται, εν μέρει, από την επανεργοποίηση της παραγωγής εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης (στη θέση της η οποία προκαλεί ΔΝ. Επίσης μελέτη παρατήρησης της υδροξουρίας στο παρελθόν είχε χρησιμοποιηθεί ως παράγοντας χημειοθεραπείας και υπάρχει κάποια ανησυχία

ότι η μακροχρόνια χρήση της μπορεί να είναι επιβλαβής, αλλά ο κίνδυνος αυτός έχει αποδειχθεί ότι είναι μικρός ενώ πιθανόν τα οφέλη της να υπερτερούν των κινδύνων.

Οι ασθενείς με θεραπεία υδροξουρίας, οι οποίοι βρίσκονται στην αναπαραγωγική φάση της ζωής τους, είτε θα πρέπει να λαμβάνουν αντισυλληπτικά σκευάσματα, είτε θα πρέπει να διακόπτουν την υδροξουρία κατά τη διάρκεια προσπάθειας τεκνοποίησης. Παρότι η λήψη υδροξουρίας κατά τη διάρκεια σύλληψης (τόσο από την μητρική όσο και από την πατρική πλευρά) και της εγκυμοσύνης δεν φαίνεται να οδήγησε σε τερατογένεση, οι ασθενείς οφείλουν να γνωρίζουν ότι η υδροξουρία μπορεί να έχει τερατογόνο, μεταλλαξιογόνο και ογκογόνο δράση (Ρόμπος και Καλότχου, 2009).

Επειδή δεν υπάρχουν ασφαλή φάρμακα, και υπάρχουν συνήθως ανεπιθύμητες αντιδράσεις, ιδιαίτερα σε έναν αντινεοπλασματικό παράγοντα, πριν την χορήγηση του θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη και να αξιολογούνται από τον θεράποντα ιατρό, όλοι οι παράμετροι της νόσου και της κατάστασης του ασθενούς. Επιπλέον να συνυπολογίζονται τα θετικά και τα αρνητικά μιας θεραπευτικής αγωγής με συνακόλουθα την απαραίτητη προϋπόθεση της στενής παρακολούθησης του αρρώστου για τυχόν παρενέργειες ή επιπλοκές από την αγωγή και το βαθμό συμμόρφωσής του στις οδηγίες του θεράποντα ιατρού, με τελικό στόχο τη βελτίωση της ΠΖ του.

### **Μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων**

Οι προσπάθειες θεραπευτικής αντιμετώπισης με μεταμόσχευση μυελού των οστών είχαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα (Rombos et al, 2002), όμως η μεταμόσχευση μυελού δεν είναι εφαρμόσιμη σε όλους τους ασθενείς, αφ' ενός επειδή μπορεί να μην βρεθεί συμβατός δότης, αφετέρου επειδή πρέπει να συνεκτιμηθεί η περιμεταμοσχευτική θνητότητα σε σχέση με το γεγονός ότι η πρόγνωση της νόσου έχει βελτιωθεί με την κατάλληλη αγωγή (Πάγκαλης, 2008).

### **Γονιδιακή θεραπεία**

Η γονιδιακή θεραπεία παρέχει τη δυνατότητα οριστικής θεραπείας χωρίς τους κινδύνους της μεταμόσχευσης του μυελού. Ωστόσο όμως ακόμη υπάρχουν σημαντικά προβλήματα που πρέπει να ξεπεραστούν και μάλλον θα απαιτηθούν αρκετά χρόνια πριν την καθιέρωση της εφαρμογής της γονιδιακής θεραπείας.

## A2.ΜΕΡΟΣ

### 2.5.Ψυχολογική υποστήριξη θαλασσαιμικών πασχόντων

#### Γιατί είναι τόσο σημαντική η ψυχολογική υποστήριξη:

Καθολικά, αναγνωρίζεται, ότι η θαλασσαιμία, όπως και άλλα χρόνια νοσήματα, έχει σημαντικές ψυχολογικές επιπτώσεις. Ο τρόπος με τον οποίο η οικογένεια και ο ασθενής, συμβιβάζεται με την ασθένεια και την θεραπεία, έχει κριτική επίδραση στην επιβίωση των ασθενών. Χωρίς κατανόηση και αποδοχή της νόσου και των συνεπειών της, από πάσχοντες και οικογένεια, δεν θα μπορούσαν να αντιμετωπισθούν οι δυσκολίες από τις μακροχρόνιες μεταγγίσεις και την αποσιδήρωση, με επακόλουθη συνέπεια τον αυξημένο κίνδυνο λόγω επιπλοκών της νόσου και φτωχότερη επιβίωση. Ρόλος κλειδί για γιατρούς και νοσηλευτικό προσωπικό είναι να βοηθήσουν τους πάσχοντες και τις οικογένειες τους να αντιμετωπίσουν τις δυσκολίες της θεραπείας.

***Η τήρηση της θεραπείας είναι ένας βασικό στόχος, αλλά η γενική αποδοχή της κατάστασής του από τον ασθενή είναι το μυστικό για φυσιολογική ανάπτυξη από την παιδική στην ενήλικη ζωή.***

Η μηνιαία επαφή με τα κέντρα θαλασσαιμίας από τα πρώτα έτη της ζωής του ασθενούς, επιτρέπει σε γιατρούς και άλλα μέλη της ομάδας, να ενεργούν ως σημεία αναφοράς για την γενική κατάσταση της υγείας των πασχόντων συμπεριλαμβανομένης της γενικής στάσης και ευεξίας τους.

Επιπλέον, παρέχει την δυνατότητα στον γιατρό να προάγει την ψυχική συναισθηματική και κοινωνική ανάπτυξη των πασχόντων, ο οποίος παίρνει κατά κάποιο τρόπο τον ρόλο του <<οικογενειακού γιατρού>>.

Η αντιμετώπιση της θαλασσαιμίας είναι βασισμένη στην από κοινού θεραπευτική συμμαχία γιατρού και νοσηλευτικού προσωπικού και ασθενούς, σε όλη τη πορεία της νόσου. Εξ αιτίας της έμφασης της ιατρικής εκπαίδευσης και του προσανατολισμού στην ασθένεια, πολλοί γιατροί συναντούν δυσκολίες να συμφιλιωθούν με τις ψυχολογικές απαιτήσεις της θεραπείας χρόνιων κληρονομικών ασθενειών.

Αυτό μπορεί να γίνει δυσκολότερο για τον γιατρό διότι οι πάσχοντες με θαλασσαιμία εκφράζουν συχνά έντονα αρνητικά συναισθήματα, τα οποία δύνανται να εμποδίζουν την επικοινωνία. Ακόμη, λόγω της μακρόχρονης θεραπείας, πάσχοντες και οικογένεια είναι συχνά καλά πληροφορημένοι για την πάθηση, ώστε μη ειδικοί γιατροί να θεωρήσουν ότι υπονομεύεται ο διακεκριμένος ρόλος τους. Οι ανωτέρω παράγοντες καθιστούν δύσκολη την

ειλικρινή, βαθιά επικοινωνία, η οποία είναι υψίστης σημασίας για την επιτυχή αντιμετώπιση της θαλασσαιμίας.

### Η ψυχολογία των κληρονομικών χρόνιων νόσων

Κάθε γενετικό νόσημα, ασχέτως της αιτιολογίας του, υποβάλει την αίσθηση της ενοχής. Αυτό μπορεί να επηρεάσει την αρχική σχέση γονέα-παιδιού. Όταν αναπτυχθούν οι κλινικές εκδηλώσεις, εντός του πρώτου έτους, το νόσημα μπορεί να έχει δυσμενέστερη επίδραση στη σχέση γονέα-παιδιού. Επιπλέον, η θεραπεία, μετάγγιση και αποσιδήρωση, απαιτεί επανειλημμένες επεμβατικές διαδικασίες και νοσοκομειακές επισκέψεις οι οποίες προκαλούν ευερεθιστότητα.

Η χρονιότητα είναι ένα ισχυρό μέτωπο συναισθηματικών προβλημάτων που επιτείνονται σε κάθε σημαντικό αναπτυξιακό στάδιο της ζωής των ασθενών. Οι πάσχοντες αισθάνονται ότι είναι διαφορετικοί, περιορισμένοι ή απομονωμένοι. Τα συναισθήματα τους μετατοπίζονται ταχέως από την κατάθλιψη στην επιθετικότητα και αντίστροφα. Το θεραπευτικό προσωπικό πρέπει να είναι προετοιμασμένο να δεχτεί αυτή την μετατροπή και να τους συμπαρασταθεί ώστε να βρουν τη δική τους « φυσιολογία » και ταυ

Συνολικά, η καλή θεραπεία διευκολύνει την προσωπική ανάπτυξη και καταξίωση ενώ η πτωχής ποιότητας φροντίδα καθιστά αυτή την ανάπτυξη δύσκολη ή απρόβλεπτη.

### Επικοινωνία επαγγελματιών υγείας και πασχόντων

#### **Θα πρέπει να διεξάγεται όσο είναι δυνατό**

- Ακούγοντας τους πάσχοντες. Πρέπει να υπάρχει ενδιαφέρον για το συναίσθημα των ασθενών και τις πραγματικές εμπειρίες τους.
- Αποδεχόμενοι και σεβόμενοι την άποψη του ασθενούς και να είναι ευαίσθητοι κατά την διάρκεια της προσωπικής επικοινωνίας.
- Συμμεριζόμενοι, με συνέπεια να είναι κοντά στα θετικά και αρνητικά συναισθήματα των ασθενών.
- Κατανοώντας, όχι μόνο σε διανοητικό αλλά και συναισθηματικό επίπεδο.
- Διατηρώντας τα όρια, δίνοντας βοήθεια και ανακούφιση, αλλά κρατώντας στο μυαλό τον ρόλο του γιατρού.

Αυτός ο τρόπος αλληλεπίδρασης είναι εξαιρετικά ωφέλιμος για τον πάσχοντα, οδηγώντας τον στην καλύτερη αντιμετώπιση της θαλασσαιμίας και στη διατήρηση της αίσθησης της ισορροπίας. Μπορεί επίσης να είναι εξαιρετικά ωφέλιμος και για τον γιατρό, σε ιατρικό και συναισθηματικό επίπεδο. Εάν ο γιατρός επιτύχει να διατηρήσει ένα σταθερό διάλογο, ο

ασθενής συχνά μπορεί να βρει στον κόσμο της θαλασσαιμίας ικανότητες που προκαλούν πολύ μεγάλες εκπλήξεις όπως η αντιμετώπιση των μεγάλων προκλήσεων της ζωής γέννηση/θάνατος, αγάπη/μοναξιά δυνατότητες/όρια αντίστοιχα με των συνομηλίκων τους.

### Ανακοίνωση της διάγνωσης

Είναι χρήσιμο να επικεντρωθούμε στην ανακοίνωση της διάγνωσης. Αυτή είναι η αφετηρία της πορείας της νόσου και μπορεί να σημαδέψει μόνιμα (θετικά ή αρνητικά) τη θεραπευτική σχέση.

Για να δημιουργήσουμε ένα ιδανικό πλαίσιο, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα εξής:

- Ο χώρος και ο χρόνος θα πρέπει να επιλεγεί έτσι ώστε να εξασφαλίσει ατμόσφαιρα η οποία θα στηρίζει τις ελπίδες, χωρίς εξαπάτηση και καταπίεση.
- Ο γιατρός θα πρέπει να συζητήσει την διάγνωση και με τους δύο γονείς μαζί παραχωρώντας αρκετό χρόνο, για να ακούσει τις ανησυχίες τους και να απαντήσει στις ερωτήσεις.
- Οι πληροφορίες πρέπει να είναι ειλικρινείς, πλήρεις και επαναλαμβανόμενες όσες φορές χρειαστεί. Το βάρος των αρνητικών συναισθημάτων, δυνατό να είναι τόσο μεγάλο ώστε οι γονείς να εμφανίζονται συγκεχυμένοι ακόμη και μετά από πλήρη ενημέρωση που έχει δοθεί κατ' επανάληψη.
- Στους ακόλουθους μήνες της διάγνωσης η συζήτηση πρέπει να ανανεώνεται με την ίδια προσοχή στο θέμα και κατά προτίμηση με τον ίδιο γιατρό στη συνέχεια.

Η ίδια προσοχή πρέπει να δίνεται σε κάθε ση-μαντικό βήμα, ώστε οι γονείς και οι πάσχοντες να αφομοιώνουν καλύτερα πληροφορίες που προκαλούν συναίσθημα θλίψης.

### Ψυχολογικός αντίκτυπος της αναιμίας και των μεταγίσεων

Η βαριά αναιμία είναι η αιτία ώστε ο ασθενής να αισθάνεται αδύναμος και τρωτός. Διατηρώντας ένα ικανοποιητικό επίπεδο αιμοσφαιρίνης, με καλές μεταγίσεις, περιορίζει τα συμπτώματα καθώς και την ανησυχία του επικείμενου θανάτου.

Ωστόσο, η μείωση της αιμοσφαιρίνης κατά τη διάρκεια των διαστημάτων των μεταγίσεων μπορεί να οδηγήσει στην επανεμφάνιση των συμπτωμάτων. Αυτό

παρέχει στους πάσχοντες την εμπειρία της μη σταθερότητας και της αμφιβολίας για τις φυσικές τους δυνατότητες. Επιπλέον, εξαιτίας του κινδύνου νοσημάτων που μεταδίδονται από τις μεταγίσεις, ο φόβος επιμόλυνσης είναι πάντα παρών και ίσως έντονος για υπαρκτούς λόγους (υψηλός κίνδυνος μετάδοσης) ή λόγω της ψυχολογικής κατάστασης του ασθενούς. Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, η στάση απέναντι στη θεραπεία είναι αμφίσημη. Σε κάθε περίπτωση, οι ανάγκες για περιοδικές μεταγίσεις μαρτυρούν ότι η ζωτική ενέργεια

προέρχεται από άλλους ανθρώπους και υποδηλοί εξάρτηση. Το αίσθημα της εξάρτησης μπορεί να πάρει μια διανοητική διάσταση και να υποσκάμει την προσωπική ανάπτυξη.

Αυτή η θεραπεία δεν καλύπτει. Απλά αντισταθμίζει, αναπληρώνει το μπάλωμα <<μπάλωμα>> για την αναιμία, δίνοντας ζωή και καλή διαβίωση.

Όμως παρέχει την δυνατότητα μετάδοσης ιώσεων και αύξησης του φορτίου σιδήρου για τα οποία χρειάζονται πρόσθετη αντιμετώπιση.

Αυτός ο συνδυασμός των πλεονεκτημάτων και μειονεκτημάτων των μεταγγίσεων. Δημιουργεί στους ασθενείς ψυχολογικές αντιδράσεις ως προς την θεραπεία τους.

*Οι πολλαπλά μεταγγιζόμενοι πάσχοντες έχουν την εμπειρία και θετικών συναισθημάτων, όπως της ευγνωμοσύνης, αλλά και αρνητικών όπως του μiasμένου ή του αφανισμού.*

#### Ψυχολογία κατά την αποσιδήρωση

Το θεραπευτικό προσωπικό πρέπει να είναι πολύ οικείο με την ψυχολογία του ασθενούς κατά την αποσιδήρωση και η συμμόρφωση στη θεραπεία καθορίζει την πρόγνωση (Πίνακας 7).

Ψυχολογικές διαστάσεις	Αποσιδήρωση με παράγοντες που χορηγούνται υποδορίως	Αποσιδήρωση με παράγοντες που χορηγούνται από το στόμα
Επίθεση	+	-
<<Μπάλωμα>>	+	+
Καταστροφή της εικόνας του σώματος	+	-
Καθημερινή υπενθύμιση της νόσου	+	+
Αίσθημα διαφορετικότητας	++	+
Έλλειψη ελέγχου	+	+
Συνεχής δέσμευση	+	+

Πίνακας 7.

Γενικά, η αποσιδήρωση είναι μια ψυχολογικά απαιτητική θεραπεία επειδή:

- Θεραπεύει, κατά ένα μέρος τις επιπλοκές άλλης θεραπείας (μεταγγίσεις), είναι « το μπάλωμα ενός άλλου μπαλώματος »
- Όπως η μετάγγιση, υπενθυμίζει μία ασθένεια, αλλά σε ημερήσια βάση.

- Η καλύτερη αποσιδήρωση αρχίζει κατά την διάρκεια των πρώτων χρόνων ζωής
- Η αποτελεσματικότητα του φαρμάκου δεν μπορεί να ελεγχθεί γρήγορα και άμεσα από τον ασθενή. Έτσι, η συμμόρφωση είναι μία πράξη εμπιστοσύνης. Αντανακλά την ποιότητα των σχέσεων θεραπευτικού προσωπικού ασθενούς και την πίστη για μακροπρόθεσμα οφέλη.

### Ψυχολογική επίδραση επιπλοκών της θαλασσαιμίας

Σοβαρές επιπλοκές μπορεί να εμφανιστούν κατά την διάρκεια της εφηβείας και της νεαρής ενήλικης ζωής. Η ψυχολογική επίδραση αυτών των επιπλοκών εξαρτάται περισσότερο από τον βαθμό βαρύτητάς τους και λιγότερο από την ηλικία εκδήλωσής τους. Γενικά, οι ασυμπτωματικές επιπλοκές δεν απαιτούν φαρμακοθεραπεία και δεν επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την ποιότητα ζωής. Όμως, σε περίπτωση σοβαρής επιπλοκής, π.χ. καρδιοπάθεια ή διαβήτη, ο ασθενής ευρίσκεται σε ψυχολογική αναπροσαρμογή, προσπαθώντας να ενοποιήσει τις ελπίδες, τον ενθουσιασμό και τις ευχές, χαρακτηριστικά της νεότητας, με μία φθαρμένη φυσική κατάσταση και με τυπικά ιατρικά χαρακτηριστικά μεγάλης ηλικίας. Αυτή την περίοδο, ο μη ικανοποιητικά υποστηριγμένος ασθενής αισθάνεται *απελπιστικά κατεστραμμένος*, εγκαταλείποντας την υγεία και τη συνεχιζόμενη θεραπεία του.

Πίνακας 8.

Επιπλοκή	Βάρος Θεραπείας	Επίδραση στην καθημερινή ζωή	Αίσθημα διαφορετικότητας	Εξάρτησή	Αίσθημα κατεστραμμένου σώματος	Άγχος θανάτου
Υπογονατισμός	+++	++	+++	+	++	-
Υποθυρεοειδισμός	+	-	+	-	++	-
Υποπαραθυρεοειδισμός	++	++	+	+	++	-
Οστεοπόρωση	++	++	++	+	++	-
Διαβήτης	+++	+++	+++	+++	++	+
Καρδιοπάθεια	+++	+++	+++	++	+++	+++
Ηπατίτιδα	-/+	++	++	+	+++	+

Στον (Πίνακα 8) παρουσιάζεται η επίδραση των πιο συχνών επιπλοκών (μέτριου/σοβαρού σταδίου) στη συναισθηματική ισορροπία του ασθενή.

Αντίθετα με το παρελθόν, οι πρόσφατες πρόοδοι στον τομέα της αποσιδήρωσης οδήγησαν σε μια θεαματική αύξηση της επιβίωσης, προφυλάσσοντας τους ασθενείς από οξεία καρδιακή ανεπάρκεια και γενικά βελτιώνοντας την ποιότητα της ζωής τους. Το θεραπευτικό προσωπικό πρέπει να διατηρεί μια θετική στάση και να τρέφει την ελπίδα των ασθενών.



Ακόμη και σε σοβαρές περιπτώσεις, ο πόνος μπορεί να γίνει υποφερτός μιλώντας και προσπαθώντας να βρεθούν τρόποι αποδοχής των νέων ορίων της δεδομένης κατάστασης.

## A.3ΜΕΡΟΣ

### 2.6 Αναλυτικές και Φυσικοχημικές Τεχνικές Διάγνωσης των αιμοσφαινοπαθειών

#### 2.6.1Εισαγωγή

Οι παραλλαγές του μορίου της αιμοσφαιρίνης αποτελούν ένα ευρύ πεδίο έρευνας στην αιματολογία, στην βιοχημεία, στην φυσιολογία και στην φυσικοχημεία. Ειδικότερα από το 1949 και μετά όταν οι Pauling,Hano,Singer και Welles ανακάλυψαν την Hbs στα ερυθροκύτταρα των πασχόντων από δρεπανοκυτταρική αναιμία έχουν ανακαλυφθεί και μελετηθεί περισσότεροι από 700 τύπο αιμοσφαιρινών. Πολλές από τις παραλλαγές των αιμοσφαιρινών δεν προκαλούν βλάβες στην υγεία των ετεροζυγωτών ή των ομοζυγωτών. Θα μπορούσε μάλιστα να λεχθεί ότι προσφαιρούν πλεονεκτήματα έναντι των φυσιολογικών ατόμων. Έτσι εξηγείται και η μεγάλη διάδοση των παθολογικών αιμοσφαιρινών σε όλο τον κόσμο.

Η συντριπτική πλειοψηφία των παθολογικών αιμοσφαιρινών προέρχεται από σημειακές μεταλλαγές στην κωδική περιοχή του γονιδίου της σφαιρίνης που έχει ως αποτέλεσμα μία αλλαγή αμινοξέος στην πεπτιδική αλυσίδα.

Μερικές παθολογικές αιμοσφαιρίνες παρουσιάζουν αλλαγές σε δύο αμινοξέα στην ίδια αλυσίδα όπως οι αιμοσφαιρίνες **Cobeil και Villeparissis**.

Μία άλλη ομάδα παθολογικών αιμοσφαιρινών έχει βραχύτερες ή μακρύτερες αλυσίδες όπως η Hb Constant Spring που έχει 28-31 επιπλέον αμινοξέα στο C άκρο των αλυσίδων της. Η ανωμαλία αυτή προέρχεται από σημειακή μεταλλαγή στην τριπλέτα τερματισμού από UAA σε AAA. Αντίθετα ,η Hb Wayne έχει μία νέα σειρά 8 αμινοξέων από την 138 θέση της αλυσίδας της και μετά (δομική μεταλλαγή).Αλλαγές αμινοξέων απαντώνται και στους 4 τύπους των αιμοσφαιρινικών αλυσίδων του φυσιολογικού ατόμου(α,β,γ και δ).

Οι παθολογικές αιμοσφαιρίνες παρουσιάζουν πολλές φορές διαφορετικές ιδιότητες από την HbA πχ. *στην χημική συγγένεια προς το οξυγόνο, την σταθερότητα του μορίου ,στην οξειδωση ή τον πολυμερισμό, γεγονός που έχει μεγάλη κλινική σημασία*. Με βάση τις ιδιότητες τους οι παθολογικές αιμοσφαιρίνες θα μπορούσαν από κλινική άποψη να χωρισθούν σε 5 ομάδες :

1.Τα δρεπανοκυτταρικά σύνδρομα (**SC,SD<sub>PUNGAB</sub>, SO<sub>ARAB</sub>,Sβthal**).

2.Αιμοσφαιρίνες με αλλαγές στην χημική συγγένεια Hb-O<sub>2</sub>

- 2.1 Αιμοσφαιρίνες με αυξημένη χημική συγγένεια στο O<sub>2</sub> (ερυθροκυτταρώσεις)  
όπως η *Hb Olymbia, Hb San Diego*.
- 2.2 Αιμοσφαιρίνες με ελαττωμένη χημική συγγένεια στο O<sub>2</sub> (αναιμία, κυάνωση)  
όπως η *Hb Knossos, Hb Arta*.
3. Ασταθείς αιμοσφαιρίνες όπως οι αιμοσφαιρίνες *Koln & Zurich*.
4. Αιμοσφαιρίνες M (μεθαιμοσφαιρίνες, κυάνωση) όπως οι *Hb Boston & Saskatoon*
5. Αιμοσφαιρίνες που προκαλούν φαινότυπο Μεσογειακής αναιμίας.
  - 5.1 Αιμοσφαιρίνες Lepore (β-Μεσογειακή Αναιμία).
  - 5.2 Μεταλλαγές του τέλους της α-αλυσίδας, όπως η Hb Costant-Spring ή Hb Icaria (α-Μεσογειακή Αναιμία).

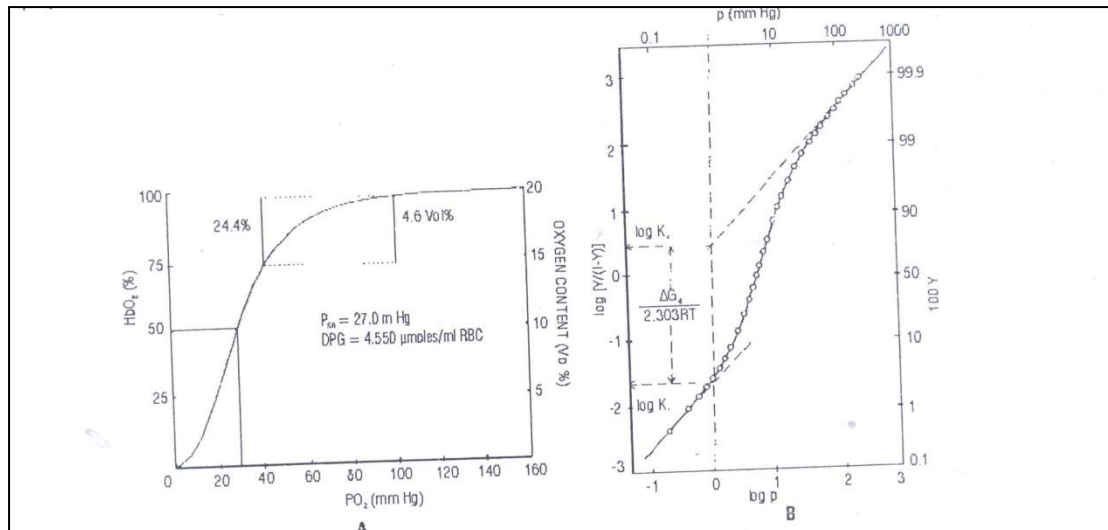
### **Μεθοδολογία**

Τα εργαστηριακά πρωτόκολλα διερεύνησης των παθολογικών αιμοσφαιρινών ποικίλλουν ανάλογα με τις πιθανολογούμενες ιδιότητες της αιμοσφαιρίνης.

### **A. Παθολογικές αιμοσφαιρίνες με αυξημένη χημική συγγένεια Hb-O<sub>2</sub>.**

Οι βασικές εργαστηριακές αναλύσεις είναι η μέτρηση της καμπύλης ισορροπίας Hb-O<sub>2</sub> που εκφράζεται ποσοτικά από την P<sub>50</sub> (είναι η PO<sub>2</sub> στην οποία η Hb είναι κορεσμένη 50% με O<sub>2</sub>) και μέτρηση του 2,3DPG (διφωσφογλυκερικού οξέος).

Η καμπύλη ισορροπίας προσδιορίζεται κύρια από δύο αναλυτές: τον Hem-O-Scan (αέριος φάση, ρύθμιση του pH με CO<sub>2</sub> (PCO<sub>2</sub> 40mmHg) και με τον Hemox-Analyzer (υγρά φάση, ρύθμιση του pH με ρυθμιστικά διαλύματα). Και στις δύο τεχνικές η ρύθμιση της PO<sub>2</sub> επιτυγχάνεται με ένα ηλεκτρόδιο Clark η δε αλλαγή στην απορρόφηση μετρίεται σε δυο μήκη κύματος 576nm (οξύ-Hb) και 560 nm (δεσοξύ-Hb). Οι άξονες στην καμπύλη ισορροπίας είναι της PO<sub>2</sub> και του κορεσμένου της Hb με O<sub>2</sub> και δίνει πληροφορίες για την φυσιολογία της αποδέσμευσης του O<sub>2</sub> από την Hb, ενώ η λογαριθμική έκφραση της καμπύλης ισορροπίας μας παρέχει πληροφορίες για την βιοχημεία και φυσικοχημεία του μορίου της αιμοσφαιρίνης. (Σχήμα 1.)



Εάν το 2,3DPG είναι στα φυσιολογικά επίπεδα και η καμπύλη ισορροπίας Hb-O<sub>2</sub> στρέφεται περισσότερο από 5mmHg προς τα αριστερά, δηλαδή έχει ελαττωθεί η P<sub>50</sub>, τότε σίγουρα υπάρχει η παθολογική αιμοσφαιρίνη με αυξημένη στο O<sub>2</sub>. Εάν όμως η συγκέντρωση του 2,3DPG είναι ελαττωμένη και η χημική συγγένεια Hb-O<sub>2</sub> αυξημένη, τότε πρόκειται για ερυθραιμία από έλλειψη γλυκοζυτικού ενζύμου (DPGM).

## 2.6.2 Ηλεκτροφορητικές και χρωματογραφικές τεχνικές

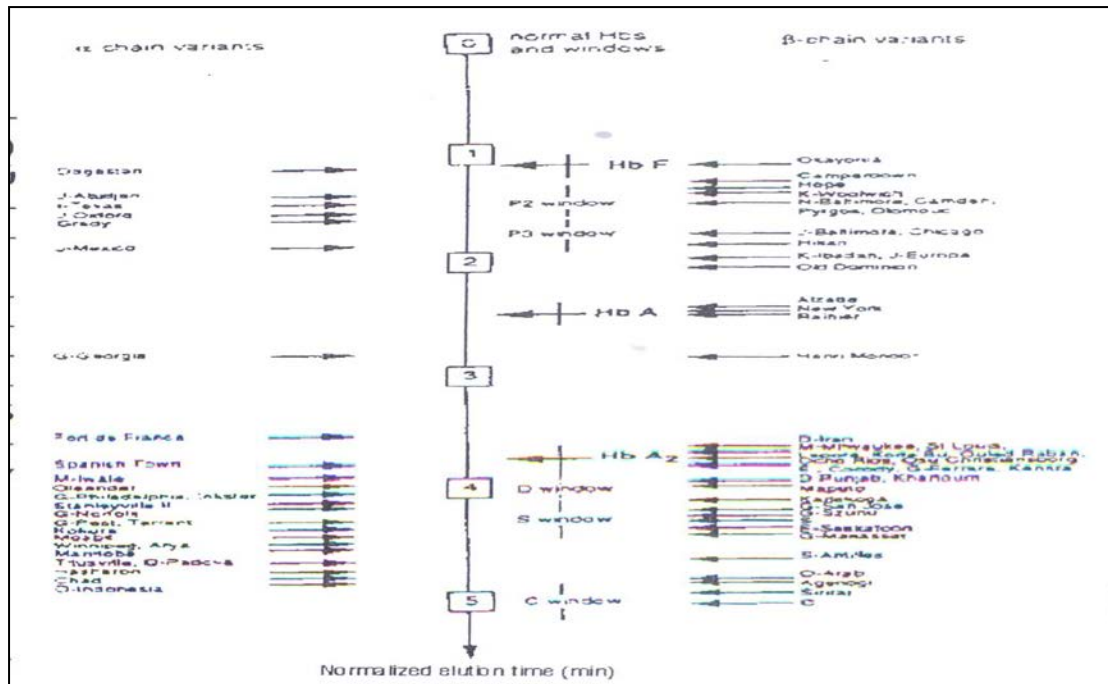
### Ηλεκτροφορητικές

1. Ηλεκτροφόρηση σε οξεική κυτταρίνη: pH 9 Buffer Tris-glycine.
2. Ηλεκτροφόρηση σε κιτρικό άγαρ: pH 6.0-6.2 Buffer κιτρικών.
3. Ισοηλεκτρική εστίαση σε gel αγαρόζης ή πολυακρυλαμίδης με: pH αμφολυτών 6-8 (σχήμα 2)
4. Ηλεκτροφόρηση των αιμοσφαιρινικών αλύσεων σε οξεική κυτταρίνη: pH 6.0, Buffer TrisEDTA-H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-ουρίας και β-μερκαπταιθανόλης ή σε pH 8.5.
5. Κάθετη ηλεκτροφόρηση των αλύσεων σε gel πολυακρυλαμίδης - Ουρίας-Triton.

Με τις μεθόδους 1,2,3 καθορίζουμε την ηλεκτροφορητική ικανότητα της παθολογικής αιμοσφαιρίνης Hb σε σχέση με την HbA, ενώ με τις μεθόδους 4,5 εντοπίζουμε σε ποια αιμοσφαιρινική άλυσω υπάρχει η μεταλλαγή.

### Χρωματογραφικές

1. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης ανταλλαγής των κατιόντων (ce-HPLC) είναι η ταχύτερη αναλυτική τεχνική ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού των αιμοσφαιρινών αλλά και προπαρασκευής των αιμοσφαιρινικών κλασμάτων. (Σχήμα 3.)



#### A.4.ΜΕΡΟΣ

##### 2.7 Επιλογή δειγμάτων-Αποτελέσματα

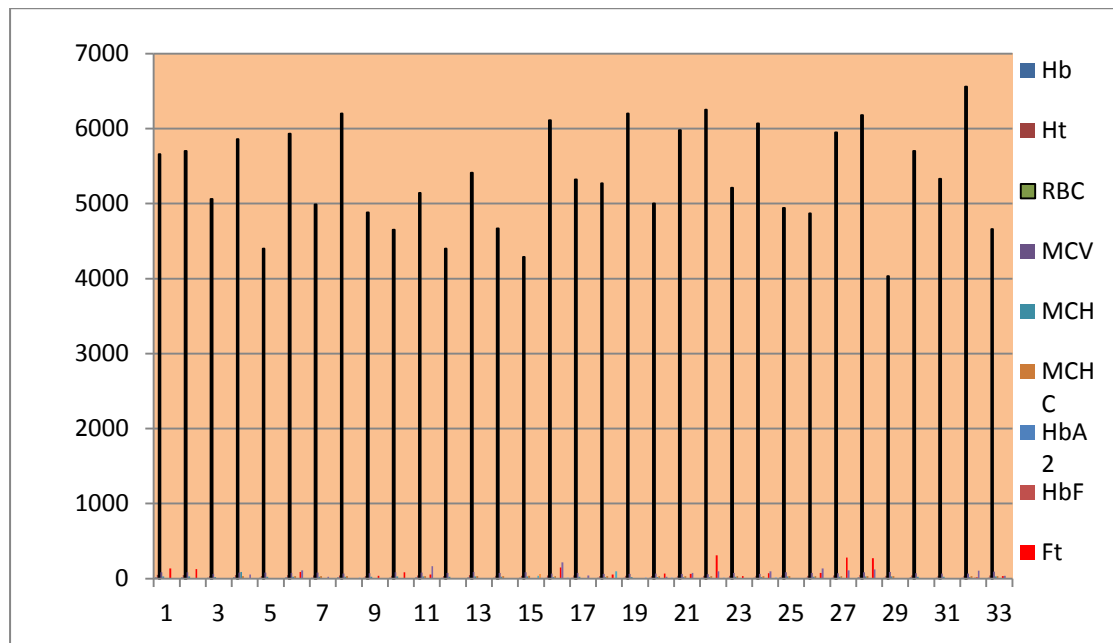
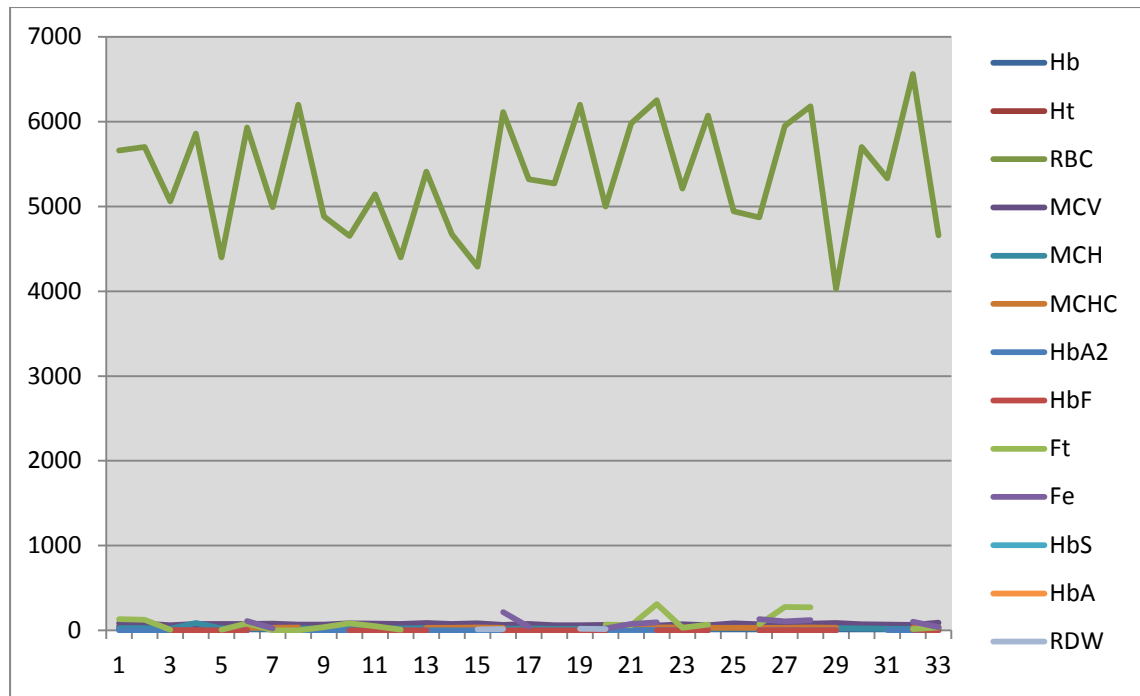
Κατά την πραγματοποίηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας επιλέχθηκαν 34 δείγματα περιστατικών κατηγορίας :

- α) Ετεροζυγώτες (φορείς) δβ-Μεσογειακής Αναιμίας.
- β) Ετεροζυγώτες (φορείς) α-ΜΑ με συχνότερη την έλλειψη  $\alpha^{3,7}$
- γ) Ετεροζυγώτες (φορείς) HbS .

Ο αριθμός των δειγμάτων που συγκεντρώθηκε προέρχεται από την περιοχή της Κρήτης(Νομός Ρεθύμνου) μετά την διαδικασία του προγεννητικού ελέγχου .

A/A	Hb	Ht	RBC	MCV	MCH	MCHC	HbA2	HbF	Ft	Fe	HbA	RDW
<b>C7</b>	15,3	47,9	5660,00	84,6	27		2,7		134,6			
<b>C62</b>	15,3	46,7	5700,00	81,9	26,9		2,9		125			
<b>C63</b>	10,3	31,3	5060,00	61,9	20,3		2,4	7,3	9			
<b>C87</b>	16,1	46,3	5860,00	79	87,5	34,8	2,48	2		55		
<b>C88</b>	11,4	34,6	4400,00	78,6	25,8		2,5	2	8,1			
<b>C89</b>	14,8	45,8	5930,00	77,2	25	32,3	2,1	0,5	86,5	110		
<b>C90</b>	12,5	39,5	4990,00	79,2	25	31,6			1,6	25		
<b>C98</b>	<b>14,5</b>	<b>42,7</b>	<b>6200,00</b>	<b>68,9</b>	<b>23,4</b>	<b>34</b>	<b>2,9</b>	<b>2</b>	<b>0,7</b>			<b>16,80</b>
<b>C99</b>	<b>11,1</b>	<b>34,2</b>	<b>4880,00</b>	<b>70,2</b>	<b>22,7</b>		<b>3,8</b>		<b>38</b>			

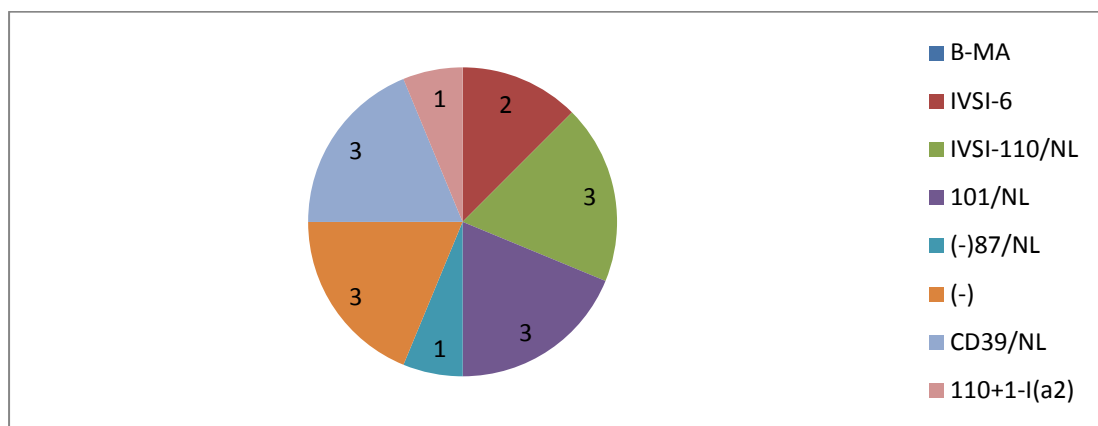
<b>C100</b>	<b>12,5</b>	<b>38,9</b>	<b>4650,00</b>	<b>83,7</b>	<b>26,8</b>		<b>3</b>		<b>83</b>			
<b>C126</b>	14,1	41,9	5140,00	81,5	27,4	33,7	3,7	2	52,6	165		
<b>C127</b>	11,2	33,5	4400,00	76,1	25,4		2,6	2	7,7			
<b>C128</b>	15,7	47,5	5410,00	87,8	29	33,1	3,4	0,9				
<b>C129</b>	12,1	36,2	4670,00	77,5	25,9	33,4	2,3					
<b>C145</b>	12,7	36,3	4289,00	84,8	29,7	35	2,3				59,4	12,8
<b>C146</b>	12,7	40,4	6110,00	66,1	20,8	31,4	4,9	1,3	149	216		16,4
<b>C151</b>	13,5	41	5320,00	77	25,4		2,3	2		42,8		
<b>C152</b>	10,3	32,1	5270,00	60,9	19,5	32,1	4,6	1,5	55			
<b>C161</b>	13	38,8	6200,00	63,1	21,1		3,7	1,1				19,8
<b>C162</b>	10,6	33,2	5000,00	65,9	21	31,9	5,7	1,6	68	23		15,2
<b>C174</b>	11,9	38,3	5980,00	64,1	19,9	31,1	4,9		61	76		
<b>C180</b>	12,5	36,2	6250,00	57,9	20	34,5	4,3	0,9	310	98		17,4
<b>C181</b>	13,4	39,1	5210,00	75	25,7	34,3	2,26	2	32			
<b>C175</b>	12,1	37,3	6070,00	61,5	19,9	32,3	5,5	3,4	71	96		19,4
<b>D396</b>	13,8	41,4	4940,00	83,7	28	33,4						
<b>D180</b>	11,8	35,9	4870,00	74	24,2	32,8	2,9	0,5	75	134		
<b>D163</b>	13,4	41,2	5950,00	69,2	22,5	32,5	2,4	0,9	279	108		
<b>D189</b>	17,2	50,6	6180,00	81,9	27,8	34	2,6	0,3	273,5	122		
<b>D250</b>	12	35,4	4030,00	87,8	29,8	33,9	3,2	0,6				
<b>D251</b>	13,6	41	5700,00	71,9	23,9							
<b>D131</b>	11,8	36,6	5330,00	68,6	22,2		4,8					
<b>D155</b>	11,8	37,3	6560,00	65,6	20,7	31,6	0,3	10,4	16	105		
<b>D235</b>	13,5	42,6	4660,00	91,4	29	31,7	3,5	1,4	34,6	39		



( Πίνακας 9.)

ΣΥΝΟΛΟ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΩΝ	34
HB	10-17.2G/d
HT	31.3-50.6%
PBC	4.030-6.560M/ml
MCV	60.9-91.4
MCH	19.5-87.5
MCHC	31.1-34.8
HBA2	0.3-7.70%
HBF	<2-10.4%
Ft	0.70-279ng/ml
Fe	23-216
HbS	38.3-98%

HbA	59.4%
RDW	12.8-19.8%
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ Β-ΜΑ</b>	IVSI-6:(2)
	IVSI-110/NL:(3)
	101/NL:(3)
	(-)87/NL:(1)
	(-)-(3)
	CD39/NL:(3)
	110+1-I(a2): (1)
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ Α-ΜΑ</b>	(-) :5
	a 3.7: (6)
	A2IVSI-(5nt):(1)
	α2polyA-1(AATAAA>AATAAG⊗1)
	ααα(+): (1)
	ααα(-): (3)
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ δ-ΜΑ</b>	δβsic/Turk (-) :(1)
	δβsic(+)/TurkA,B (-):(1)
	HbS/NL cd6/A>T :(1)



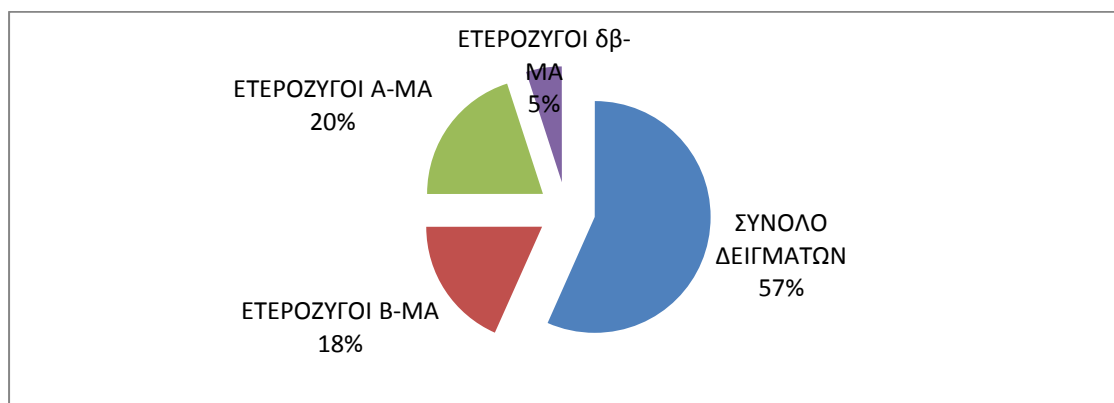
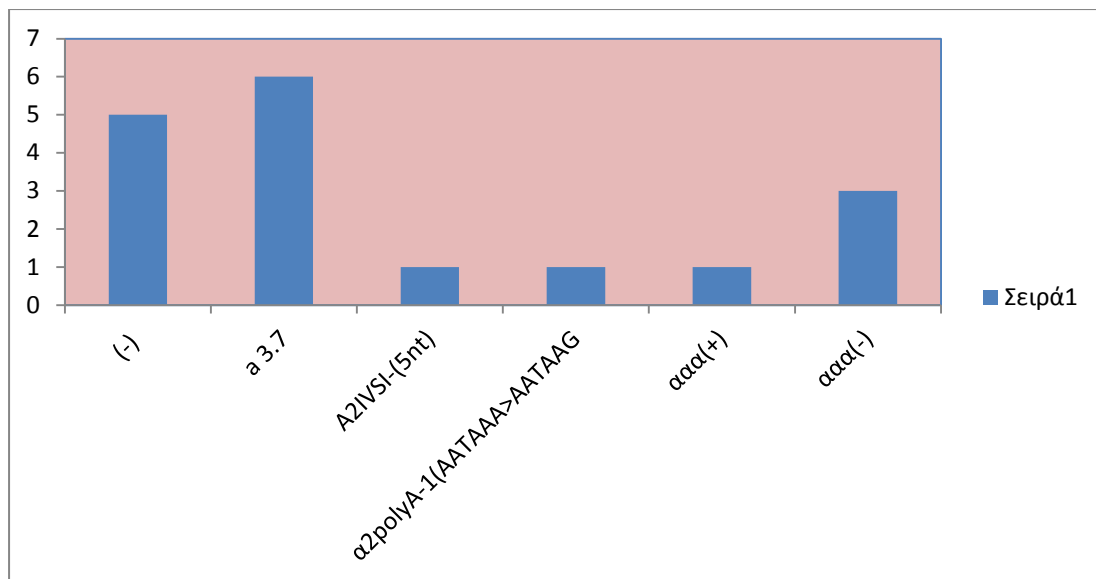
#### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ Β-ΜΑ

(3)101/NL: 19%,(3)CD39:19%,(1)-87/NL:1%,(3)-:19%,(3)-110/NL:19%,(2)IVSI-6:13% 110+1-I(a2).

#### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ Α-ΜΑ

a 3.7:35%,(-)29%,ααα(-)18%,ααα(+):6% α2polyA-1(AATAAA>AATAAG)6%, A2IVSI-(5nt)6%.





### 2.7.1 Διαδικασία αξιολόγησης αιματολογικών δεδομένων

Οι μετρήσεις των δειγμάτων έγιναν μετά την αξιολόγηση των αιματολογικών ευρημάτων όπως:

Hb : Προσδιορίζει την ποσότητα της αιμοσφαιρίνης που εμπεριέχεται στα ερυθρά αιμοσφαίρια σε συγκεκριμένο όγκο ολοκού αίματος (Φ.Τ Α 15.4+/-1.0, Γ 13.3+/-0.7)

Ht: Αντιστοιχεί στο ποσοστό (%) του όγκου που καταλαμβάνουν τα ερυθροκύτταρα σε σχέση με το συνολικό όγκο του αίματος (Φ.Τ 47+/-5% Α 38-/5% Γ).

R.BC: Αντιστοιχεί στον αριθμό των ερυθροκυττάρων που περιέχονται σε μία μονάδα όγκου αίματος (Φ.Τ Α: 5.170+/-0.39, Γ : 4.490+/- 0.32)

MCV: Μέσος όγκος ερυθροκυττάρων

MCH: Μέση ποσότητα αιμοσφαιρίνης ανα ερυθροκύτταρο

MCHC: Μέση πυκνότητα αιμοσφαιρινών στα ερυθροκύτταρα

RDW : Εύρος κατανομής του όγκου των ερυθροκυττάρων

#### 4.2.2 Εργαστηριακή διαδικασία

- α) Απομόνωση dna από περιφερικό αίμα. Η απομόνωση των δειγμάτων έγινε με kit exctracion της <<Qiagen.>>
- β) Ακολούθησε έλεγχος συγκέντρωσης dna με φωτομέτρηση γνωστού όγκου διαλύματος σε μήκος κύματος 260nm-280nm.
- γ) Ολοκληρώθηκε με την ηλεκτροφόριση του dna σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.
- δ) Τεχνική πολλαπλασιασμού τμήματος με την μέθοδο της PCR(β-MA/α-MA/δ-MA)  
(Πρωτόκολλα εκτέλεσης της PCR για δβ-MA/α-MA)
- ε) Έλεγχος της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 3%
- στ) Παρασκευή αποδιατακτικού πηκτώματος (ακρυλαμίδα)
- ζ) Αποτίπωση των αποτελεσμάτων με φωτογραφικό φακό σε UV.

#### ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ

- α) Απομόνωση dna



<<Αντιδραστήρια και στήλες με ειδικό φίλτρο της εταιρείας Qiagen>>

Πρωτόκολλο απομόνωσης.

1. Σε erpendorf των 2 ml βάζουμε τα προς εξετάσθεντα δείγματα με 40 μl πρωτεϊνάση K  
400μl AL Buffer  
400μl Whole Blood.
2. Επώαση στους 56°C για 10 min.
3. Προσθήκη 400 μl Απόλυτη Αλκοόλη
4. Ανακίνηση
5. Μεταγγίζουμε στις στυλίτσες 2 φορές.
6. Φυγοκεντρούμε στις 12.000 rpm για 2 min.
7. Προσθήκη 500μl Buffer AW1.
8. Πετάμε το κάτω erpendorf και βάζουμε καινούργιο.
9. Προσθήκη 500μl Buffer AW2.
10. Φυγοκεντρούμε στις 12.000 rpm για 6 min.

11. Πετάμε το κάτω erpendorf.
12. Προσθήκη 200μl ddH<sub>2</sub>O.
13. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.

β) Η ποσότητα και η καθαρότητα του dna εκτιμώνται με την φωτομέτρηση γνωστού όγκου διαλύματος dna που αραιώνεται σε τελικό όγκο 500μl με ddH<sub>2</sub>O. Το αραιωμένο διάλυμα dna τοποθετείται σε κυβέτα χαλαζία.

Η φωτομέτρηση γίνεται σε μήκος κύματος 260 & 280 nm. Απο την οπτική πυκνότητα (O.D) του δείγματος υπολογίζεται η συγκέντρωση του dna σε αυτό.

Δίδεται ο τύπος προς υπολογισμό

**Το καθαρό dna δίνει λόγο  $O.D_{260\text{ nm}}/O.D_{280\text{ nm}}=1.8(1.7-1.9 \text{ φ.τ})$**



γ) Φωτογραφικό υλικό ηλεκτροφόρισης dna δειγμάτων συλλογής σε πήκτωμα αραρόζης 2%.



δ) Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης PCR

### **Μέθοδος**

Η μέθοδος επιτρέπει την ενζυμική σύνθεση μεγάλου μοριακού αριθμού αντιγράφων συγκεκριμένης περιοχής dna έχοντας ως υπόστρωμα γενομικό dna. Επιτυγχάνεται με επαναλαμβανόμενη επέκταση δύο ολιγονουκλεοτιδίων, εκκινητών, με κατεύθυνση 5'-3' επιλεγμένων έτσι ώστε το ένα να είναι συμπληρωματικό με την αλληλουχία του 3' άκρου της λειτουργικής και το άλλο με το 3' άκρο της μη λειτουργικής αλυσίδας του dna και στη θέση που ατιστοιχεί στα άκρα του τμήματος που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Η επέκταση των εκκινητών γίνεται με θερμοανθεκτική dna πολυμεράση που είναι σε θέση να συνθέσει συμπληρωματική έλικα dna με κατεύθυνση 5'-3' έχοντας ως υπόστρωμα dna.

Η αντίδραση γίνεται σε ένα μικρό σωληνάριο σε όγκο συνήθως 50-100μl με τριφωσφορικά δεσοξυριβονουκεοτίδια (dntps) και συγκεκριμένη συγκέντρωση μαγνησίου.

### Περιλαμβάνει

α) Αποδιάταξη του υποστρώματος dna σε θερμοκρασία 94-96°C για 1 min. (template denaturation)

β)Σύνθεση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες που βρίσκονται στις απέναντι αλυσίδες του dna (annealing) σε θερμοκρασία 37-70°C για 1 min.

γ)Επιμήκυνση των υβριδικών εκινητών (primer extension) σε θερμοκρασία 72°C για 1 min, όπου η θερμοανθεκτική Tag Polymerase αντιγράφει το μονόκλωνο dna με κατεύθυνση 5'-3' αρχίζοντας πάντα την τοποθέτηση ενός νουκλεοτιδίου στη θέση 3' μιας κλίνωνης περιοχής του dna.

Αποτέλεσμα όλων αυτών των σταδίων η σύνθεση μέχρι 106 αντίγραφα του συγκεκριμένου τμήματος dna.

Πρωτόκολλα εκτέλεσης β-Μεσογειακής αναιμίας διαφορετικών τμημάτων (fragments

FR : για FR<sub>0</sub>,FR<sub>1</sub>,FR<sub>2</sub>FR<sub>5</sub>)

Πρωτόκολλο fragment για Fr2:

Δείγματα :7,C98,C99,C100,I-110,I-6,β39,Neg=8 /Program: Fr2Fot dna=7μl

Mix_ Fr2	Mix Fr1	Mix Fr0
10×buffer:10×9=90	10×buffer:10×9=90	10×buffer:5×9=45
MgCl <sub>2</sub> :5×9=45	MgCl <sub>2</sub> :1×9=9	MgCl <sub>2</sub> :2,5×9=22,5
Dntps:3×9=27	Dntps:1,5×9=13,5	Dntps:1,5×9=13,5
gcb:3×9=27	gca:0,5×9=4,5	A2:3×9=27
apCo4:1×9=9	pCo4:0,5×9=4,5	A10:3×9=27
brTag Polym:0,5×9=4,5	Hi-FiTag Polym:1×9=9	brTag Polym:0,5×9=4,5
<b>TV=100μl</b>	<b>TV=50μl</b>	<b>TV=50μl</b>
<b>ddH<sub>2</sub>O:70,5 μl</b>	<b>NegH<sub>2</sub>O:35,5 μl</b>	<b>NegH<sub>2</sub>O:34,5 μl</b>
<b>NegH<sub>2</sub>O:77,5 μl</b>	<b>ddH<sub>2</sub>O:28,5 μl</b>	<b>ddH<sub>2</sub>O:28,5 μl</b>
<b>Vmix:22,5 μl</b>	<b>Vmix:14,5 μl</b>	<b>Vmix:15,5 μl</b>

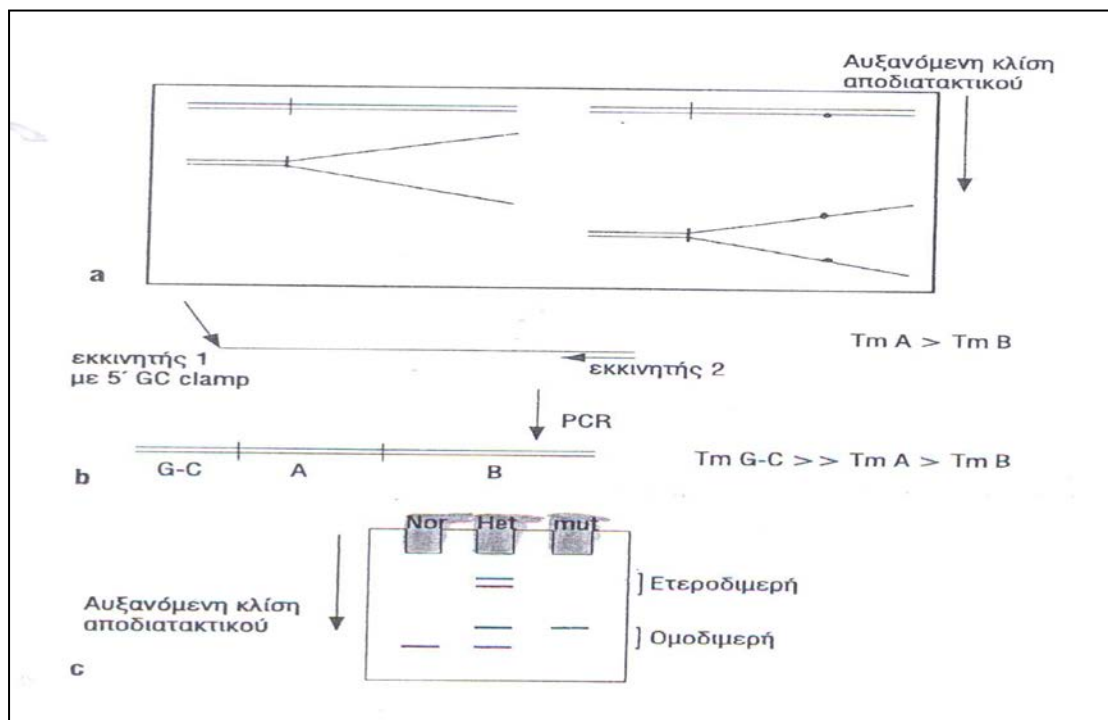
Πρωτόκολλο pcr για δβsic
Δείγματα: c62,c63 ,3632,3633(turk+)neg=5
Dna=5μl
Mix
10×buffer:5×6=30 <b>TV=50μl , ddH<sub>2</sub>O:32,1 μl , NegH<sub>2</sub>O:37,1 μl</b>
MgCl <sub>2</sub> :2,5×6=15
Dntps:2×6=12
Primers mix:3×6=18
Platinym Polym:0,5×9=4,5

στ) Παρασκευή αποδιατακτικού πηκτώματος (ακρυλαμίδα)

Η μέθοδος βσιζεται στον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό τμημάτων διπλής έλικας DNA μετά από πολλαπλασιασμό με pcr σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης που περιέχει αποδιατακτικούς παράγοντες (φορμαμίδιο και ουρία) σε προορδευτικά αυξανόμενη συγκέντρωση.

Οι δύο συμπληρωματικές αλυσίδες του δίκλωνου dna μπορούν να αποδιατάσσονται (τήκονται) όχι μόνο σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας αλλά και υπο την επίδραση χημικών αποδιατακτικών ουσιών.

Ο διαχωρισμός των φυσιολογικών και μεταλλαγμένων τμημάτων βασίζεται στα χαρακτηριστικά τήξης του dna. Προυπόθεση για την καταλληλότητα ενός τμήματος dna για την μέθοδο DGGE είναι η εμφάνιση διαφορετικών θερμοκρασιών ποδιάταξης στα δύο άκρα του τμήματος αυτού. Η θερμοκρασία αποδιάταξης είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη ακόμα και σε αλλαγές ενός νουκλεοτιδίου. Προκειμένου να δημιουργήσουμε περιοχές με διαφορετική θερμοκρασία ,προσθέτουμε σε έναν από τους δύο εκκινητές που χρησιμοποιούνται κατά τον πολλαπλασιασμό με pcr μια αλληλουχία πιο πλούσια σε γουανίνη και κυτοσίνη στο 5' άκρο. Καθώς ίδιου μεγέθους τμήματα που διαφέρουν σε 1 μόνο νουκλεοτίδιο ,μεταναστεύουν στο πήκτωμα αποχαμηλότερες προς υψηλότερες συγκεντρώσεις αποδιατακτικού,το καθένα θα φτάσει σε κάποια συγκεκριμένη θέση όπου θα αρχίσει να αποδιατάσσεται η διπλή έλικα από το άκρο του μορίου που εμφανίζει την χαμηλότερη θερμοκρασία αποδιάταξης. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία μιας διακλαδιζόμενης δομής η οποία καθιστά το μόριο δυσκίνητο ως εντελώς ανέκδοτο να κινηθεί .



Το dna ατόμου ετεροζυγώτη για συγκεκριμένη μετάλλαξη δίνει 4 ζώνες .Οι 2 ζώνες που ακινητοποιούνται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αποδιατακτικού οφείλονται σε ομόλογες διπλές έλικες φυσιολογικής ή μεταλλαγμένης αλληλουχίας(ομοδιμερή),ενώ οι 2 που

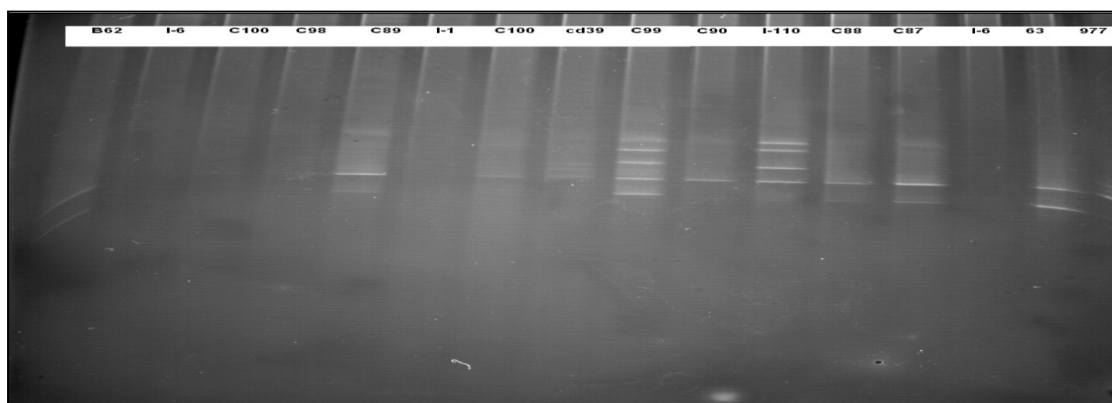
ακίνητοποιούνται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις αποδιατακτικού αποτελούνται από διπλή έλικα μη ομόλογης αλληλουχίας (ετεροδιμερή).

Παρασκευή DGGE για fragments Fr0-Fr1-Fr2 ,τρέχει 17 h και παρασκευάζονται διαλύματα 70% και 45% αντίστοιχα.

**70%: 15,75 ml 80%,2,25ml 0%,150μl APS,15 μl TEMED**

**40%: 10,1%ml 80%,7,9ml 0%,150μl APS,15 μl TEMED.**

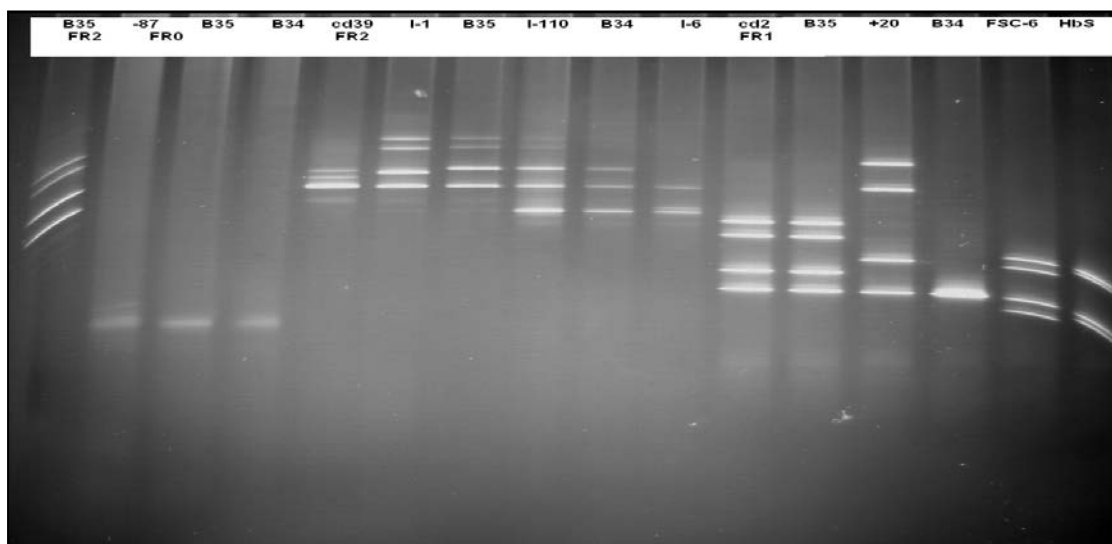
ζ) Παραδείγματα αποτυπωμένων αποτελεσμάτων :



Εικόνα 8.1

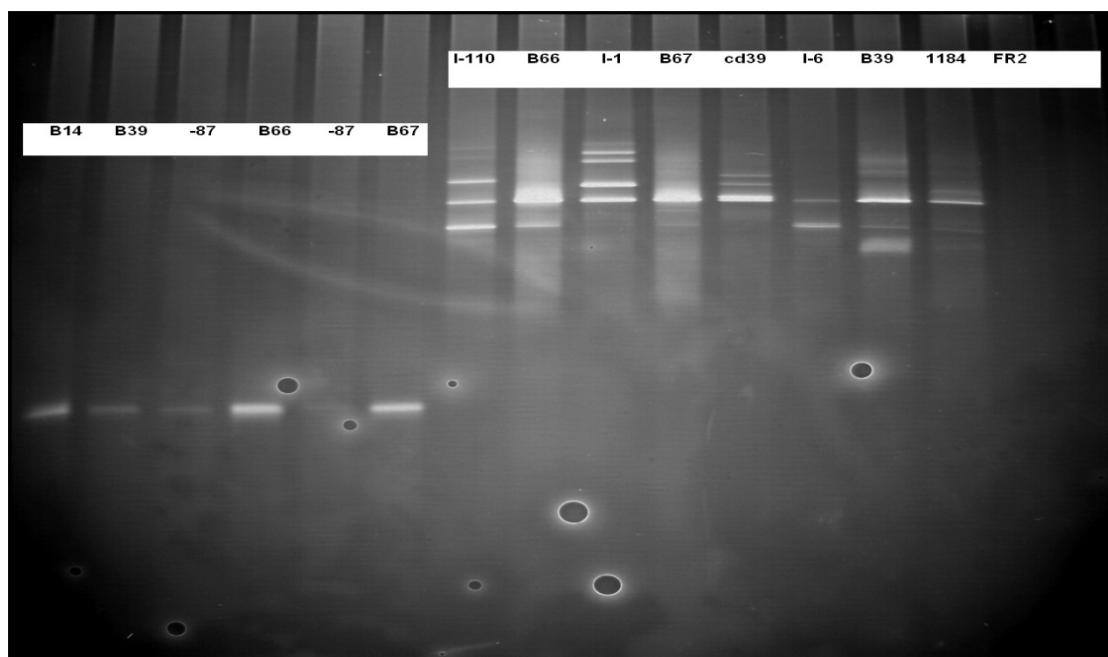
DGGE : Διακρίνεται η μετάλλαξη **I-110/nl**

Εικόνα 8.2



DGGE : Στα τμήματα Fr<sub>2</sub>,Fr<sub>0</sub>,Fr<sub>1</sub>. Διακρίνονται οι μεταλλάξεις **I-1,I- 110/nl**





Εικόνα 8.3

DGGE: Διακρίνονται μεταλλάξεις **I-110, I-1cd39, I-6/nl**

#### A.5 ΜΕΡΟΣ

**Πίνακες μεταλλάξεων αιμοσφαιρινοπαθειών στον Ελληνικό χώρο. Παλαιά και Νεότερα δεδομένα. Χάρτες συχνότητων αιμοσφαιρινοπαθειών στην Ελλάδα και Παγκοσμίως.**

(Πίνακας 10.)

<<Οι μεταλλάξεις του β-γονιδίου που συναντάμε στον Ελληνικό πληθυσμό. Σε παρενθέσεις φαίνονται οι αντικαταστάσεις των νουκλεοτιδίων που χαρακτηρίζει κάθε μεταλλαγή ανάλογα με την θέση και το είδος της αλλαγής.>>

Είδος μεταλλαγής	Τύπος	Αριθμός Χρωμ/των	Συχνότητα
IVSI-110(G-A)	β+	691	42.7
cd 39(C-T)	β <sup>0</sup>	291	18.0
IVS-1(G-A)	β <sup>0</sup>	204	12.6
IVSI-6(T-C)	β+	118	7.3
IVSII-745(C-G)	β+	98	6.1
IVSII-1(G-A)	β <sup>0</sup>	41	2.5
β-101(C-T)	β+	30	1.9
FSC-6(-A)	β <sup>0</sup>	24	1.5
δβ-Sic	β <sup>0</sup>	23	1.4
β-87(C-G)	β+	19	1.2
FSC-5(-CT)	β <sup>0</sup>	16	1
FSC-8(-AA)	β <sup>0</sup>	11	0.7
Hb Lepore	β+	9	0.6
IVSI-5(G-A)	β <sup>0</sup>	8	0.5
IVSI-116(T-G)	β+	4	0.2

Hb Knossos	$\beta^+$	3	0.2
Term cd+6(C-G)	$\beta^+$	3	0.2
$\delta\beta$ -Turkish	$\beta^0$	3	0.2
FSC-8/9(+G)	$\beta^0$	2+1	0.2
Cd 30(G-C)	$\beta^0$	2+1	0.2
$\beta$ +1570	$\beta^+$	2+1	0.2
Poly A(T-G)	$\beta^+$	2	0.1
B28(A-G)	$\beta^+$	1+1	0.1
Del IVS1:25bp	$\beta^0$	1+1	0.1
Del 44bp	$\beta^0$	1+1	0.1
IVSII-848(C-T)	$\beta^+$	1	0.1
$\beta$ -90(C-T)	$\beta^+$	1	0.1
IVSI-130(G-C)	$\beta^0$	1	0.1
Άγνωστες	-	5	0.3
<b>Σύνολο</b>	-	<b>1621</b>	<b>100</b>

Τα στοιχεία ανακοινώθηκαν και καταγράφηκαν στο 13<sup>ο</sup> Σεμινάριο Παθοφυσιολογίας του ερυθρού αιμοσφαιρίου /Εργαστηριακή διάγνωση –Κείμενα διαλέξεων **1998(Αθήνα)**.

Η συχνότητα των ορέων της  $\alpha$ -MA στον Ελληνικό πληθυσμό ανέρχεται περίπου στο 8%.Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί διεθνώς περίπου 40 ελλείματα και 35 σημειακές μεταλλαγές υπεύθυνες για  $\alpha$ -μεσογειακή αναιμία.Στην Ελλάδα η μοριακή διαταραχή της νόσου παρουσιάζεται ιδιαίτερα ετερογενείς. Μελέτη 73 ασθενών με αιμοσφαιρινοπάθεια Η αποκάλυψε 5 διαφορετικούς τύπους ελλειμάτων που προκαλούν  $\alpha^+$  ή  $\alpha^0$  μεσογειακή αναιμία.Συχνότερα ανευρίσκονται τα ελλείματα  $-\alpha^{3.7}$ ,

**-Med και  $-\alpha^{20.5}$**  και σπανιότερα τα  $\alpha^{4.2}$  και  $-\alpha^{5.2}$ . (Σχήμα 4.)Χαρακτηρίστηκαν 8 διαφορετικές μεταλλάξεις από τις οποίες οι 7 βρίσκονται στο  $\alpha 2$  και στο  $\alpha 1$  γονίδιο.

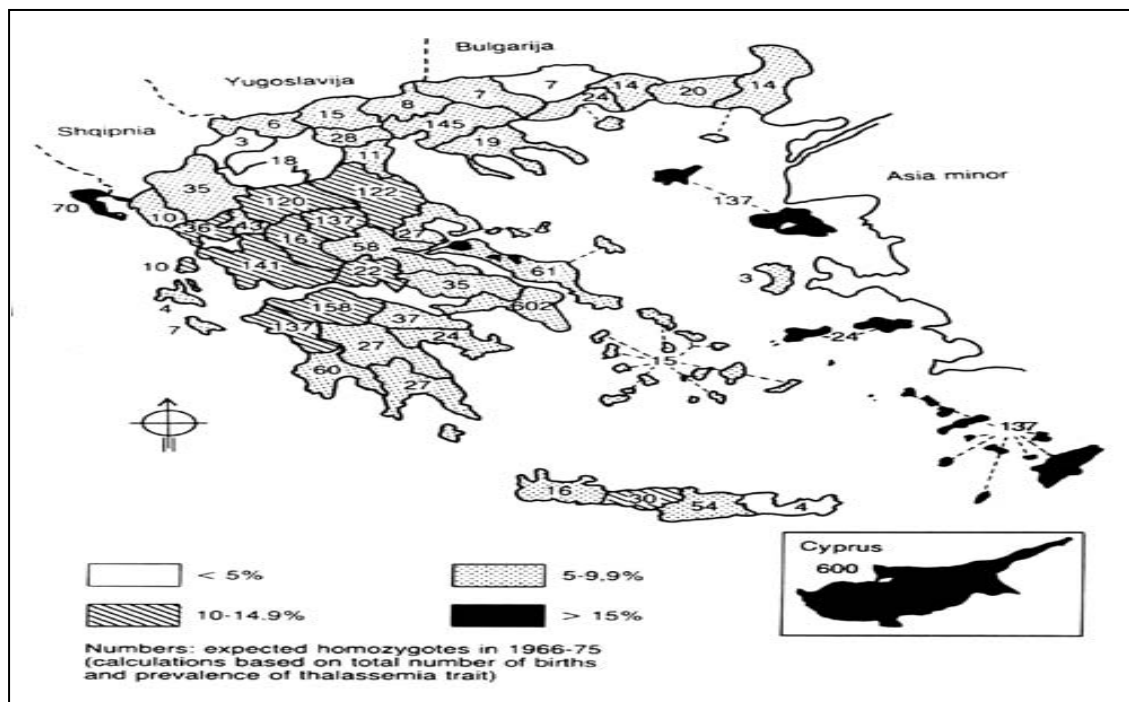
Γονότυπος	Αριθμός ασθενών	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ
--Med/ $\alpha^{3.7}$	26	
$-\alpha^{20.5}$ / $-\alpha^{3.7}$	15	42 ελλείματα dna
$-\alpha^{5.2}$	1	
--Med/ $\alpha^{Hph}$	8	18 διπλοί ετεροζυγώτες με ελλείματα και χωρίς έλλειμα dna
--Med/ $\alpha^{Ic}$	3	
--Med/ $\alpha^{CS}$	1	
--Med/ $\alpha^{PA}$	1	
--Med/ $\alpha^{Cd62}$	1	
$-\alpha^{20.5}$ / $\alpha^{Nco}$	1	
$-\alpha^{3.7}$ / $\alpha^{T^{Saudi}}$	3	
$\alpha^{T^{Saudia}}$ / $\alpha^{T^{Saudi}}$	9	13 χωρίς έλλειμα dna
$\alpha^{T^{Saudia}}$ / $\alpha^{cd29}$	2	
$\alpha^{cd29}$ / $\alpha^{cd29}$	1	
$\alpha^{T^{Saudi}}$ / $\alpha^{Ic}$	1	

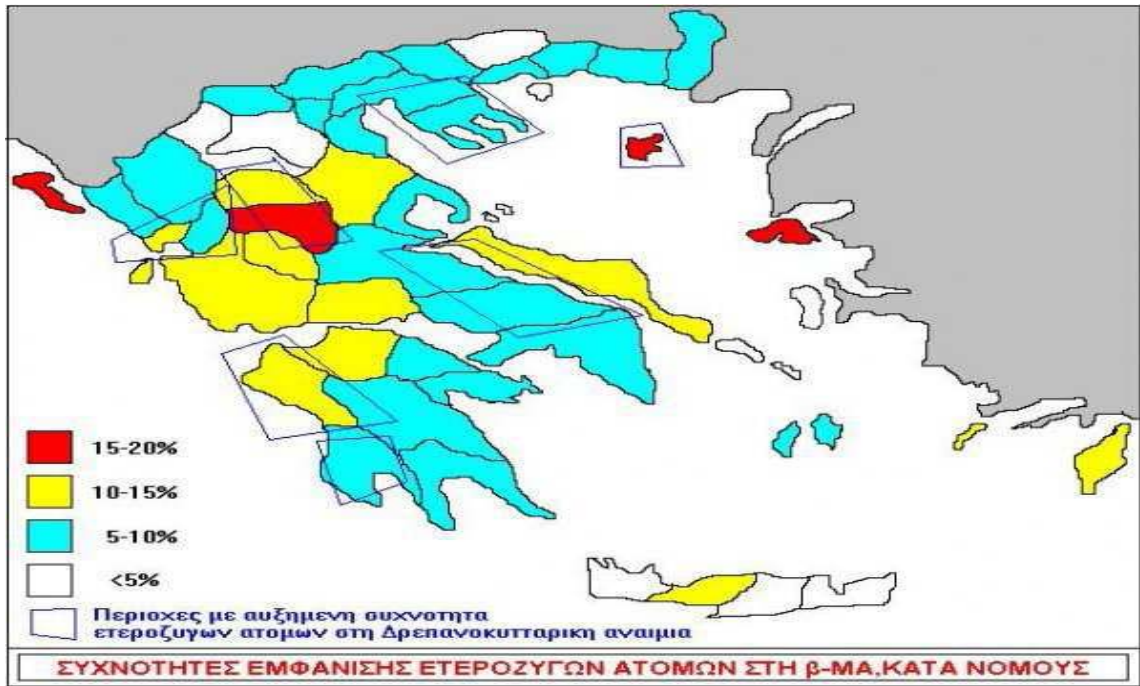
Σχήμα 4.

Ελλείματα  $\alpha$ -Μεσογειακής αναιμίας στην Ελλάδα

Ινδοί	-619 del	βο
Μεσογειακός, Αφρικανικός	-87	β++
Μαύρος	-88	β++
Αφρικανοί	-29	β++
Ιάπωνες	-31	β++
Μαύρος	-26	β++
Νοτιοανατολικής Ασίας	-28	β++
Μεσόγειος, Ασιάτες, Ινδοί	IVS1-nt5	βο
Μεσόγειος, Ασιάτες, Ινδοί	IVS1-nt1	βο
Μεσογειακός	IVS1-nt 110	β+
Μεσογειακός	IQS1-nt6	β+/+++
Μεσόγειος	IVS2-nt745	β+
Κινέζοι	IVS2-nt654	β+
Μεσόγειος	κωδικόνιο 5	βο
Μεσόγειος	κωδικόνιο 39	βο
Νοτιοανατολικής Ασίας	κωδικόνια 41/42	βο
Μεσόγειος, Αφροαμερικανοί	κωδικόνιο 6	βο
Μεσόγειος	AATAAA έως AATGAA	β++
Αφροαμερικανοί	AATAAA έως AACAAA	β++
Νοτιοανατολικής Ασίας	HbE	β++
Μεσόγειος	Hb Knossos	β++
Πίνακας : Συνήθεις τύποι β-θαλασσαιμίας, μαζί με τη βαρύτητα και την εθνική κατανομή		

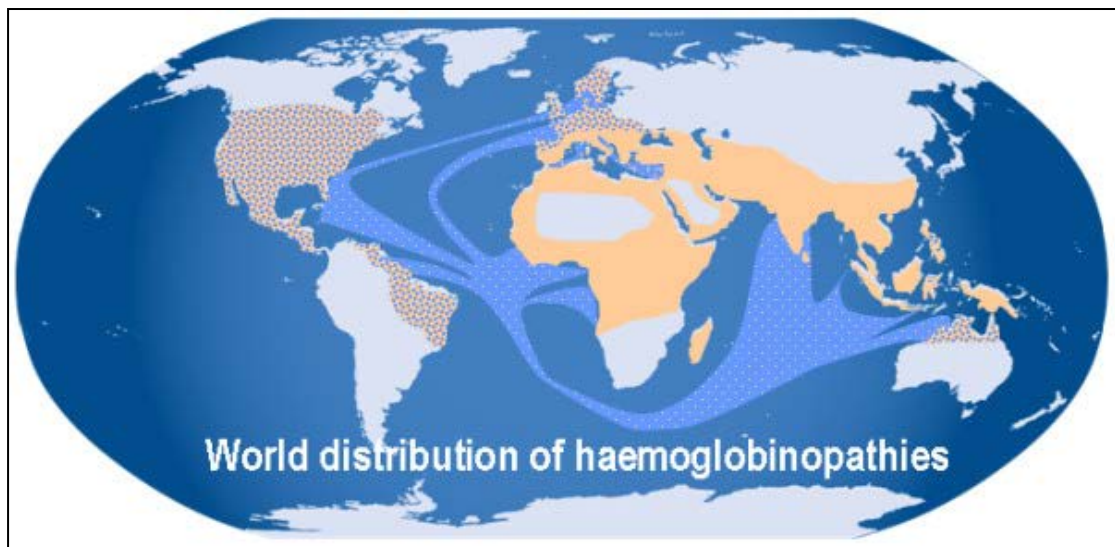
Επιδημιολογικά δεδομένα β-μεσογειακής αναιμίας από εκτεταμένες πληθυσμιακές μελέτες ανίχνευσης ετεροζυγωτών στην Ελλάδα της δεκαετίας 1966-1975.





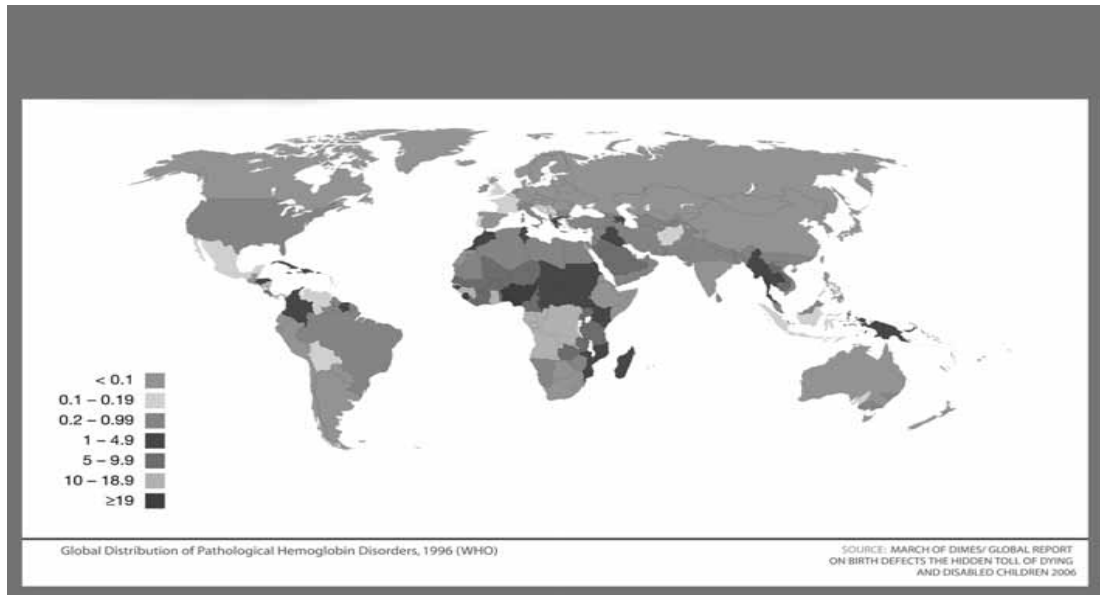
Γεννήσεις βρεφών με μείζον αιμοσφαιρινοπάθεια ανα 1000 γεννήσεις .

Εικόνα 8.4



Ποσοστό ατόμων με παθολογική αιμοσαιρινοπάθεια ανα 1000 γεννήσεις ζώντων νεογνών.

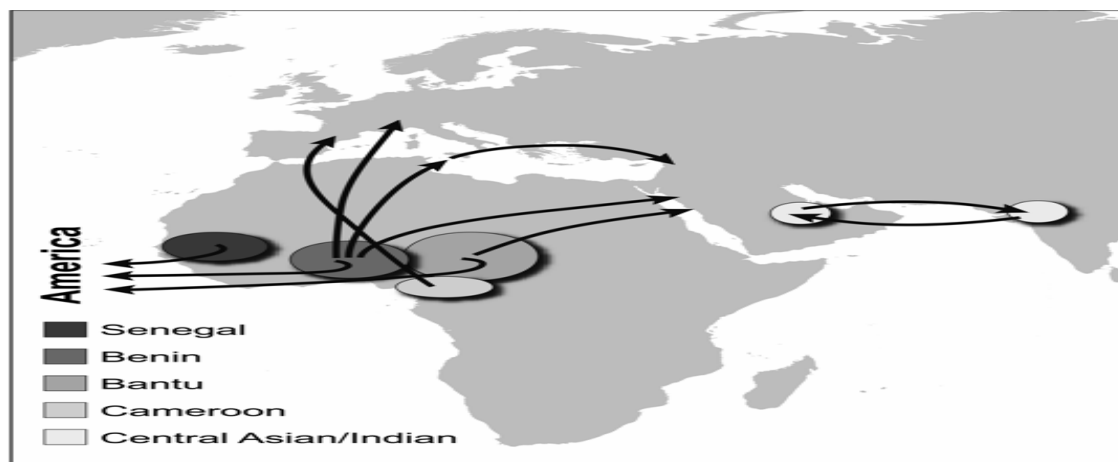
<< March of Dimes: Global Report 2006 >>



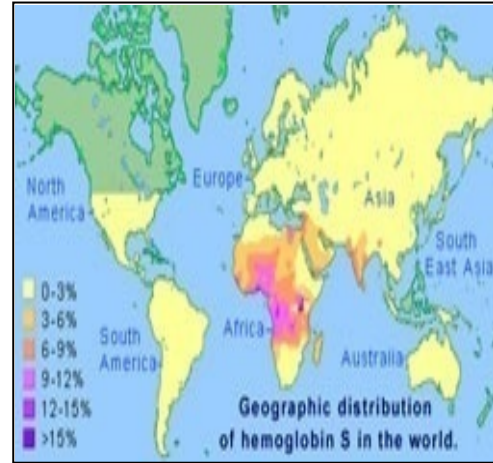
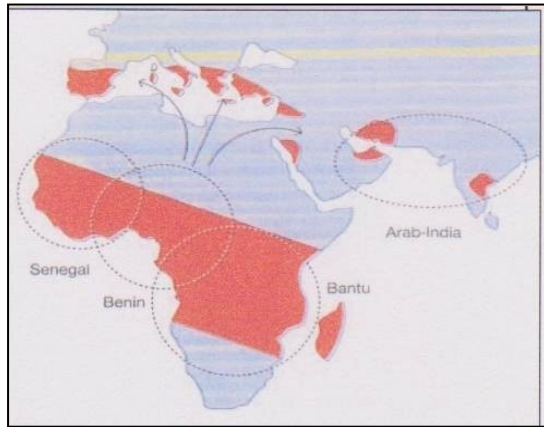
Επιδημιολογικοί παγκόσμιοι πίνακες

Χώρες	Ποσοστά	
Μεσόγειος	<b>8%</b>	<b>Ελλάδα-Πορτογαλία- Ιταλία-Ισπανία</b>
Βορειοανατολική Ασία	<b>3-8%</b>	<b>Κίνα-Μαλαισία- Μπαγκλαντές-Ινδία</b>
Ασία	<b>1%</b>	<b>Ταϊλάνδη</b>
Κύπρος	<b>16%</b>	
Βόρεια Ευρώπη	<b>0,1%</b>	
Αφρική	<b>0,9%</b>	

Παγκόσμιος χάρτης Δρεπανοκυτταρικής αναιμίας



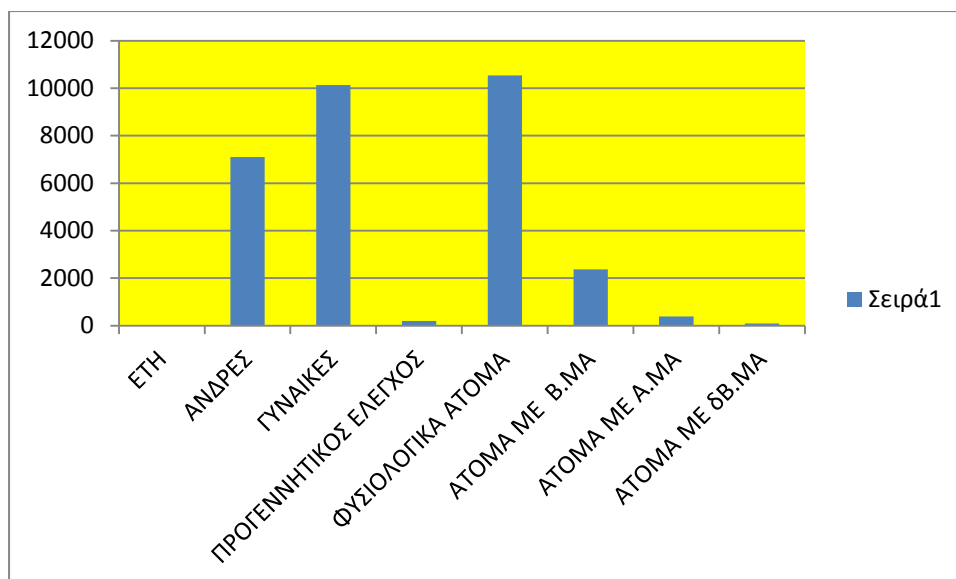
**Γεωγραφική κατανομή  
Δρεπανοκυτταρικών Συνδρόμων**



**Πίνακες Στατιστικών δεδομένων στην Ελλάδα  
Νοσοκομείο Τρικάλων .Μονάδα πρόληψης Μεσογειακής αναιμίας  
ΕΤΗ 1981-1994**

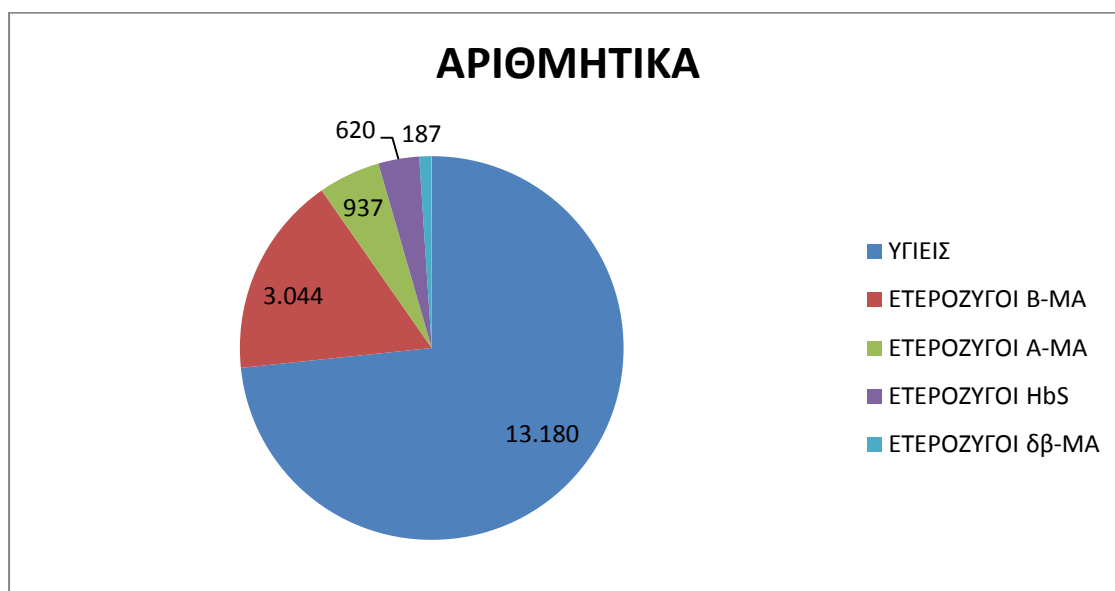
<b>ΕΤΗ</b>	<b>14</b>
<b>ΣΥΝΟΛΟ ΑΝΔΡΩΝ</b>	<b>7106</b>
<b>ΣΥΝΟΛΟ ΓΥΝΑΙΚΩΝ</b>	<b>10.031</b>
<b>ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΑ ΑΤΟΜΑ</b>	<b>17.137</b>
<b>ΑΤΟΜΑ ΜΕ ΣΚΟΠΟ ΤΟΝ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟ ΕΛΕΓΧΟ</b>	<b>194</b>
<b>ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΑΤΟΜΑ</b>	<b>10.541</b>
<b>ΑΤΟΜΑ ΜΕ Β-ΜΑ</b>	<b>2.365</b>
<b>ΑΤΟΜΑ ΜΕ Α-ΜΑ</b>	<b>390</b>
<b>ΑΤΟΜΑ ΜΕ ΔΒ-ΜΑ</b>	<b>94</b>





### Νοσοκομείο Καρδίτσας Μ.Π.Μ.Α κατά τα έτη 1991-2006

ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΑ ΑΤΟΜΑ	ΑΡΙΘΜΗΤΙΚΑ	ΠΟΣΟΤΙΚΑ%
ΥΓΙΕΙΣ	13.180	64,49
ΕΤΕΡΟΖΥΓΟΙ Β-ΜΑ	3.044	14,21
ΕΤΕΡΟΖΥΓΟΙ Α-ΜΑ	937	4,37
ΕΤΕΡΟΖΥΓΟΙ ΗbS	620	2,89
ΕΤΕΡΟΖΥΓΟΙ δβ-ΜΑ	187	0,87



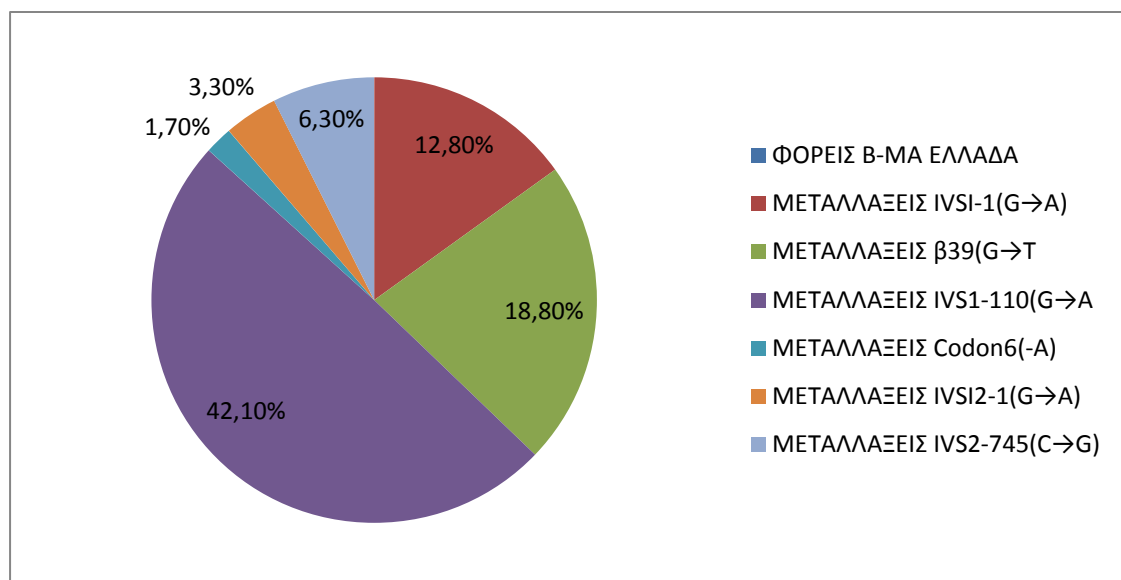
**ΑΡΙΘΜΗΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ :73% Υγιείς,17% Ετερόζυγοι β-ΜΑ**

**5%Ετερόζυγοι α-ΜΑ,ΗbS 3%,δβΜΑ 1%.**

ΦΟΡΕΙΣ Β-ΜΑ	ΕΛΛΑΔΑ	
-------------	--------	--



ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ	IVS1-1(G→A)	12,80%
	β39(G→T	18,80%
	IVS1-110(G→A	42,10%
	Codon6(-A)	1,70%
	IVS2-1(G→A)	3,30%
	IVS2-745(C→G)	6,30%



#### A.6 Συζήτηση-Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία έγινε προσέγγιση κατανόησης των αιμοσφαιρινοπαθειών και των συνδρόμων της στον Ελλαδικό χώρο με ταυτόχρονη πρόληψη και αντιμετώπιση των ετερόζυγων φορέων και ομόζυγων Μεσογειακών αναιμιών. Μετά από επιλογή δειγμάτων (34) σε ενήλικες φορείς κατά την διαδικασία του προγεννητικού ελέγχου στο Νομό Ρεθύμνου της Κρήτης ευρέθησαν ότι αποτελούν το 57% του συνόλου σε ένα πληθυσμό των 100 ατόμων με 18% ετερόζυγων φορέων, 20% φορείς της α-ΜΑ και 5% δβ-ΜΑ (Γράφημα αποτελεσμάτων).

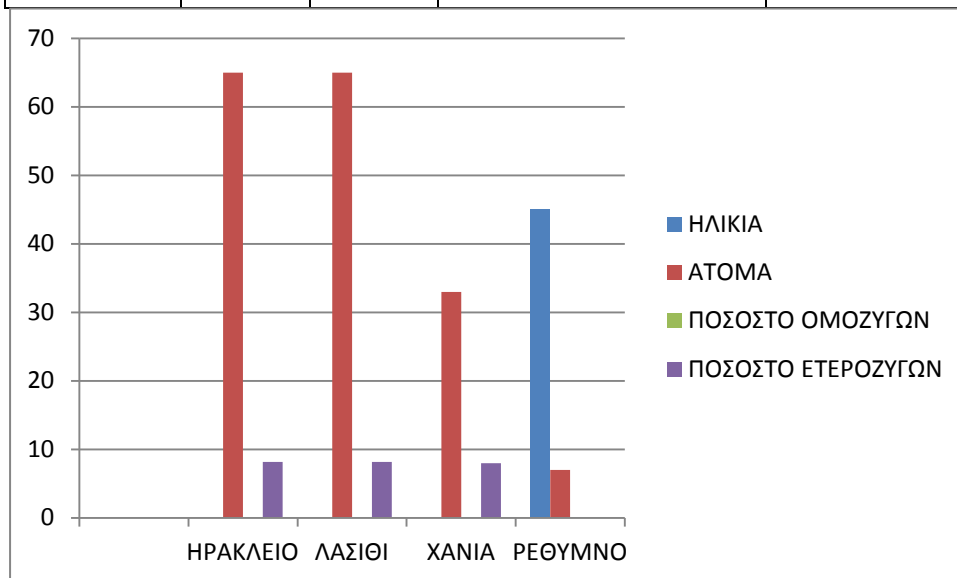
Αναλυτικότερα στην Κρήτη (κατά νομούς), σύμφωνα με παλαιότερες και καινούργιες έρευνες οδηγηθήκαμε στα ακόλουθα συμπεράσματα:

- Στους νομούς Ηρακλείου και Λασιθίου, πάσχουν από Μεσογειακή αναιμία 65 άτομα, από τα οποία το μικρότερο είναι 13 χρόνων και το μεγαλύτερο 62! Δηλαδή, ένα μικρό ποσοστό 0,017% του πληθυσμού πάσχει από ομόζυγη β θαλασσαιμία. Ενώ, γύρω στο 8,5% το γενικού πληθυσμού των 2 αυτών νομών είναι φορείς της ετερόζυγης β θαλασσαιμίας.

- Στο νομό Χανίων 33 άτομα εμφανίζουν το σύνδρομο ομόζυγης β θαλασσαιμίας, από τα οποία το μικρότερο είναι στην ηλικία των 7 ετών και το μεγαλύτερο 45 ετών! Συνεπώς, μόλις το 0.022% του πληθυσμού πάσχει από τη νόσο Cooley και επισκέπτεται το νοσοκομείο Χανίων για μεταγγίσεις. Ενώ, περίπου το 8% του νομού είναι φορείς της αναιμίας.
- Στο νομό του Ρεθύμνου, πάσχουν μόλις 7 άτομα, ηλικίας 45 και άνω.

Εν κατακλείδι, το συνολικό ποσοστό του πληθυσμού της Κρήτης (601.159 κάτοικοι σύμφωνα με την απογραφή 2001) που πάσχει από Μεσογειακή Αναιμία, ανέρχεται στο ποσοστό 0,018%.

ΝΟΜΟΙ	ΗΛΙΚΙΑ	ΑΤΟΜΑ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΟΜΟΖΥΓΩΝ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΕΤΕΡΟΖΥΓΩΝ
ΗΡΑΚΛΕΙΟ	13-62	65	0,017%	8,2%
ΛΑΣΙΘΙ	13-63	65	0,017%	8,2%
ΧΑΝΙΑ		33	0,022%	8%
ΡΕΘΥΜΝΟ	45,00	7		



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

### ΕΛΛΗΝΙΚΗ

Τίτλος της εργασίας: <<Μελέτη αιμοσφαιρινοπαθειών στον Ελλαδικό χώρο.Αντιστοιχία κατανομής του φαινομένου με ενημέρωση και πρόληψη>>

Της : Κυριτσάκα Ασπασίας,Τεχνολόγου Ιατρικών Εργαστηρίων Α.Μ: 226604

Υπο την επίβλεψη των:

Αλεπόρου-Μαρίνου Βασιλικη/ Τομέας Γενετικής & Βιοτεχνολογίας

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημικής & Μοριακής Γενετικής, Πανεπιστημίου Αθηνών.

Ισιδώρα Παπασιδέρη/Τομεας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κυτταρικής και Αναπτυξιακής Βιολογίας, Πανεπιστημίου Αθηνών.

Κόλλια Παναγούλα

Τομέας Γενετικής & Βιοτεχνολογίας

Επίκουρη Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου, Πανεπιστημίου Αθηνών

**Ημερομηνία : 13/11/14**

Οι αιμοσφαιρινοπάθειες είναι μια κατηγορία κληρονομικών, γενετικών νοσημάτων στα οποία εντάσσονται κυρίως η δρεπανοκυτταρική νόσος και οι θαλασσαιμίες που ευθύνονται για το σημαντικό ποσοστό γεννήσεων με γενετικά νοσήματα.

Με την παρούσα εργασία μελετήσαμε τους παραπάνω τύπους των αιμοσφαιρινοπαθειών, την κατανόηση της μοριακή της βάσης και των εμπλεκόμενων μηχανισμών στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων σφαιρίνης στα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια του ανθρώπου, την αποτελεσματική πρόληψη διάγνωση, θεραπεία των ατόμων με θαλασσαιμικά σύνδρομα, την εξάπλωση της, την γεωγραφική της κατανομή στον Ελλαδικό χώρο και ευρέως ανά την υφήλιο καθώς συνιστούν ένα παγκόσμιο πρόβλημα δημόσιας υγείας.

Οι θαλασσαιμίες διακρίνονται σε ακαι β ανάλογα με την αλυσίδα που δεν παράγεται, κληρονομούνται με αυτοσωματικό συνεπικρατούντα τρόπο και διακρίνονται σε ετερόζυγες ή ομόζυγες ανάλογα με το αν η βλάβη αφορά ένα ή περισσότερα από τα αλληλικά γονίδια που κωδικοποιούν τις αντίστοιχες αλυσίδες (2 για τις β- και 4- για τις α-αλυσίδες). Για την Ελλάδα, συχνότερες και σοβαρότερες είναι οι β-θαλασσαιμίες.

Η δρεπανοκυτταρική νόσος (SCD) περιλαμβάνει μια ποικιλία από παθολογικές καταστάσεις που προκύπτουν από την κληρονομικότητα του HbS γονίδιο είτε ως ομόζυγο είτε ως σύνθετο ετεροζυγωτό που αλληλεπιδρά με άλλα μη φυσιολογικά γονίδια αιμοσφαιρίνης.

Βάση των παραπάνω αιμοσφαιρινοπαθειών η αντιμετώπιση τόσο της  $\alpha$ -MA όσο και την ενδιάμεση BMA πρέπει να εξατομικεύεται, μια και οι ασθενείς παρουσιάζουν σημαντική κλινική ετερογένεια. Η αντιμετώπιση έχει δύο παράλληλους στόχους: την βελτίωση των παθογενετικών μηχανισμών, που θα οδηγήσει και σε πρόληψη μακροχρόνιων προβλημάτων και την αντιμετώπιση των επιπλοκών.

Οι μεταγγίσεις, η σπληνεκτομή, η αιμοσιδήρωση, η μεταμόσχευση μυελού καθώς και η χρήση φαρμάκων για τη διόρθωση της διαταραχής των αλύσων σφαιρίνης στη  $\beta$ -θαλασσαιμία, μέσω επανενεργοποίησης των γονιδίων εμβρυϊκής σφαιρίνης αποτελούν τις βασικές προσεγγίσεις στην θεραπεία των θαλασσαιμικών αρρώστων.

Σημαντικό ρόλο στην παρούσα εργασία αποτέλεσε ο τομέας της ψυχολογικής υποστήριξης. Αναγνωρίζεται, ότι η θαλασσαιμία, όπως και άλλα χρόνια νοσήματα, έχει σημαντικές ψυχολογικές επιπτώσεις. Ο τρόπος με τον οποίο η οικογένεια και ο ασθενής, συμβιβάζεται με την ασθένεια και την θεραπεία, έχει κριτική επίδραση στην επιβίωση των ασθενών. Χωρίς κατανόηση και αποδοχή της νόσου και των συνεπειών της, από πάσχοντες και οικογένεια, δεν θα μπορούσαν να αντιμετωπισθούν οι δυσκολίες από τις μακροχρόνιες μεταγγίσεις και την αποσιδήρωση, με επακόλουθη συνέπεια τον αυξημένο κίνδυνο λόγω επιπλοκών της νόσου και φτωχότερη επιβίωση. Ρόλος κλειδί για γιατρούς και νοσηλευτικό προσωπικό είναι να βοηθήσουν τους πάσχοντες και τις οικογένειες τους να αντιμετωπίσουν τις δυσκολίες της θεραπείας.

Η τήρηση της θεραπείας είναι ένας βασικό στόχος, αλλά η γενική αποδοχή της κατάστασής του από τον ασθενή είναι το μυστικό για φυσιολογική ανάπτυξη από την παιδική στην ενήλικη ζωή.

Ακολούθησε η εργαστηριακή έρευνα, οι μέθοδοι και ηλεκτροφορητικές -χρωματογραφικές τεχνικές ανίχνευσης παθολογικών αιμοσφαιρινοπαθειών με αυξημένη χημική συγγένεια σε Hb-O<sub>2</sub>.

Στην έγινε μελέτη 34 (άτομα) ασθενών από τον Νομό της Κρήτης σε επίπεδο προγεννητικού ελέγχου στο εργαστήριο Μοριακής Ιστοπαθολογίας του Πανεπιστημίου Ιατρικής Θεσσαλίας σε σχέση με τα αιματολογικά τους δεδομένα, το φύλο, την ηλικία και το ιστορικό τους.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας μπορούν να συνοψιστούν: Σε 18% ετερόζυγων φορέων B-MA, 20% φορείς της  $\alpha$ -MA και 5%  $\delta\beta$ -MA.

Λέξεις κλειδιά : Γενετικό νόσημα -Πρόληψη-Διάγνωση-Θεραπεία-Τεχνικές-Ποσοστά γεωγραφικής κατανομής.

## Abstract

Title: << Hemoglobinopathies study in Greece. Correspondence distribution phenomenon with information and prevention>>.

By: **Kyritsaka Aspasia** , Medical Laboratory Technologist. A.M: 226604

Supervisors:

**Aleporou-Marinou Vassiliki**.: Department of Genetics & Biotechnology

Associate Professor of Biochemistry & Molecular Genetics, University of Athens.

**Papassideri Issidora** : Associate Professor in Cell and Developmental Biology. National and Kapodistrian University of Athens (NKUA).

**Kollia Panagoula**: Assistant Professor, Department of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biology, Kapodistrian University of Athens.

Date:13/11/2014

The hemoglobinopathies are a group of inherited, genetic diseases that predominantly fall sickle cell disease and thalassemias responsible for a significant proportion of births with genetic disorders.

In this study we investigated the above types of hemoglobinopathies, understanding the molecular base and mechanisms involved in the regulation of globin gene expression in different developmental stages of man, the effective prevention diagnosis, treatment of persons with thalassemia syndromes, spreading the geographical distribution in Greece and widely used around the world as they are a global public health problem

The condition is characterized as  $\alpha$ - or  $\beta$ -thalassemia according to the affected chain, is inherited as an autosomal codominant character, and may be present in the heterozygous or homozygous form, according to whether the defect involves one or more allelic genes (2 for the  $\beta$ -chains and four for the  $\alpha$ -chains). The  $\beta$ -thalassemias are most frequent and constitute a major problem for Greece.

The term sickle cell disease (SCD) includes a variety of pathological conditions resulting from the inheritance of HbS gene either as homozygous or compound heterozygotes as interacting with other abnormal hemoglobin genes.

Basis of these hemoglobinopathies addressing both alpha-MA and intermediate BMA should be individualized, since patients have significant clinical heterogeneity. The deal has two parallel objectives: improving pathogenetic mechanisms that will lead to long-term prevention of problems and the management of complications.

The transfusions, the splenectomy, the hemosiderosis bone marrow transplantation and the use of drugs to correct the disorder of globin chains in beta-thalassemia through reactivation of fetal globin genes are essential in the treatment prosegiseis thalassemic sick.

An important role in this work is the area of psychological support. Universally recognized that thalassemia, like other chronic diseases, has important psychological implications. The way in which the family and the patient, consistent with the disease and its treatment, it has critical influence on the survival of patients. Without understanding and acceptance of the disease and its consequences, by patients and family, could not cope with the difficulties of long-term transfusion and chelation, with knock-on effect of the increased risk of complications due to the disease and poorer survival. Key Role for doctors and nurses is to help patients and their families to cope with the difficulties of treatment.

Adherence to treatment is a key goal, but the general acceptance of the status of the patient is the key to normal development from childhood to adulthood.

Followed by laboratory research, methods and techniques -chromatografikes electrophoretic detection of pathological hemoglobinopathies with increased affinity in Hb-O2.

Then was study 34 (people) patients from the province of Crete at prenatal Screening laboratory of Molecular Histopathology, University of Thessaly Medical compared with hematological their data, gender, age and history.

The results of this study can be summarized: In 18% of heterozygous carriers B-MA, 20% of a players a-MA and 5% db-MA.

**Keywords:** Genetic disease- Prevention -Diagnosis-Treatment-Technical-Rates geographical distribution.

## ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο ρόλος της εκπαίδευσης στις Φυσικές Επιστήμες δεν περιορίζεται μόνο στην απλή διδασκαλία των μαθητών της Ελληνικής Δευτεροβάθμιας Εκπαίδευσης αλλά επεκτείνεται και στα Πανεπιστημιακά Προγράμματα Σπουδών, συγκεκριμένα σε φοιτητές της Ιατρικής .

Η διδασκαλία της ιατρικής είναι η πλέον ενθουσιώδης δραστηριότητα .Ο συνδιασμός των δύο επαγγελμάτων της ιατρικής και της διδασκαλίας επιφέρει ασύγκριτη ευχαρίστηση σε αυτούς που επιλέγουν να εργαστούν σε αυτόν τον τομέα.

Η διδακτική προσέγγιση που θα ακολουθήσει αφορά νέους ιατρούς μετά την απόκτηση του του τίτλου σπουδών τους ,έχοντας ως πρόταιρη γνώση τον τομέα της Αιματολογίας και των Βιολογικών εννοιών στην διάγνωση των Αιμοσφαιρινοπαθειών .

Οι στόχοι για την έγκαιρη διάγνωση περιστατικών κλινικών περιπτώσεων πρέπει να βασίζονται :

- Στην πληροφορία
- Στα στοιχεία
- Δεδομένα.

Απαραίτητο διδακτικό εργαλείο αποτελεί η χρήση του ιατρικού φακέλου .Κατα τον Lawrence Weed, που εισήγαγε τον ιατρικό φάκελο κατά την δεκαετία του 1970,υποστήριξε ότι ο ιατρικός φάκελος πρέπει να χρησιμοποιείται για να βελτιώνει την σκέψη ,την ιατρική περίθαλψη ,την επικοινωνία και την διδασκαλία της ιατρικής.

Βάση των προηγούμενων θεωριών και εργαστηριακών ερευνών γι τις αιμοσφαιρινοπάθειες στον Ελλάδικό χώρο,ο δίδεται η παρακάτω περίπτωση μεσογειακού συνδρόμου σε νέους ειδικευόμενους ιατρούς και Βιολόγους :

**<< Περίπτωση ήπιου μεσογειακού συνδρόμου λόγω αλληλεπίδρασης Hb Adana με ετερόζυγη α+ μεσογειακή αναιμία >>**

Η α-μεσογειακή αναιμία αποτελεί μία κληρονομική διαταραχή των ερυθρών αιμοσφαιρίων, που χαρακτηρίζεται από ανεπαρκή ή πλήρη έλλειψη παραγωγής των α αλυσίδων της αιμοσφαιρίνης . Η κλινική ετερογένεια της νόσου είναι ευρεία και σχετίζεται με τον υποκείμενο γονότυπο . Ενώ η β-μεσογειακή αναιμία προκαλείται κυρίως από σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο της β-σφαιρίνης, η α-μεσογειακή αναιμία οφείλεται συνήθως σε ελλείψεις στο γονίδιο της α-σφαιρίνης . Ωστόσο, έχουν περιγραφεί αρκετές περιπτώσεις α-θαλασσαιμικού



φαινοτύπου, που δεν οφείλονται σε ελλείψεις του α-γονιδίου, εκ των οποίων κάποιες οφείλονται στην παρουσία μεταλλάξεων που οδηγούν στην παραγωγή ασταθών αιμοσφαιρινών .

Η παρούσα περίπτωση αφορά σε αγόρι ηλικίας 8 ετών, το οποίο παραπέμφθηκε από παιδίατρο στα Εξωτερικά Ιατρεία της Παιδιατρικής Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας για διερεύνηση αναιμίας, κατόπιν τυχαίου ευρήματος σε εργαστηριακό έλεγχο.

Από το οικογενειακό ιστορικό, πρόκειται για το τρίτο παιδί οικογένειας με φαινοτυπικά υγιείς γονείς και λοιπά τέκνα. Κατά την αντικειμενική εξέταση, επισκοπικά παρατηρήθηκε υπικτερική χροιά των επιπεφυκότων, ενώ δεν παρατηρήθηκαν σκελετικές διαταραχές.

Από την ακρόαση της καρδιάς ανευρέθηκε συστολικό φύσημα 1/6. Ο σπλήνας ήταν ψηλαφητός 4εκ. κάτω από το αριστερό πλευρικό τόξο, ενώ το ήπαρ ήταν μόλις 1εκ. ψηλαφητό κάτω από το δεξιό πλευρικό τόξο. Όσον αφορά στην αύξηση του ασθενούς ήταν εντός των φυσιολογικών ορίων για την ηλικία του. Από την εξέταση των λοιπών συστημάτων δεν ανευρέθηκαν παθολογικά ευρήματα.

Από τον εργαστηριακό έλεγχο βρέθηκαν: Hb: 9,78 g/dl, Hct: 30%, MCV: 71 fl, MCH: 23 pg, RDW: 18,6%, ΔΕΚ: 5,1% και φερριτίνη: 36,4 μg/l, ολική χολερυθρίνη: 1,5mg/dL, άμεση χολερυθρίνη: 0,3 mg/dL. Στο επίχρισμα περιφερικού αίματος παρατηρήθηκε ανισοκυττάρωση μικροκυττάρωση, υποχρωμία και ποικιλοκυττάρωση, χωρίς έγκλειστα σωματίδια.

Από τον απεικονιστικό έλεγχο των οστών δεν παρατηρήθηκαν οστικές παραμορφώσεις.

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα ποια θα ήταν οι εργαστηριακές κινήσεις ενός Βιολόγου εργαστήριου ;

1. Ανάλυση αιμοσφαιρίνης με γρήγη χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

**Απάντηση :** Παρουσία HbA, HbF (2.4%) και HbA2 (2.4%), χωρίς ίχνη HbBart'

2. Μοριακός έλεγχος DNA (pcr)

**Απάντηση :** διπλός ετεροζυγώτης α+ θαλασσαιμίας και της ασταθούς Hb Adana (-α3.7/αAdanaα).

3. Εργαστηριακός έλεγχος και μοριακή ανάλυση και των υπολοίπων μελών της οικογένειας

**Απάντηση:** Ο πατέρας και ο αδερφός του ασθενούς ήταν φορείς της έλλειψης 3.7kb (-α3.7) του α γονιδίου της σφαιρίνης, ενώ η μητέρα καθώς και οι δύο αδερφές ήταν φορείς της μετάλλαξης, η οποία ευθύνεται για την Hb Adana.

Γονότυπος	-α3,7/αAdanaα	αAdanaα/αα	-α37/αα	α3,7/αα	αAdanaα/αα	αAdanaα/αα
Ασθενής	Μητέρα	Πατέρας	Αδερφός	Αδερφή 1	Αδερφή 2	
Hb (g/dL)	9,78	13,0	15,6	12,7	13,4	12,4
Hct (%)	30	39,2	46,7	37,4	39,8	37,1
MCV (fL)	71,0	75,5	85,8	77,0	72,4	73,7

MCH (pg)	23,0	25,0	28,6	26,1	24,4	24,5
RDW (%)	18,6	13,8	14,6	12,4	13,6	13,3
HbA2 (%)	2,4	2,3	1,3	1,9	1,7	2,4
HbF (%)	2,4	<2	<2	<2	<2	<2
HbBart's (%)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
HbH (%)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Φερριτίνη (ng/ml)	36,4	6	32	22	24	32

### Ποια θα μπορούσε να είναι η έκβαση του Ασθενούς;

Απάντηση : ο ασθενής παρακολουθείται τακτικά στο Παιδοαιματολογικό Ιατρείο της Παιδιατρικής Κλινικής, διατηρεί σταθερή τιμή αιμοσφαιρίνης και έως τώρα, λόγω του ήπιου κλινικού φαινότυπου, δεν απαιτούνται μεταγγίσεις συμπυκνωμένων ερυθρών.

### Ποια τα χαρακτηριστικά τις συζήτησης που θα μπορούσαμε να ακολουθήσουμε μετά την προγενέστερη βιβλιογραφική γνώση;

Η α-μεσογειακή αναιμία χαρακτηρίζεται από ευρεία κλινική ετερογένεια, η οποία συσχετίζεται άμεσα με το γονότυπο της νόσου.

Κυρίως οφείλεται σε μεγάλα ελλείμματα του α-γονιδίου. Ωστόσο, σήμερα έχει αυξηθεί ο αριθμός των περιπτώσεων με φαινότυπο α- μεσογειακής αναιμίας, που οφείλονται σε σημειακές μεταλλάξεις ή μικρότερα γονιδιακά ελλείμματα . Στην πλειονότητά τους οι αιμοσφαιρίνες που προκύπτουν είναι ασταθείς. Οι ασταθείς αιμοσφαιρίνες, οι οποίες είναι δομικές παραλλαγές της φυσιολογικής HbA, χαρακτηρίζονται από διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες και οδηγούν συνήθως σε περιφερική αιμόλυση. Παρόλα αυτά, ισχυρά ασταθείς αιμοσφαιρίνες μπορεί να σχετίζονται τόσο με περιφερική αιμόλυση όσο και με μη αποδοτική ερυθροποίηση .

Όσον αφορά στην κλινική σοβαρότητα, οι ασταθείς αιμοσφαιρίνες σε ετερόζυγη μορφή δε συνοδεύονται συνήθως από κλινική συμπτωματολογία, ενώ είναι κλινικά εμφανείς όταν αλληλεπιδρούν με άλλα α-θαλασαιμικά γονίδια .

Η Hb Adana αποτελεί μία σπάνια, ισχυρά ασταθή αιμοσφαιρίνη, η οποία οφείλεται σε σημειακή μετάλλαξη στο κωδικόνιο 59 του γονιδίου της α-σφαιρίνης (GGC→GAC) και κατά συνέπεια αντικατάσταση ενός καταλοιπού γλυκίνης από ένα κατάλοιπο ασπαρτικού. Στην ετερόζυγη της μορφή η Hb Adana είναι ασυμπτωματική. Κλινικά εκδηλώνεται σε συνδυασμό με άλλη μετάλλαξη του α-γονιδίου, ενώ ο φαινότυπος εξαρτάται από το γονίδιο στο οποίο εδράζεται η μετάλλαξη (α1 ή α2 γονίδιο) και από το είδος της συνυπάρχουσας μετάλλαξης της α-αλυσίδας (α0 ή α+)

Έως σήμερα έχει περιγραφεί στη διεθνή βιβλιογραφία μόνο σε επτά οικογένειες μη Ελληνικής καταγωγής. Αρχικά είχε περιγραφεί σε τρεις οικογένειες Τούρκικης καταγωγής, στις οποίες η Hb Adana αλληλεπιδρούσε με την έλλειψη 20.5kb στο α-γονίδιο (-α20.5) (10).

Και στις τρεις περιπτώσεις, οι ασθενείς είχαν κλινικό φαινότυπο αιμοσφαιρινοπάθειας H, δύο εκ των οποίων ήταν μέτριας βαρύτητας, ενώ η Τρίτη χαρακτηριζόταν από σοβαρή κλινική εικόνα. Επιπρόσθετα έχουν αναφερθεί δύο περιπτώσεις εμβρυϊκού ύδρωπα, η πρώτη σε μία οικογένεια από τη Ν.Ασία με την ίδια γονιδιακή αλληλεπίδραση και η δεύτερη σε μία οικογένεια στις Φιλιππίνες, η οποία οφειλόταν σε συνύπαρξη της Hb Adana με μία άλλη έλλειψη α0 (11, 12).

Πρόσφατα, η Hb Adana περιγράφηκε σε δύο οικογένειες Αλβανικής καταγωγής σε αλληλεπίδραση με την έλλειψη 3.7kb του α-γονιδίου της σφαιρίνης (-α3.7) (9). Κλινικά και οι δύο ασθενείς χαρακτηρίζονταν από φαινότυπο ενδιάμεσης μεσογειακής αναιμίας ποικίλης, όμως, βαρύτητας. **Στην παρούσα περίπτωση, τα κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα ήταν συμβατά με πολύ ήπιο φαινότυπο θαλασσαιμικού συνδρόμου, καθώς η διάγνωση τέθηκε τυχαία, η αναιμία ήταν ήπια, δεν χρειάστηκαν μεταγγίσεις αίματος και η ανάπτυξη του ασθενούς δεν ήταν επηρεασμένη.**

Η συνύπαρξη ελλειμμάτων στο γονίδιο της α-σφαιρίνης με ασταθείς αιμοσφαιρίνες είναι εξαιρετικά σπάνια. Τέτοιου είδους αλληλεπίδραση μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα διαφορετικούς κλινικούς φαινότυπους, από ήπια αιμολυτική αναιμία έως αιμοσφαιρινοπάθεια H ή και ενδιάμεση μεσογειακή αναιμία, με παρουσία εκσεσημασμένης δυσερυθροποίησης. Λόγω της σπανιότητας των περιπτώσεων, η εμπειρία σχετικά με τη διαχείριση των ασθενών αυτών και την κλινική τους έκβαση παραμένει περιορισμένη.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

### **Ιστορικής Αναδρομής**

Beris PHh, Darbellay R, Entermann Ph: Prevention of  $\alpha$ -Thalassemia major and Hb Bart's Hydrops fetalis syndrome. *Semin in Hematology* 1995; 32: 244.

Caminopetros J: Recherches sur l'anemie, erythroblastique infantile, des peuples de la Mediterranee orientale. *Am Med* 1938; 43: 27, 104.

Cooley TB and Lee P: Series of cases of splenomegaly in children with anemia and peculiar bone changes. *Tr Am Pediatr Soc* 1925; 37: 29.

Cooley TB, Witwer ER and Lee OP: Anemia in children with splenomegaly and peculiar changes in the bones. Report of cases. *Am J Dis Chil* 192; 34: 347.

Dameshek W: Target Cell Anemia. Anerythroblastic type of Cooley's erythroblastic anemia. *Am J Med Sc* 1940; 200: 445.

Kanavakis E, Vrettou C, Palmer G, Tzetis M, Mastrominal M, Traeger - Synodinos J  
Preimplantation genetic diagnosis in 10 couples at risk for transmitting  $\alpha$ -thalassemia major: clinical experience including the initiation of six singleton pregnancies. *Prenat Diagn* 1999; 19: 1217.

Kanavakis E, Traeger – Synodinos J: Pre-implantation genetic diagnosis in clinical practise. *J Med Genet* 2002; 39: 6.

Καττάμις Α, Λαδής Β, Βερδουσί Η, Κελεκίς ΝΛ, Αλεξοπούλου Ε, Παπασοτιρίου Ι, Δρακάκι Κ, Καλουμένου Ι, Γαλανί Α, Καττάμις C. Iron chelation treatment with combined therapy with deferiprone and deferioxamine; a 12 month trial. *Blood Cells Mol. Dis.* 2006; 36: 21-25.

Kattamis C, Touliatos N, Haidas S, Matsaniotis N: Growth of children with thalassemia: effect of different transfusion regimens. *Arch Dis in Child* 1970; 45: 502.

Kattamis A, Kassou C, Berdousi H, Ladis V, Papatotiriou J, Kattamis C: Combined Therapy with Desferrioxamine and deferiprone in thalassemic patients: effect on urinary iron excretion. *Blood* 2003; 100: 120a.

Kattamis A, Kassou C, Ladis V, Berdousi H, Alexopoulou E, Kaloumenou I, Kelekis N, Kattamis C: A 12-months trial of a combined Regimen of Deferiprone and Deferoxamine in patients with Thalassemia. *Hematologica* 2003; 88: 1423.

Kattamis C, Metaxotou – Mavromati A, Karamboula A, Nasika E, Lehmann H: The clinical and hematological findings in children inheriting two types of thalassemia: high A2 type beta thalassemia and high F type of delta beta thalassemia. *Br J Haematol* 1973; 2: 29.

Kattamis C, Karamboula K, Metaxotou – Mavromati A, Ladis V, Constantopoulou A  
Prevalence of  $\alpha^0$  and  $\alpha^+$  thalassemia genes in Greek patients with homozygous, thalassemia. *Hemoglobin* 1979; 2: 29.

Kattamis C, Metaxotou - Mavromati A, Wood WG, Nash JR, Weatherall DJ. The

heterogeneity of normal HbA<sub>2</sub>, -thalassemia in Greece. *JBr J Haematol* 1979; 42:109.  
Kattamis C, Lagos P, Langona R: Chelation therapy and ferritin levels in patients with homozygous  $\alpha$ -thalassemia. In: *Progress in clinical and Biological Research*. Alan R-LISS Inc. New York 1979; Vol 34: 351.

Kattamis C: Screening for hemoglobinopathies. In Bickel H, Guthrie R, Hammarsen G (eds) *Neonatal screening for inborn errors of metabolism*. Springer Berlin, Heidelberg, 1980; pp 133-147.

Kattamis C, Metaxotou – Mavromati A, Ladis V, Tsiarta H, Laskari S, Kanavakis E: The clinical phenotype of  $\alpha$ , and  $\beta$ , Thalassemias in Greece. *Eur J Pediatr* 1982; 139: 135.

Kattamis C: Experience with desferrioxamine (Desferal) in thalassemic patients in Greece. In: *Hypertransfusion and iron chelation in thalassemia*. Ed. M. Aksoy, G. Birdwood, Huns Pub Berne, Stuttgart, Toronto 1985; 30.

### **Βασικές Πληροφορίες για τη Δομή και Σύνθεση της Αιμοσφαρίνης.**

Steinberg MH, Forget BJ, Higgs DR, Nagel RL eds. *Disorders of Hemoglobin*. Cambridge University Press, 2001.

Stamatoyannopoulos G, Grosveld F. Hemoglobin switching in Stamatoyannopoulos G., Majerus P., Perlmutter R.M.,

Varmus H. eds. *The Molecular Basis of Blood Diseases*. Philadelphia, WB Saunders. 2001.

Loukopoulos D. Haemoglobinopathies. *Encyclopedia of Life Sciences*, Mc Millan Publishers Ltd. Nature Publishing Group. 2002; 1-10.

Schechter AN. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood*. 2008; 112:3927-3938.

Beaumont C, Beris P, Beuzard Y, Brugnara C. *Disorders of erythropoiesis, erythrocytes and iron metabolism; a handbook*. (eds). A “European School of Hematology”, Paris 2009.

Thein SL, Rees D. Haemoglobin and the inherited disorders of globin synthesis. In: *Postgraduate Haematology*, VA Hoffbrand, D. Catovsky, EGD Tuddenham AR Green eds. Blackwell Publishing Ltd. 2011; 83-107

### **$\alpha$ -Μεσογειακή Αναιμία**

Higgs DR. Molecular mechanisms of  $\alpha$ -thalassemia. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL, Eds. *Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management*. Cambridge: Cambridge University Press. 2001; 405–430.

Waye JS, Chui DHK. The  $\alpha$ -globin gene cluster: genetics and disorders. *Clin Invest Med*. 2001; 24(2):103-109.

Chan V, Chan VWY, Tang M, et al. Molecular defects in Hb H hydrops fetalis. *Br J Haematol*. 1997; 96(2):224–228.

Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bull World Health Organ*. 2001; 79(8):704-712.

Anagnostou A, Tassiopoulou A, Rombos J, et al. Alpha-Thalassemia in Greece; carrier identification and frequency. *Thalassemia Today. The Mediterranean experience*. Ed. Sirchia G, Zanella A. 1987; p 337.

Higgs DR.  $\alpha$ -Thalassemia. *Bailliere's Clinical Hematology*. 1993; 6(1):117.

Καναβάκης Ε. Συχνότητα της  $\alpha$ -Μεσογειακής αναιμίας στον Ελληνικό Πληθυσμό. Διατριβή επί Υφηγεσία. 1984.

Kanavakis E, Tzotzos S, Liapaki A, et al. Frequency of  $\alpha$ -Thalassemia in Greece. *Am J Hematol*. 1986; 22:225.

Καράμπαμπα Φ. Δομική, παθοφυσιολογική και γενετική μελέτη των συνδρόμων της  $\alpha$ -Μεσογειακής αναιμίας στον Ελληνικό πληθυσμό. Διδακτορική διατριβή. 2000.

### **Μοριακή βάση της $\alpha$ και $\beta$ -Μεσογειακής Αναιμίας**

Weatherall DJ. Thalassaemia: the long road from bedside to genome. *Nat Rev Genet*. 2004; 5:625-631.

Sgourou A, Routledge S, Antoniou M, Papachatzopoulou A, Psiouri L, Athanassiadou A. Thalassaemia mutations within the 5'UTR of the human beta-globin gene disrupt transcription. *Br J Haematol*. 2004; 124:828-35.

Goh SH, Lee YT, Bhanu NV, et al. A newly discovered human alpha-globin gene. *Blood*. 2005 15; 106:1466-1472.

Bernini LF, Hartevelde CL. Alpha thalassaemia. *Baillieres Clin Haematol*. 1998; 11:53-90.

Higgs DR. Gene regulation in hematopoiesis: new lessons from thalassaemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*. 2004;1-13.

Tufarelli C, Stanley JA, Garrick D, et al. Transcription of antisense RNA leading to gene silencing and methylation as a novel cause of human genetic disease. *Nat Genet*. 2003;34:157-65.

Whitelaw E, Proudfoot NJ. Alpha-thalassaemia caused by a poly(A) site mutation reveals that transcriptional termination is linked to 3' end processing in the human alpha 2 globin gene. *EMBO J*. 1986; 5:2915-22.

Chui DHK, Fucharoen S, Chan V. Haemoglobin H disease: not necessarily a benign disorder. *Blood*. 2003; 101:791-800.

Kanavakis E, Papassotiriou I, Karagiorga M, et al. Phenotypic and molecular diversity of haemoglobin H disease: a Greek experience. *Brit J Haematol*. 2000; 111:915-923.

Traeger-Synodinos J, Papassotiriou I, Metaxotou-Mavrommati A, Vrettou C, Stamoulakatou A, Kanavakis E. Distinct phenotypic expression associated with a new hyperunstable alpha globin variant (Hb Heraklion,  $\alpha 1\text{cd}37(\text{C}2)\text{Pro}\rightarrow 0$ ): comparison to other  $\alpha$ -thalassaemic haemoglobinopathies. *Blood Cells Mol Dis.* 2000; 26:276-284.

Arnon S, Tamary H, Dgany O, et al. Hydrops fetalis associated with homozygosity for haemoglobin Taybe (alpha 38/39 THR deletion) in newborn triplets. *Am J Hematol.* 2004; 76:263-266.

Lorey F, Charoenkwan P, Witkowska HE, et al. Hb H hydrops foetalis syndrome: a case report and review of literature. *Brit J Haematol.* 2001; 115:72-78.

Traeger-Synodinos J, Douna V, Papassotiriou I, et al. Variable and often Severe Phenotypic Expression in Patients with the  $\alpha$ -thalassaemic Variant HbAgrinio ( $\alpha 29$  (B10) Leu $\rightarrow$ Pro( $\alpha 2$ )). *Hemoglobin.* 2010; 34:430–438.

Douna V, Liapi D, Kampourakis D, et al. First observation of Hb Taybe [codons 38/39 (-ACC) Thr $\rightarrow$  0 ( $\alpha 1$ )] in Greece: clinical and hematological findings in patients with co-inherited  $\alpha$ -thalassaemia mutations. *Hemoglobin.* 2008; 32:371–378;

Douna V, Papassotiriou I, Garoufi A, et al. A rare thalassaemic syndrome caused by interaction of Hb Adana [ $\alpha 59$ (E8)GlyAsp] with an  $\alpha$ -thalassaemia deletion: clinical aspects in two cases. *Hemoglobin.* 2008; 32:361–369.

Gibbons RJ, Higgs DR. Molecular-clinical spectrum of the ATR-X syndrome. *Am J Med Genet.* 2000; 97:204-212.

Steensma DP, Higgs DR, Fisher CA, Gibbons RJ. Acquired somatic ATRX mutations in myelodysplastic syndrome associated with alpha thalassaemia (ATMDS) convey a more severe hematologic phenotype than germline ATRX mutations. *Blood.* 2004; 103:2019-2026.

Anagnou NP, Ley TJ, Chesbro B, et al. Acquired alpha-thalassaemia in preleukemia is due to decreased expression of all four alpha-globin genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983; 80:6051-6055.

Forget BG. De novo and acquired forms of alpha thalassaemia. *Curr Hematol Rep.* 2006; 5:11-4.

De Gobbi M, Viprakasit V, Hughes JR, et al. A regulatory SNP causes a human genetic disease by creating a new transcriptional promoter, *Science.* 2006; 312:1215-1217.

Chui DHK, Waye JS. Hydrops fetalis caused by  $\alpha$ -thalassaemia: an emerging health care problem. *Blood.* 1998; 91:2213-2222.

Maragoudaki E, Vrettou C, Kanavakis E, et al. Molecular, haematological and clinical studies of a silent beta-gene C $\rightarrow$ G mutation at 6 bp 3' to the termination codon (+1480C $\rightarrow$ G) in twelve Greek families. *Brit J Haematol.* 1998;103:45-51.



Romao L, Inacio A, Santos S, et al. Nonsense mutations in the human beta-globin gene lead to unexpected levels of cytoplasmic mRNA accumulation. *Blood*. 2000; 96:2895-2901.

Rooks H, Bergounioux J, Game L, et al. Heterogeneity of the epsilon gamma delta beta-thalassaemias: characterization of three novel English deletions. *Br J Haematol*. 2005; 128:722-729.

Kattamis C, Hu H, Cheng G, et al. Molecular characterization of beta-thalassaemia in 174 Greek patients with thalassaemia major. *Br J Haematol*. 1990; 74:342-6.

Kanavakis E, Traeger-Synodinos J, Vrettou C, Maragoudaki E, Tzetis M, Kattamis C. Prenatal diagnosis of the thalassaemia syndromes by rapid DNA analytical methods. *Mol Hum Reprod*. 1997; 3:523-8.

Boussiou M, Karababa P, Sinopoulou K, Tsaftaridis P, Plata E, Loutradi-Anagnostou A. The molecular heterogeneity of beta-thalassaemia in Greece. *Blood Cells Mol Dis*. 2008;40:317-319.

Thein SL. Is it dominantly inherited beta thalassaemia or just a beta-chain variant that is highly unstable? *Br J Haematol*. 1999; 107:12-21.

Yu C, Niakan KK, Matsushita M, Stamatoyannopoulos G, Orkin SH, Raskind WH. X-linked thrombocytopenia with thalassaemia from a mutation in the amino finger of GATA-1 affecting DNA binding rather than FOG-1 interaction. *Blood*. 2002; 100:2040-2045.

Viprakasit V, Gibbons RJ, Broughton BC, et al. Mutations in the general transcription factor TFIIF result in beta-thalassaemia in individuals with trichothiodystrophy. *Hum Mol Genet*. 2001; 10:2797-2802.

Badens C, Mattei MG, Imbert AM, et al. A novel mechanism for thalassaemia intermedia. *Lancet*. 2002, 12:132-3.

Galanello R, Perseu L, Perra C, et al. Somatic deletion of the normal beta-globin gene leading to thalassaemia intermedia in heterozygous beta-thalassaemic patients. *Br J Haematol*. 2004; 12:604-606.

Kimberland ML, Divoky V, Prchal J, Schwahn U, Berger W, Kazazian HH Jr. Full-length human L1 insertions retain the capacity for high frequency retrotransposition in cultured cells. *Hum Mol Genet*. 1999; 8:1557-1560.

### **Ενδιάμεση β-Μεσογειική Αναιμία**

Sturgeon P, Itano H, Bergren W. Genetic and biochemical studies of intermediate types of Cooley's anaemia. *Br J Haematol*. 1955; 1:264-277.

Camaschella C, Cappellini MD. Thalassaemia intermedia. *Haematologica*. 1995; 80:58-68.

Taher A, Isma'eel H, Cappellini MD. Thalassaemia intermedia: revisited. *Blood Cells Mol Dis*. 2006; 37:12-20.

Weatherall D. Thalassaemia: The long road from bedside to genome. *Nat Rev Gene*. 2004; 5:625-31.

Galanello R, Cao A. Relationship between genotype and phenotype. *Thalassaemia intermedia*. *Ann NY Acad Sci*.1998; 850:325-333.

Taher AT, Musallam KM, Cappellini MD, Weatherall DJ. Optimal management of  $\beta$  thalassaemia intermedia. *Br J Haematol*. 2011; 152:512-523.

Camaschella C, Mazza U, Roetto A, et al. Genetic interactions in thalassaemia intermedia: analysis of beta-mutations, alpha-genotype, gamma-promoters and beta-LCR hypersensitive sites 2 and 4 in Italian patients. *Am J Hematol*. 1995; 48:82-87.

Καναβάκης Ε. Παθογένεια και μοριακή διαταραχή της ενδιάμεσης  $\beta$ -μεσογειακής αναιμίας. *Haema*. 1999; S:88-91.

Ratip S, Petrou M, Old J, Wonke B, Porter J, Modell B. Relationship between the severity of beta-thalassaemia syndromes and the number of alleviating mutations. *Eur J Haematol*. 1997; 58:14-21.

Kanavakis E, Traeger-Synodinos J, Lafionatis S, et al. Arare example that coinherita nce of a severe form of betathalassaemia and alpha-thalassaemia interact in a “synergistic manner” to balance the phenotype of classic thalassaemic syndromes. *Blood Cells Mol Dis*. 2004; 32:319-324.

Adams JG 3rd, Coleman MB. Structural hemoglobin variants that produce the phenotype of thalassaemia. *Semin Hematol*. 1990; 27:229-238.

Maragoudaki E, Kanavakis E, Traeger-Synodinos J et al. Molecular, haematological and clinical studies of the -101C --> T substitution of the beta-globin gene promoter in 25 beta-thalassaemia intermedia patients and 45 heterozygotes. *Br J Haematol*. 1999; 107:699-706.

Μαραγκουδάκη Ελένη. Μελέτη της γενετικής διαταραχής στους σιωπηρούς φορείς  $\beta$ -Μεσογειακής αναιμίας στον ελληνικό πληθυσμό. Διδακτορική διατριβή Πανεπιστημίου Αθηνών, 2002.

Traeger-Synodinos J, Kanavakis E, Vrettou C, et al. The triplicated alpha-globin gene locus in beta-thalassaemia heterozygotes: clinical, haematological, biosynthetic and molecular studies. *Br J Haematol*. 1996; 95:467-471.

Sollaino M, Paglietti M, Perseu L, Giagu N, Loi D, Galanello Association of  $\alpha$  globin gene quadruplication and heterozygous  $\beta$  thalassaemia in patients with thalassaemia intermedia. *Haematologica*. 2009; 94:1445-1448.

Camaschella C, Kattamis AC, Petroni D, et al. Different hematological phenotypes caused by the interaction of triplicated alpha-globin genes and heterozygous betathalassaemia. *Am J Hematol*. 1997; 55:83-88.

Badens C, Mattei M, Imbert A, et al. A novel mechanism for thalassemia intermedia. *Lancet*. 2002; 359:132-133.

Maragoudaki E, Vrettou C, Kanavakis E, Traeger-Synodinos J, Metaxotou-Mavrommati A, Kattamis C. Molecular, haematological and clinical studies of a silent beta-gene C-->G mutation at 6 bp 3' to the termination codon (+1480 C-->G) in twelve Greek families. *Br J Haematol*. 1998; 103:45-51.

Efremov G. Dominantly inherited beta-thalassemia. *Hemoglobin*. 2007; 31:193-207.

Wajcman H, Trager-Synodinos J, Papasotiriou I, et al. Unstable and thalassemic alpha chain hemoglobin variants: a cause of HbH disease and thalassemia intermedia. *Hemoglobin*. 2008; 32:327-349.

Lal A, Goldrich ML, Haines DA, et al. Heterogeneity of hemoglobin H disease in childhood. *N Engl J Med*. 2011; 364:710-718.

Traeger-Synodinos J, Douna V, Papasotiriou I, et al. Variable and often severe phenotypic expression in patients with the  $\alpha$ -thalassemic variant Hb Agrinio [ $\alpha$ 29(B10)Leu $\rightarrow$ Pro( $\alpha$ 2)]. *Hemoglobin*. 2010; 34:430-438.

Traeger-Synodinos J, Papasotiriou I, Metaxotou-Mavrommati A, Vrettou C, Stamoulakatou A, Kanavakis E. Distinct phenotypic expression associated with a new hyperunstable alpha globin variant (Hb heraklion,  $\alpha$ 1cd37(C2)Pro>0): comparison to other alpha-thalassemic hemoglobinopathies. *Blood Cells Mol Dis*. 2000; 26:276-284.

Verma I, Kleanthous M, Saxena R, et al. Multicenter study of the molecular basis of thalassemia intermedia in different ethnic populations. *Hemoglobin*. 2007; 31:439-452. Thein S. Genetic modifiers of beta-thalassemia. *Haematologica*. 2005; 90:649-660.

Ho P, Hall G, Luo L, Weatherall D, Thein S. Beta-thalassemia intermedia: is it possible consistently to predict phenotype from genotype? *Br J Haematol* 1998; 100:70-78.

Borgna-Pignatti C, Marsella M, Zanforlin N. The natural history of thalassemia intermedia. *Ann NY Acad Sci*. 2010; 1202:214-220.

Rassi F, Cappellini MD, Inati A, Taher a. Beta-thalassemia intermedia: an overview. *Pediatr Ann*. 2008; 37:322-328.

Cappellini MD, Musallam K, Taher A. Insight onto the pathophysiology and clinical complications of thalassemia intermedia. *Hemoglobin*. 2009; 33(S1):145-159.

Sripichai O, Makarasara W, Munkongdee T, et al. A scoring system for the classification -of beta-thalassemia/HbE disease severity. *Am J Hematol*. 2008; 83:482-484.

Olivieri N. The beta-thalassemiias. *N Engl J Med*. 1999; 341:99-109.

Cappellini MD, Cerino M, Marreli S, et al. Thalassemia intermedia: clinical aspects and management. *Haematologica*. 2001; 86:194-196.

Borgna-Pignatti, C. Modern treatment of thalassaemia intermedia. *Br J Haematol.* 2007; 138: 291–304.

Taher A, Isma'eel H, Mehio G, et al. Prevalence of thromboembolic events among 8,860 patients with thalassaemia major and intermedia in the Mediterranean area and Iran. *252 A. Κατάμης*

*Κατάμης*

### **Δρεπανοκυτταρική Αναιμία**

Μαθαίνω για την Δρεπανοκυτταρική Αναιμία-Αιμοσφαιρίνη S(HbS). Διεθνής Ομοσπονδία Θαλασσαιμίας.

<<Εκτίμηση της ποιότητας ζωής στη δρεπανοκυτταρική νόσο>>2012Σ. Καπετανούδη

### **Βιβλιογραφία Διδακτικής Προσέγγισης**

Η Διδασκαλία της Ιατρικής :J.WILLIS HURST .MD 1999

1. Higgs DR, Weatherall DJ. The alpha thalassaemias. *Cell Mol Life Sci.* 2009 Apr;66(7):1154-62.
2. Loukopoulos D. Thalassaemia: genotypes and phenotypes. *Ann Hematol.* 1991 Apr;62(4):85-94.
3. Wajcman H, Traeger-Synodinos J, Papassotiriou I, Giordano PC, Harteveld CL, Baudin-Creuzat V, et al. Unstable and thalassaemic alpha chain hemoglobin variants: a cause of Hb H disease and thalassaemia intermedia. *Hemoglobin.* 2008;32(4):327-49.
4. Traeger-Synodinos J, Kanavakis E, Tzetzis M, Kattamis A, Kattamis C. Characterization of nondeletion alpha-thalassaemia mutations in the Greek population. *Am J Hematol.* 1993 Nov;44(3):162-7.
5. Kanavakis E, Papassotiriou I, Karagiorga M, Vrettou C, Metaxotou-Mavrommati A, Stamoulakatou A, et al. Phenotypic and molecular diversity of haemoglobin H disease: a Greek experience. *Br J Haematol.* 2000 Dec;111(3):915-23.
6. Higgs D.  $\alpha$  Thalassaemia. In: Higgs D, Weatherall D, editors. *The Haemoglobinopathies Bailliere's Clinical Haematology.* London: W.B. Saunders Company; 1993. p. 117-50.
7. Williamson D. The unstable haemoglobins. *Blood Rev.* 1993 Sep;7(3):146-63.
8. Adams JG, 3rd, Coleman MB. Structural hemoglobin variants that produce the phenotype of thalassaemia. *Semin Hematol.* 1990 Jul;27(3):229-38.
9. Douna V, Papassotiriou I, Garoufi A, Georgouli E, Ladis V, Stamoulakatou A, et al. A rare thalassaemic syndrome caused by interaction of Hb Adana [ $\alpha$ -59(E8)Gly $\rightarrow$ Asp] with an  $\alpha$ -thalassaemia deletion: clinical aspects in two cases. *Hemoglobin.* 2008;32(4):361-9.

ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΗΠΙΟΥ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΟΥ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ ΛΟΓΩ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΗΒ ADANA ...

10. Curuk MA, Dimovski AJ, Baysal E, Gu LH, Kutlar F, Molchanova TP, et al. Hb Adana or alpha 2(59)(E8)Gly-->Asp beta 2, a severely unstable alpha 1-globin variant, observed in combination with the - (alpha)20.5 Kb alpha-thal-1 deletion in two Turkish patients. *Am J Hematol.* 1993 Dec;44(4):270-5.
11. Chan V, Chan VW, Tang M, Lau K, Todd D, Chan TK. Molecular defects in Hb H hydrops fetalis. *Br J Haematol.* 1997 Feb;96(2):224-8.
12. Henderson S, Pitman M, J JM, Molyneux A, Styles D, Old J. Prenatal diagnosis of HbH hydrops fetalis due to the compound heterozygosity for the Filipino  $\alpha^0$  thalassaemia deletion and the Hb Adana,  $\alpha^2$  codon 59 GGC @GAC. *British Journal of Haematology.* 2007;2007(147 (suppl 1)):72