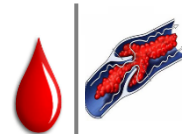




ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ



Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

ΘΡΟΜΒΩΣΗ – ΑΙΜΟΡΡΑΓΙΑ – ΙΑΤΡΙΚΗ ΤΩΝ
ΜΕΤΑΤΤΙΣΕΩΝ

Διπλωματική Εργασία
«Θαλασσαιμία και Θρόμβωση»

Όνομα: ΣΤΑΥΡΟΥΛΑ Δ. ΚΥΡΙΑΚΑΚΗ

Αριθμός Μητρώου: 20150652

Επιβλέπουσα: ΠΑΠΑΔΑΚΗ ΕΛΕΝΗ

ΑΘΗΝΑ

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2018

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

1. ΠΑΠΑΔΑΚΗ ΕΛΕΝΗ
2. ΤΡΑΥΛΟΥ ΩΡΑΙΑΝΘΗ
3. ΠΟΛΙΤΟΥ ΜΑΡΙΑΝΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «ΑΙΜΟΣΤΑΣΗ – ΑΙΜΟΡΡΑΓΙΑ – ΙΑΤΡΙΚΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΓΙΣΕΩΝ» του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και πραγματοποιήθηκε υπό την επίβλεψη της κ. Ελένης Παπαδάκη, Καθηγήτριας Αιματολογίας του τμήματος της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κ. Ελένη Παπαδάκη για την αποδοχή της επίβλεψης της διπλωματικής εργασίας, όπως επίσης και για την καθοδήγησή της στην εκπόνηση αυτής.

Επίσης θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην κ. Αικ/νη Σφυριδάκη, Αιματολόγο, Συντονίστρια Δ/ντρια του 4ου Κέντρου Αίματος, για την πολύτιμη βοήθεια της στο σχεδιασμό της μελέτης, στη διενέργεια του εργαστηριακού ελέγχου, στην αξιολόγηση και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Καταλυτική υπήρξε επίσης η συμβολή της κ. Αικατερίνης Πυροβολάκη, Αιματολόγου, Επικ. Επιμελήτριας Βενιζελείου - Πανανείου Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου στην ολοκλήρωση της μελέτης αυτής. Την ευχαριστώ για την υποδειγματική συνεργασία και την πολύτιμη καθοδήγηση.

Ειλικρινείς και εκ βαθέων ευχαριστίες οφείλω στους συναδέλφους της Μονάδας Μεσογειακής Αναιμίας του Βενιζελείου - Πανανείου Νοσοκομείου, κ. Ευάγγελο Κληρονόμο, Παθολόγο, Δ/ντη και κ. Στυλιανή Μαραγκάκη, Παθολόγο, Επιμ. Α, όπως επίσης και τις νοσηλεύτριες της Μονάδας για την πολύτιμη, συνεχή, αδιάκοπη βοήθεια τους που υπήρξε καταλυτική για την ολοκλήρωση της εργασίας αυτής.

Στη Νεκταρία

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι θαλασσαιμίες είναι μια ομάδα κληρονομικών διαταραχών της σύνθεσης της αιμοσφαιρίνης και αποτελούν τη πιο συχνή μονογονιδιακή νόσο παγκοσμίως, χαρακτηρίζονται δε, από μείωση ή και πλήρη αναστολή σύνθεσης των φυσιολογικών αλυσίδων σφαιρίνης.

Αν και το προσδόκιμο ζωής των ασθενών με θαλασσαιμία έχει βελτιωθεί αισθητά τα τελευταία χρόνια, κυρίως εξαιτίας της βελτίωσης των προγραμμάτων τακτικών μεταγγίσεων, καθώς και της βέλτιστης παρακολούθησης και διαχείρισης της υπερφόρτωσης σιδήρου, οι ασθενείς εξακολουθούν να εκδηλώνουν πολλές επιπλοκές αυτής της συγγενούς νόσου.

Θρομβοεμβολικά επεισόδια, τόσο φλεβικά όσο και αρτηριακά, συμπεριλαμβανομένων των σπάνιων θρομβωτικών επεισοδίων στον εγκέφαλο, έχουν περιγραφεί με υψηλότερη εμφάνιση στην ενδιάμεση θαλασσαιμία από ότι στη μείζονα θαλασσαιμία.

Η υψηλή συχνότητα εμφάνισης θρομβοεμβολικών επεισοδίων οδήγησε στην ταυτοποίηση μιας υπερπηκτικής κατάστασης. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν σημαντικές αιμοστατικές διαταραχές, ακόμη και από πολύ νεαρή ηλικία, σε ασθενείς με μείζονα β-θαλασσαιμία και ενδιάμεση β-θαλασσαιμία, όπως επίσης και σε ασθενείς με α-θαλασσαιμία (αιμοσφαιρινοπάθεια Η).

Στην παρούσα εργασία εξετάζουμε τους μοριακούς και κυτταρικούς μηχανισμούς που οδηγούν σε υπερπηκτικότητα στη θαλασσαιμία.

ABSTRACT

The thalassemias, a group of inherited disorders of hemoglobin synthesis, are the most common monogenetic disease worldwide caused by defective globin synthesis resulting in decreased quantity of globin chains.

Although the life expectancy of thalassemia patients has markedly improved over the last few years (amelioration of transfusion regimens as well as improvement in monitoring and management of iron overload), patients still suffer from many complications of this congenital disease.

Both venous and arterial events, including rare thrombotic episodes in the brain, have been described with a higher incidence of thalassemia than thalassemia major patients.

The presence of a high incidence of thromboembolic events has led to the identification of a hypercoagulable state in these patients. In particular, significant hemostatic anomalies, even from a very young age, were observed in patients with major β -thalassemia and intermediate β -thalassemia and also in patients with α -thalassemia (hemoglobin H disease).

In this paper, we review the molecular and cellular mechanisms leading to hypercoagulability in thalassemia.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ:

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTACT	6
ΠΡΩΤΟ ΜΕΡΟΣ.....	9
1.Αιμοσφαιρίνη.....	9
1.1 Σύνθεση αίμης.....	10
1.2 Σύνθεση αιμοσφαιρινικών αλυσίδων	11
1.3 Μορφές αιμοσφαιρίνης που απαντώνται στον άνθρωπο.....	14
ΔΕΥΤΕΡΟ ΜΕΡΟΣ.....	16
1. Θαλασσαιμία.....	16
1.1 Εισαγωγή.....	16
1.2 Γεωγραφική κατανομή θαλασσαιμιών	16
1.2.1 Η θαλασσαιμία στην Ελλάδα.....	18
1.3 Παθοφυσιολογία θαλασσαιμίας.....	18
1.4 Ταξινόμηση θαλασσαιμιών	19
2. β-θαλασσαιμία.....	20
2.1 Μοριακή βάση β-θαλασσαιμίας.....	20
2.2 Μοριακή ετερογένεια της β-θαλασσαιμίας στην Ελλάδα.....	22
2.3 Παθογένεια της β-θαλασσαιμίας.....	23
2.4 Κλινική ταξινόμηση β-θαλασσαιμίας.....	24
3. α-θαλασσαιμία.....	25

3.1 Μοριακή βάση α-θαλασσαιμίας.....	25
3.2 Μοριακή ετερογένεια α-θαλασσαιμίας στην Ελλάδα.....	26
3.3 Παθογένεια α-θαλασσαιμίας.....	27
3.4 Οι φαινότυποι της α-θαλασσαιμίας	27
ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ.....	29
A. Υπερπηκτικότητα στη θαλασσαιμία.....	29
B. Παθογένεια της υπερπηκτικότητας στη θαλασσαιμία.....	29
1. Παθολογικά ερυθροκύτταρα.....	30
1.1 Ερυθροκυτταρική μεμβράνη.....	30
1.2 Η ερυθροκυτταρική μεμβράνη στη θαλασσαιμία.....	33
2. Η συμβολή των αιμοπεταλίων στη θρομβοφιλική διάθεση.....	36
3. Ενεργοποίηση μονοκυττάρων – ουδετεροφίλων.....	37
4. Ενεργοποίηση ενδοθηλιακών κυττάρων.....	38
5. Κληρονομικοί παράγοντες θρομβοφιλίας – Ενεργοποίηση των παραγόντων πήξης.....	39
6. Σπληνεκτομή.....	42
7. Αιμόλυση – Διαταραχή στην ομοιοστασία του μονοξειδίου του αζώτου (NO)	42
8. Άλλοι παράγοντες που προάγουν τη θρόμβωση στους ασθενείς με θαλασσαιμία.....	43
C. Κλινική προδιάθεση για θρόμβωση – θρομβοεμβολικά επεισόδια στη θαλασσαιμία.....	44

ΜΕΡΟΣ ΤΕΤΑΡΤΟ – ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	52
1. Εισαγωγή.....	52
2. Σκοπός.....	52
3. Ασθενείς και μέθοδοι.....	53
4. Αποτελέσματα.....	54
5. Συμπεράσματα.....	58
 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	 60

ΠΡΩΤΟ ΜΕΡΟΣ

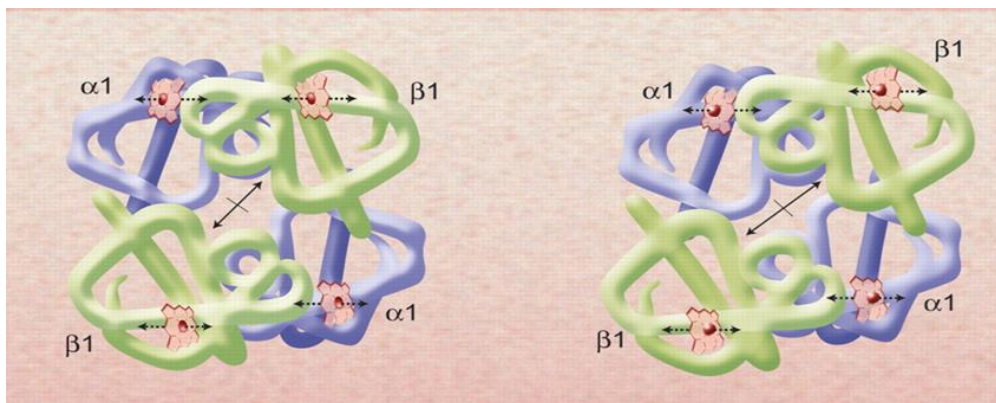
1. ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗ

Στα ανώτερα θηλαστικά και τον άνθρωπο η μεταφορά του οξυγόνου από τους πνεύμονες σε όλο το σώμα επιτυγχάνεται με την αιμοσφαιρίνη, η οποία εμπεριέχεται στα κυκλοφορούντα ερυθρά αιμοσφαίρια.

Η αιμοσφαιρίνη είναι μια εξειδικευμένη τετραμερής πρωτεΐνη με σφαιρικό σχήμα και μοριακό βάρος περίπου 64 kDa. Κάθε ερυθρό περιέχει περίπου 300×10^6 μόρια (30 pg) αιμοσφαιρίνης. Αποτελείται δε, από δύο ζεύγη όμοιων πολυπεπτιδικών αλυσίδων (πολυπεπτίδια 140 περίπου αμινοξέων), κάθε μία από τις οποίες εμπεριέχει από ένα μόριο αίμης ενώ έκκεντρα του μορίου της αποξυγονωμένης αιμοσφαιρίνης, μεταξύ των αλυσίδων $\beta 1$ και $\beta 2$ υπάρχει ένα μόριο του ενζύμου 2,3-DPG [1].

Η αλληλουχία των 140 περίπου αμινοξέων της κάθε αλυσίδας είναι αυστηρά καθορισμένη και αναλλοίωτη (πρωτοταγής δομή). Οι πεπτιδικοί δεσμοί και οι μοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων δίνουν σε πολλά τμήματα μορφή «α-έλικας» (δευτεροταγής δομή) και δημιουργία αναδιπλώσεων στο χώρο, έτσι που το μόριο έχει χαρακτηριστική στερεοδομή (τριτοταγής δομή). Η αλληλεπίδραση των 4 πολυπεπτιδικών αλυσίδων στον χώρο σχηματίζει το μόριο της σφαιρίνης (τεταρτοταγής δομή).

Η αίμη είναι απαραίτητη για τη μεταφορά οξυγόνου, ενώ οι πεπτιδικές αλυσίδες προστατεύουν την αίμη από οξείδωση.

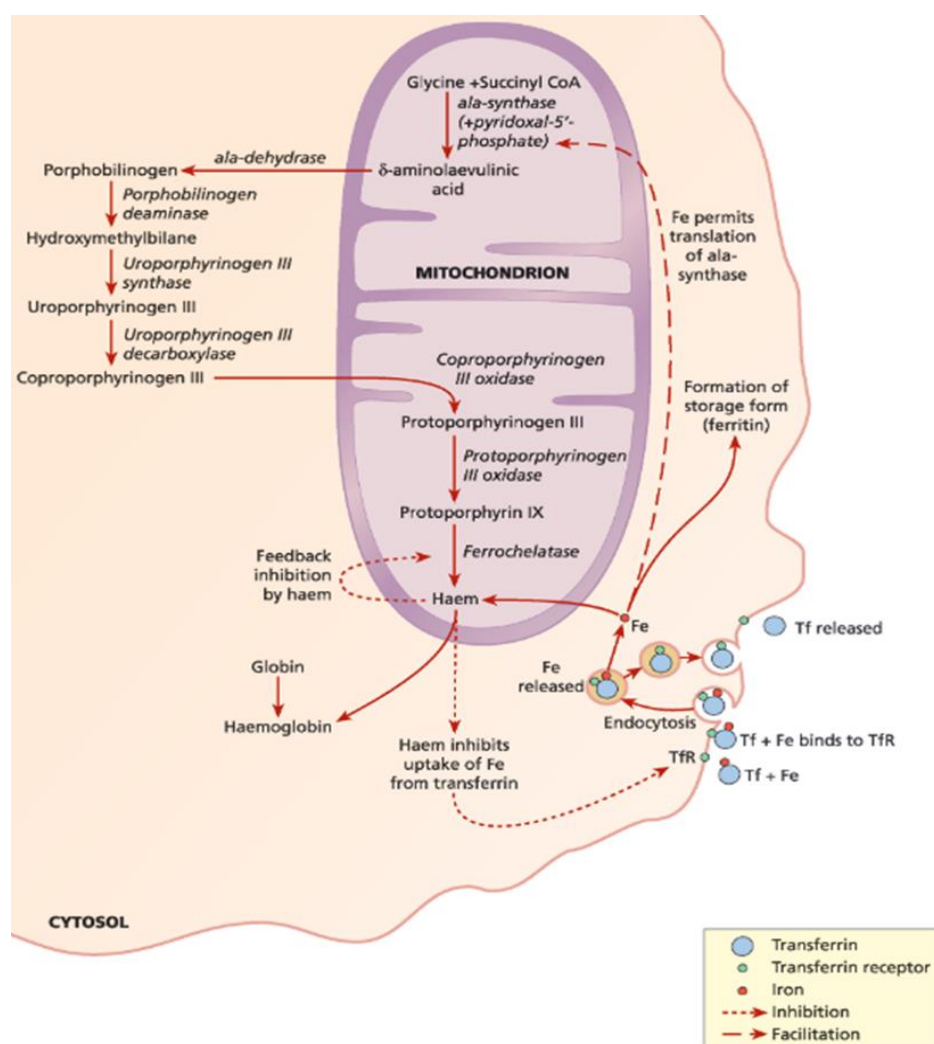


Σχήμα 1. Τεταρτοταγής δομή αιμοσφαιρίνης. Μετάβαση από την οξυγονωμένη μορφή (αριστερά) στη μη οξυγονωμένη (δεξιά). Τα άτομα σιδήρου μετατοπίζονται σε σχέση με τα επίπεδα των ομάδων αίμης και αποκαλύπτεται μια κεντρική κοιλότητα μεταξύ των β -αλυσίδων, διευκολύνοντας τη δέσμευση του ενζύμου 2,3 DPG. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. Alan N. Schechter Blood 2008;112:3927-3938 [1]

1.1 Σύνθεση αίμης

Η αίμη αποτελείται από πρωτοπορφυρίνη και δισθενή σίδηρο. Η σύνθεσή της, όπως και των πεπτιδικών αλυσίδων, συντελείται στα μιτοχόνδρια των κυττάρων της ερυθράς σειράς, από το στάδιο της προερυθροβλάστης έως και το δικτυοερυθροκύτταρο.

Συντίθεται από γλυκίνη και succinyl-CoA (κύκλος του Krebs) τόσο μέσα όσο και έξω από τα μιτοχόνδρια, σε επτά διαδοχικά στάδια (σχήμα 2). Το πρώτο παράγωγο είναι το δ-αμινολεβουλινικό οξύ, το οποίο παράγεται μέσα στο μιτοχόνδριο με τη συμμετοχή της βιταμίνης B6 και του ενζύμου συνθετάση της αλανίνης. Το δ-αμινολεβουλινικό οξύ, με τη συμμετοχή ανάλογων ενζύμων, διαδοχικά μετατρέπεται σε πορφοχολινογόνο, σε ουροπορφυρινογόνο III, σε κοπροπορφυρινογόνο III, σε πρωτοπορφυρινογόνο III και τέλος σε πρωτοπορφυρίνη IX. Στην πρωτοπορφυρίνη IX ενσωματώνεται ο δισθενής σίδηρος και προκύπτει η αίμη (σχήμα 2).



Σχήμα 2. Στάδια σύνθεσης της αίμης. Haemoglobin and the genetics of haemoglobin synthesis. Blackwell Publishing

1.2 Σύνθεση αιμοσφαιρινικών αλυσίδων

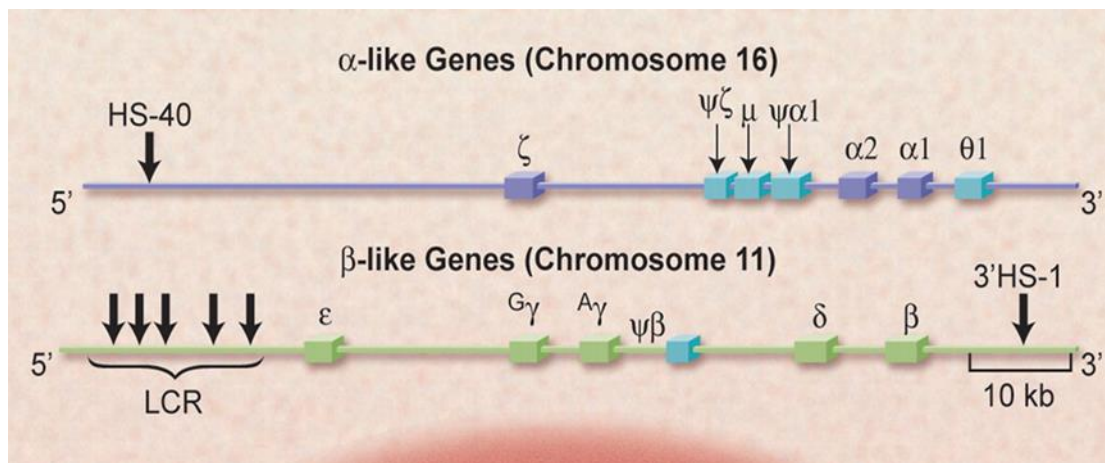
Υπάρχουν έξι είδη πολυπεπτιδικών αλυσίδων, που χαρακτηρίζονται με τα μικρά γράμματα του ελληνικού αλφαβήτου (α, β, γ, δ, ε και ζ) και τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους στον αριθμό και την αλληλουχία των αμινοξέων από τα οποία αποτελούνται. Η σύνθεση τους πραγματοποιείται στα ριβοσώματα του κυττάρου [1].

Τα γονίδια των αλυσίδων της ομάδας α (α-cluster) βρίσκονται σε μια περιοχή 50.000 βάσεων κοντά στο τελομερικό άκρο του βραχέως σκέλους του χρωμοσώματος 16 με την ακόλουθη σειρά: ζ, α2, α1 και θ. Τα γονίδια α1 και α2 είναι σχεδόν όμοια και διαφέρουν στην προσθήκη επτά νουκλεοτιδίων κοντά στο τέλος του ιντρονίου 2 στο α2 γονίδιο, δύο αντικαταστάσεις στο ιντρόνιο 2 και αρκετές νουκλεοτιδικές αλλαγές μετά το 3' άκρο του εξωνίου 3. Αν και τα δύο α γονίδια παρουσιάζουν υψηλή ομολογία (98.5%), το γονίδιο α2 παράγει από μόνο του δύο με τρεις φορές περισσότερη α αλυσίδα από το γονίδιο α1 [1].

Τα γονίδια της ομάδας β (β-cluster) βρίσκονται στο σύμπλεγμα των β γονιδίων στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 11 με σειρά: ε, Gγ, Aγ, δ, και β. Η σειρά των γονιδίων αντικατοπτρίζει την διαδοχική τους έκφραση κατά την οντογένεση. Τα ψευδογονίδια δεν εκφράζονται [1].

Η διαδοχική τους ενεργοποίηση ρυθμίζεται από ένα πλήθος μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι συνδέονται με διάφορες αλληλουχίες υποκινητών, αποσιωπητών κ.α. πριν (5') και μετά (3') από κάθε δομικό γονίδιο [1].

Οι βασικές συστοιχίες ελέγχου των δύο ομάδων (α και β) βρίσκονται στο 5' άκρο των δομικών γονιδίων και ονομάζονται HS-40 (hypersensitive site) και LCR (locus control region) αντίστοιχα. Κάθε άτομο διαθέτει δύο αλληλικά γονίδια β αλυσίδων και τέσσερα γονίδια α-αλυσίδων [1].



Σχήμα 3. Εντόπιση των γονιδίων των αιμοσφαιρινικών αλυσίδων. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. Alan N. Schechter Blood 2008;112:3927-3938 [1]

Τα γονίδια των αλυσίδων της σφαιρίνης είναι ασυνεχή, δηλαδή περιλαμβάνουν αλληλουχίες βάσεων που, στο τελικό προϊόν, μεταφράζονται σε πρωτεΐνη (εξώνια), και αλληλουχίες που δε μεταφράζονται (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). Μικρές, “μη μεταφραζόμενες αλληλουχίες” (UTR, untranslated regions) “πριν” (5’) και μετά κάθε γονίδιο (3’) αποτελούν αναπόσπαστο τμήμα του.

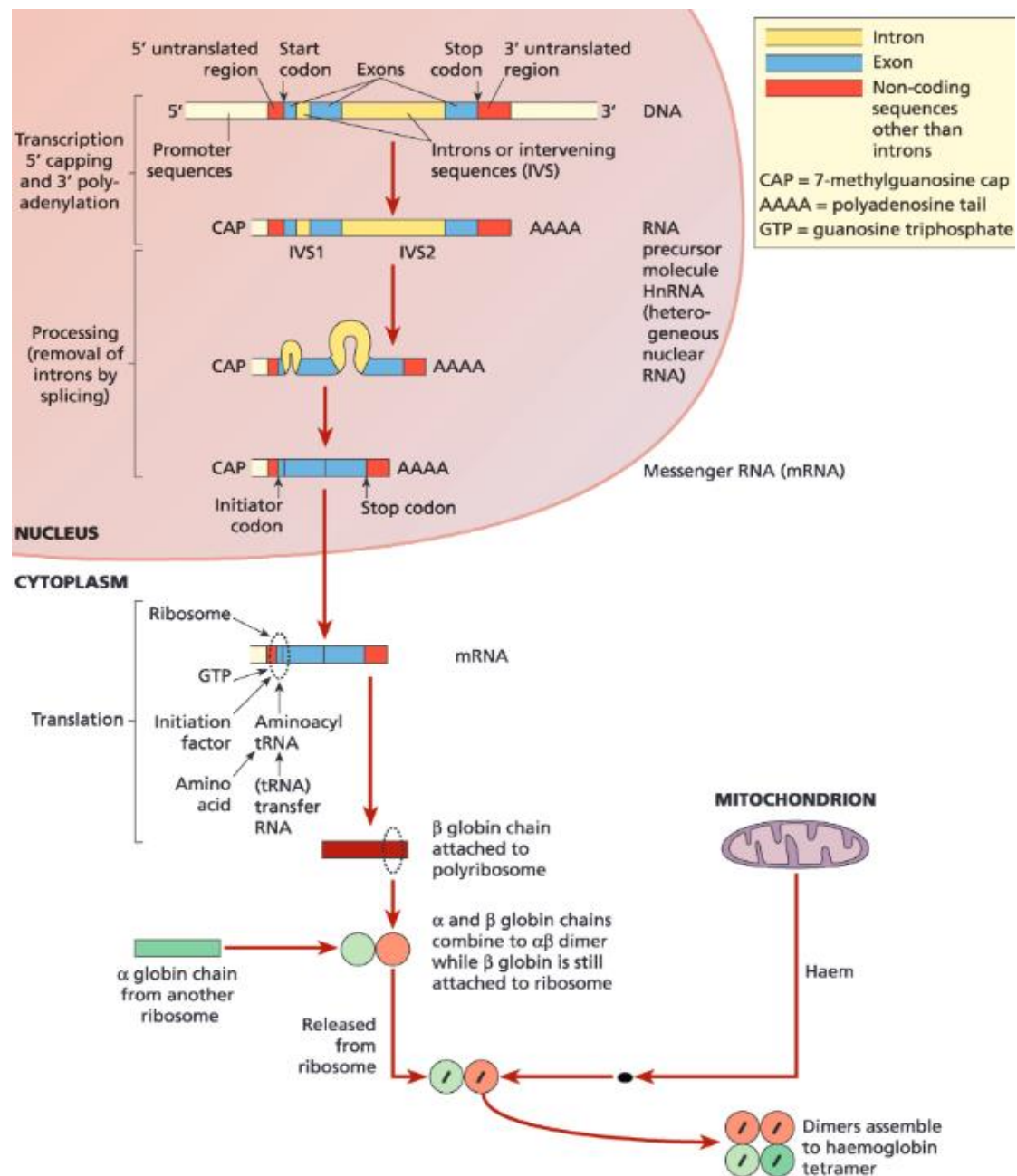
Η σύνθεση των αλυσίδων αρχίζει με τη μεταγραφή στον πυρήνα των κυττάρων της ερυθράς σειράς, του επιλεγμένου για κάθε στάδιο της οντογένεσης γονιδίου (σχήμα 4). Μια ειδική πολυμεράση μαζί με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες προσκολλάται σε ειδική θέση του DNA, αρκετές βάσεις “πριν” (5’) από το γονίδιο 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 HS-40 για την ομάδα α. Έπειτα το πρωτογενές mRNA: 1) απαλλάσσεται από τα ιντρόνια που αποκόπτονται με τις 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), 2) μεθυλιώνεται σε ειδική θέση λίγες βάσεις πριν από την αρχή του γονιδίου, 3) αποκτά μια ουρά από νουκλεοτίδια αδερίνης 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, η έτοιμη αλυσίδα ελευθερώνεται από το ριβόσωμα, συνδέεται με την αίμη αποκτώντας την ειδική της στεροδομή και διαπλέκεται με τις συμπληρωματικές της σχηματίζοντας το τετραμερές μόριο αιμοσφαιρίνης. Στην διεργασία αυτή, οι α-αλυσίδες που είναι εξαιρετικά ασταθείς προστατεύονται από την άμεση μετουσίωση και κατακρήμνιση και προσφέρονται προς σύνδεση με τις β-αλυσίδες από μια άλλη πρωτεΐνη του ερυθροκυττάρου, που ονομάζεται AHSP (α-hemoglobin stabilizing protein).

Η όλη διεργασία διαρκεί λίγα μόνο λεπτά και επιτελείται κατά 95% και πλέον στους ερυθροβλάστες για να συμπληρωθεί στα δικτυοερυθροκύτταρα.

Οι αλυσίδες σφαιρίνης πρέπει να έχουν καθορισμένη δομή και να είναι ισοσταθμισμένες ώστε ο αριθμός των α σφαιρινών να είναι ακριβώς ο ίδιος με των β σφαιρινών. Όταν δεν πληρούνται οι παραπάνω συνθήκες, υπάρχει ολική ή μερική βλάβη στο ένα ή και στα δύο αλληλία των γονιδίων σφαιρίνης.

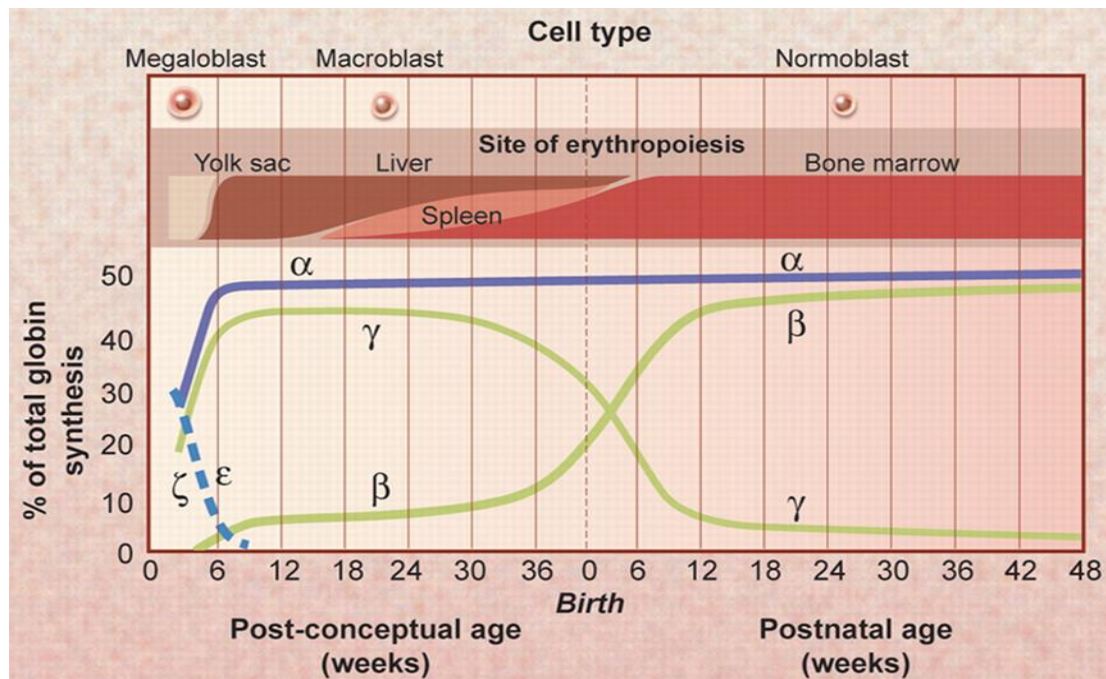


Σχήμα 4: Σύνθεση σφαιρινικών αλυσίδων. Haemoglobin and the genetics of haemoglobin synthesis. Blackwell Publishing

Περισσότερες από 1000 μεταλλάξεις έχουν περιγραφθεί στα α και β γονίδια οι οποίες επηρεάζουν τόσο τη δομή όσο και τη σύνθεση των αλυσίδων αιμοσφαιρίνης.

1.3 Μορφές αιμοσφαιρίνης που απαντώνται στον άνθρωπο

Κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής και της ενήλικου ζωής παρατηρείται μια αλλαγή στους τύπους της αιμοσφαιρίνης που συντίθενται, εξαιτίας αλλαγής στην έκφραση των διαφόρων γονιδίων της σφαιρίνης. Οι αιμοσφαιρίνες, λοιπόν, εκφράζονται σε διαφορετικό χρόνο και από διαφορετικό ιστό, ένα φαινόμενο το οποίο ονομάζεται μεταστροφή (σχήμα 5). [1-2]



Σχήμα 5. Αλλαγές στη σύνθεση των αιμοσφαιρινικών αλυσίδων πριν και μετά την γέννηση. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. Alan N. Schechter Blood 2008;112:3927-3938 [1]

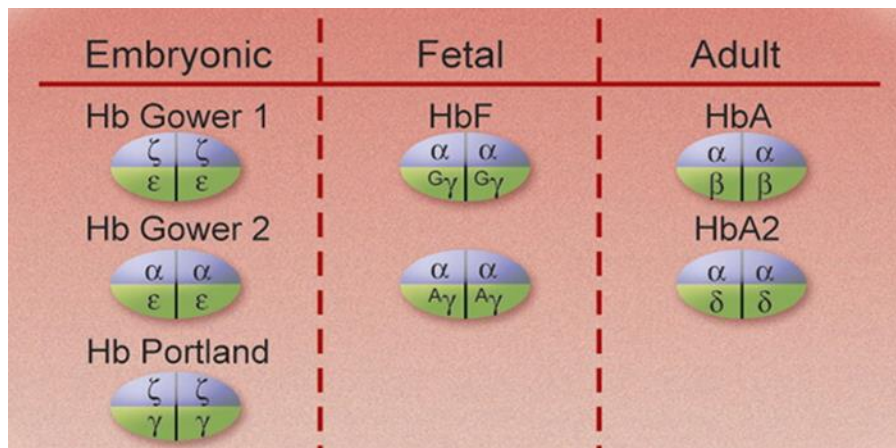
Αναλυτικότερα, παρατηρείται μεταστροφή έκφρασης (expression switches) στα γονίδια τύπου α, από ζ σε α στην πρώιμη εμβρυονική φάση και δύο μεταστροφές στα γονίδια τύπου β, μία περί την έκτη εβδομάδα κύησης από ε σε γ και μία περί την τρίτη εβδομάδα μετά τη γέννηση από γ σε β (σχήμα 5) [1-2].

Μετά τη σύζευξη των πολυπεπτιδικών αλυσίδων σε τετραμερή μόρια σχηματίζονται οι παρακάτω τέσσερις τύποι αιμοσφαιρίνης (σχήμα 6) [1-2]:

1. Εμβρυονικές αιμοσφαιρίνες: ανιχνεύονται από την 3η έως τη 10η εβδομάδα της κύησης [1-2]

- ζ2ε2 - Hb Gower 1
- α2ε2 - Hb Gower 2
- ζ2γ2 - Hb Portland 1
- ζ2β2 - Hb Portland 2

2. Εμβρυική αιμοσφαιρίνη F (HbF:α2γ2): αποτελεί το κύριο μεταφορέα οξυγόνου κατά την διάρκεια της κύησης [1-2].
3. Αιμοσφαιρίνη ενηλίκου A (HbA:α2β2): αντικαθιστά την HbF σύντομα μετά την γέννηση [1-2].
4. Αιμοσφαιρίνη A2 (HbA2:α2δ2): αποτελεί μικρό ποσοστό αιμοσφαιρίνης κατά την ενήλικη ζωή [1-2].



Σχήμα 6. Μορφές αιμοσφαιρίνης. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. Alan N. Schechter Blood 2008;112:3927-3938 [1]

Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα ερυθρά αιμοσφαίρια του ενήλικα περιέχουν περίπου 97-98% HbA, 2-3% HbA2 και ελάχιστη HbF [1-2].

ΔΕΥΤΕΡΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΑ

1.1 Εισαγωγή

Οι θαλασσαιμίες αποτελούν το πιο κοινό μονογονιδιακό νόσημα με 270 εκατομμύρια φορείς παγκοσμίως [3].

Ο όρος θαλασσαιμία αναφέρεται σε ένα ευρύ φάσμα διαταραχών που χαρακτηρίζονται από μείωση ή και πλήρη αναστολή σύνθεσης των φυσιολογικών αλυσίδων σφαιρίνης. Σύμφωνα με την αλυσίδα της οποίας η σύνθεση υπολείπεται, οι θαλασσαιμίες καλούνται α-, β-, γ-, δ-, δβ-, ή εγδβ-θαλασσαιμίες [6-8]. Οι περισσότερες θαλασσαιμίες κληρονομούνται ως υπολειπόμενοι αυτοσωματικοί χαρακτήρες [6-8]. Η θαλασσαιμία είναι κοινή σε περιοχές με διαδεδομένη ελονοσία καθώς τα θαλασσαιμικά ερυθροκύτταρα παρέχουν ανοσία έναντι του παρασίτου [6-7].

Οι πρώτες αναφορές της μεσογειακής αναιμίας εμφανίζονται το 1928 από τον Cooley, ο οποίος περιέγραψε την κλινική μορφή της νόσου σε ομάδα παιδιών με εκδηλώσεις όπως, σοβαρή αναιμία, σκελετικές ανωμαλίες, παραμορφώσεις προσώπου, σπληνομεγαλία και αύξηση των δικτυοερυθροκυττάρων [4]. Περίπου 10 χρόνια αργότερα ο Καμινόπετρος υποστήριξε, ότι η νόσος μεταβιβάζεται κληρονομικά, ως υπολειπόμενο γονίδιο, σύμφωνα με τους νόμους του Mendel. Η νόσος ονομάστηκε Μεσογειακή Αναιμία ή Θαλασσαιμία ύστερα από παρατηρήσεις των Whipple και Bradferd το 1942 ότι εμφανιζόταν κυρίως σε μεσογειακούς λαούς (Ιταλούς, Έλληνες).

Από τότε έως σήμερα, η θαλασσαιμία που παλαιότερα οδηγούσε σε πρώιμο θάνατο έχει μετατραπεί σε μια χρόνια νόσο. Η 8η Μαΐου έχει καθιερωθεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας και την Παγκόσμια Οργάνωση Θαλασσαιμίας ως Παγκόσμια Ημέρα θαλασσαιμίας.

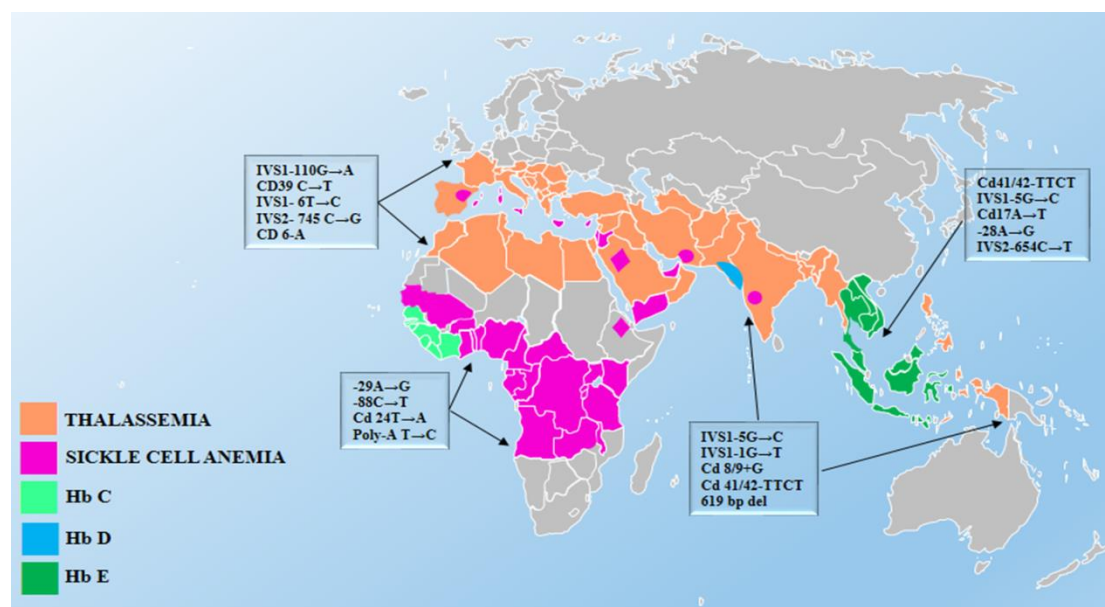
Από κλινική άποψη, οι πιο ενδιαφέρουσες μορφές είναι η α- και η β-θαλασσαιμία που προκύπτουν από τη μείωση ή πλήρη αναστολή σύνθεσης ενός από τους δύο τύπους των πολυπεπτιδικών αλυσίδων (α ή β) που συνθέτουν το μόριο της αιμοσφαιρίνης του ενήλικα (HbA, α₂β₂).

1.2 Γεωγραφική κατανομή θαλασσαιμιών

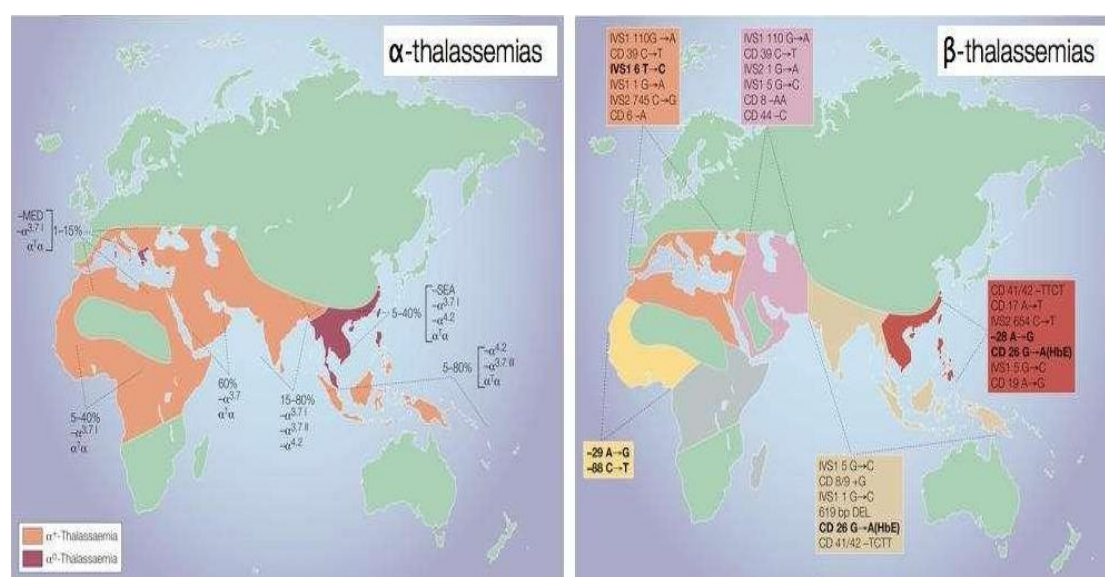
Υπολογίζεται ότι το 1-5% του παγκόσμιου πληθυσμού είναι φορείς για μια γενετική μετάλλαξη θαλασσαιμίας. Η μεγαλύτερη συχνότητα φορέων β-θαλασσαιμίας έχει παρατηρηθεί στις Μαλδίβες (18%), στην Κύπρο (14%), στη Σαρδηνία (10,3%) και στη νοτιοανατολική Ασία (3-5%). Η α-θαλασσαιμία απαντάται συχνότερα στη νοτιοανατολική Ασία και στην Κίνα, με το 40%

περίπου του γηγενούς πληθυσμού να είναι φορείς. Λιγότερο συχνά συναντάται στην Ινδία, στον Περσικό κόλπο, στη Μέση Ανατολή, στην Ελλάδα και στη βόρεια Ευρώπη (σχήμα 7,8) [9].

Η μετανάστευση πληθυσμών και οι γάμοι μεταξύ διαφορετικών εθνοτικών ομάδων εισήγαγε τη θαλασσαιμία σε όλες σχεδόν τις χώρες του κόσμου, συμπεριλαμβανομένης και της Βόρειας Ευρώπης, απ' όπου παλαιότερα απουσίαζε παντελώς [11-15].



Σχήμα 7. Παγκόσμια κατανομή αιμοσφαιρινοπαθειών

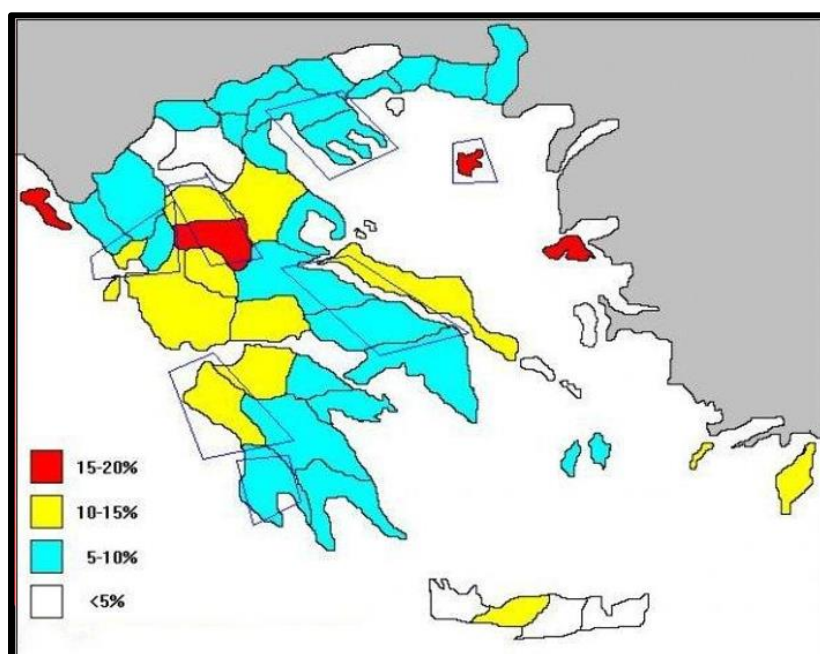


Σχήμα 8. Γεωγραφική κατανομή α-, β-θαλασσαιμίας και παρουσίαση των πιο συχνών μεταλλάξεων. Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. Weatherall DJ. Nat Rev Genet 2001;2(4):245-55 [9]

1.2.1 Η θαλασσαιμία στην Ελλάδα

Στην Ελλάδα συχνότερες είναι οι β-θαλασσαιμίες που αποτελούν και σοβαρό κλινικό πρόβλημα. Ο επιπολασμός των φορέων θαλασσαιμίας (ετερόζυγη ή ελάσσονα Θαλασσαιμία) είναι 70 ανά 1.000 άτομα γενικού πληθυσμού ενώ ο επιπολασμός των ασθενών με θαλασσαιμία είναι 4.000 σε πληθυσμό 11 εκατομμυρίων. Η νεογνική νοσηρότητα στην Ελλάδα της ομόζυγης μορφής της θαλασσαιμίας εκτιμάται σε 120-130 ανά 100.000 γεννήσεις, ετησίως. Η ετερόζυγη θαλασσαιμία έχει επιπολασμό 74 ασθενείς ανά 1.000 κατοίκους (7,4%) [10].

Η γεωγραφική κατανομή των φορέων β-θαλασσαιμίας ποικίλει με περιοχές υψηλής συχνότητας με ποσοστά 15-20% (Μυτιλήνη, Κύπρος, Καρδίτσα, κ.λπ.), περιοχές μέσης συχνότητας 10-15% και 5-10% και χαμηλής συχνότητας <5% όπως στη Βόρεια Ελλάδα (σχήμα 9) [10].



Σχήμα 9. Γεωγραφική κατανομή β-θαλασσαιμίας στην Ελλάδα

1.3 Παθοφυσιολογία θαλασσαιμίας

Οι κλινικές εκδηλώσεις των θαλασσαιμιών οφείλονται σε δύο κύριες διαταραχές:

- 1) ανεπαρκή παραγωγή σφαιρίνης και τελικά αιμοσφαιρίνης, με συνέπεια αναιμία, υποχρωμία και μικροκυττάρωση, και
- 2) ανισόρροπη παραγωγή των αλυσίδων της αιμοσφαιρίνης με συνέπεια κατακρήμνιση των πλεοναζουσών αλυσίδων και καταστροφή της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης ή ερυθροφαγοκυττάρωση .

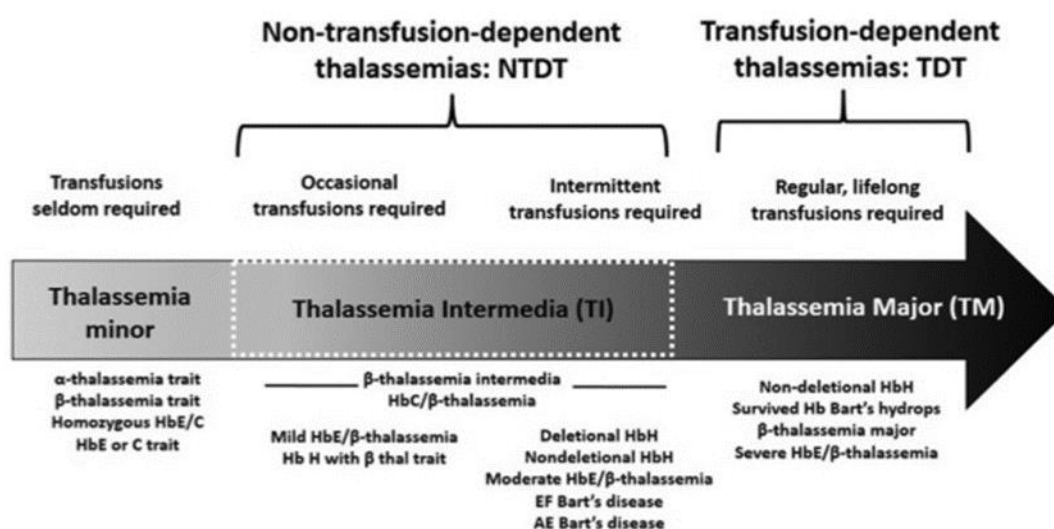
Γενικά η κλινική βαρύτητα των θαλασσαιμιών σχετίζεται με τον βαθμό ανισορροπίας α- / μη α-αλυσίδων.

Σε ό,τι αφορά την παθοφυσιολογία των θαλασσαιμιών υπάρχουν τρεις σημαντικές διαφορές μεταξύ α- και β-θαλασσαιμίας: 1) στους περισσότερους τύπους β-θαλασσαιμίας η διαταραχή είναι μία σημειακή μετάλλαξη, ενώ στην α-θαλασσαιμία είναι η απώλεια ολόκληρων τμημάτων γενετικού υλικού (υπάρχουν βέβαια εξαιρέσεις), 2) η έναρξη των συμπτωμάτων στην α-θαλασσαιμία γίνεται από τη στιγμή της γέννησης, αφού διαταράσσονται η HbA και η HbF. Στη β-θαλασσαιμία τα συμπτώματα εμφανίζονται 6 μήνες μετά τη γέννηση διότι τότε η παραγωγή των β-αλυσίδων φτάνει στο μέγιστο, 3) η αιτία της αναιμίας στη β-θαλασσαιμία είναι κυρίως η μη αποδοτική ερυθροποίηση, ενώ στην α-θαλασσαιμία η περιφερική αιμόλυση.

1.4 Ταξινόμηση θαλασσαιμιών

Με βάση την κλινική σοβαρότητα και την ανάγκη για μετάγγιση, τα θαλασσαιμικά σύνδρομα μπορούν φαινοτυπικά να διακριθούν σε δύο κύριες ομάδες (σχήμα 10) [88]:

1. Μη μεταγγισιοεξαρτώμενες θαλασσαιμίες (ενδιάμεση θαλασσαιμία) και
2. Μεταγγισιοεξαρτώμενες θαλασσαιμίες



Σχήμα 10. Φαινοτυπική κατάταξη των θαλασσαιμικών συνδρόμων βασισμένη στην κλινική βαρύτητα και την ανάγκη μετάγγισης. Guidelines for the management of non transfusion dependent thalassaemia (NTDT). Taher A, Vichinsky E, Musallam K, Cappellini MD, Viprakasit V Nicosia (Cyprus): Thalassaemia International Federation; 2013 [88].

2. Β-ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΑ

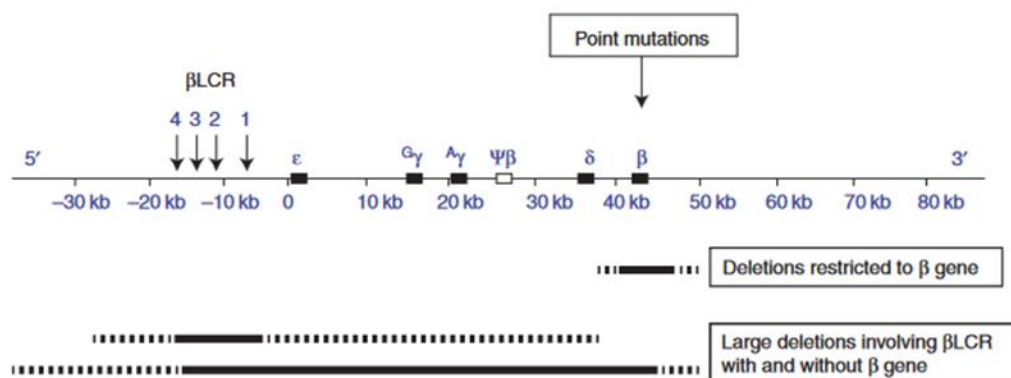
Η β-θαλασσαιμία χαρακτηρίζεται από τη μειωμένη ή παντελή έλλειψη σύνθεσης αιμοσφαιρίνης Α λόγω αδυναμίας σύνθεσης των β- αλυσίδων της [20].

2.1 Μοριακή βάση β-θαλασσαιμίας

Περίπου 300 μεταλλάξεις έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα ότι επηρεάζουν την έκφραση των β γονιδίων αιμοσφαιρίνης. Η πλειοψηφία των μεταλλάξεων αυτών είναι σημειακές νουκλεοτιδικές αλλαγές (σχήμα 11, 12). Οι μεταλλάξεις συσχετίζονται με την προέλευση των πασχόντων και εμφανίζουν κατανομή ανάλογα με τις εθνότητες [20].

Ως β⁰ μορφή υποδηλώνεται η πλήρης απουσία παραγωγής της β-σφαιρίνης από το συγκεκριμένο αλληλίο. Η β⁺ μορφή υποδηλώνει τα αλληλία με μειωμένη παραγωγή β-σφαιρίνης (περίπου 10%). Στη β⁺⁺ μορφή, η μείωση της παραγωγής β-σφαιρίνης είναι πολύ ήπια.

- 1) Οι σημειακές μεταλλάξεις που ευθύνονται για τη β-θαλασσαιμία ομαδοποιούνται με βάση το μηχανισμό που τροποποιούν τη σύνθεση των β αλυσίδων δηλαδή τη μεταγραφή, την επεξεργασία ή τη μετάφραση του RNA (σχήμα 12) [20].

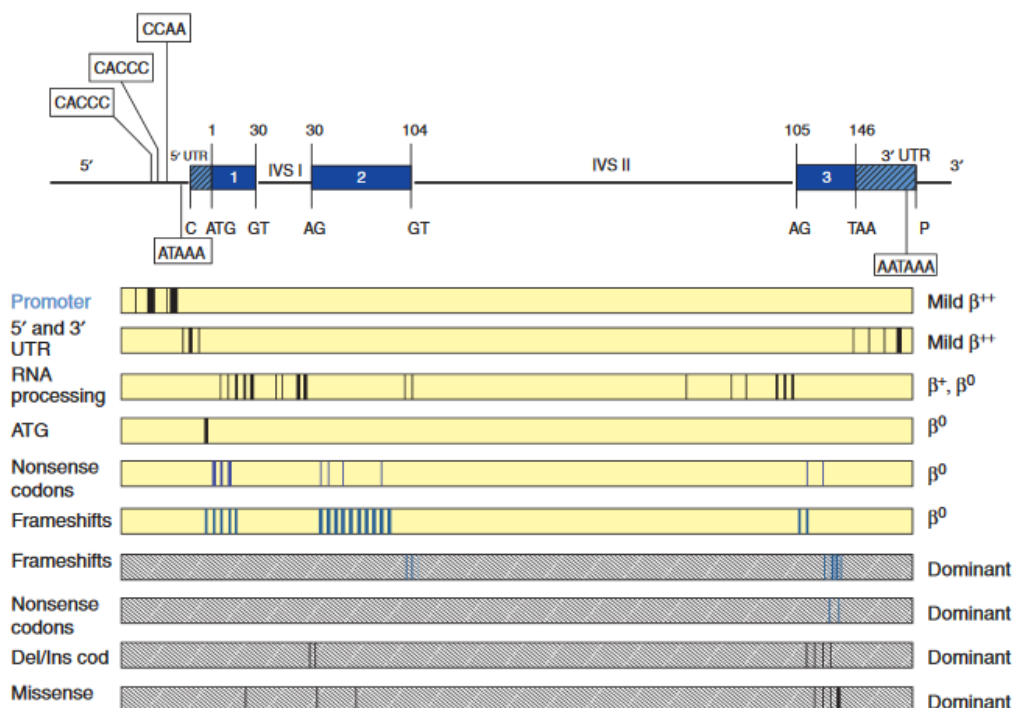


Σχήμα 11. Μεταλλάξεις που ευθύνονται για τη β-θαλασσαιμία. The molecular basis of β-thalassemia. Thein SL. Cold Spring Harb Perspect Med. 2013 [20]

- Οι μεταλλάξεις που επηρεάζουν τη μεταγραφή εντοπίζονται είτε στις συντηρημένες περιοχές του DNA στον υποκινητή του β γονιδίου (π.χ. στην θέση ATAA, τη CCAAT ή τις αλληλουχίες CACCC) ή στην περιοχή των 50 νουκλεοτιδίων στη 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου (5'UTR) (σχήμα 12). 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 [20].
- Πάνω από 50 διαφορετικές μεταλλάξεις 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 (σχήμα 12). Οι μεταλλάξεις που αλλάζουν τα δινουκλεοτίδια των ιντρονίων, αποτρέπουν τη σύνθεση του φυσιολογικού ώριμου RNA και προκαλούν β^0 θαλασσαιμία. 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. 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^+ 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 IVSI-5 G>A που απαντάται στο πληθυσμό μας, ενώ η IVSI-6T>C που συνήθως προκαλεί έναν φαινότυπο β^{++} θαλασσαιμίας και συναντάται σε όλα τα κράτη γύρω από τη Μεσόγειο, τη Μέση Ανατολή και την Ανατολική Ευρώπη. Υπάρχουν πολλές μεταλλάξεις β-θαλασσαιμίας που ενεργοποιούν εναλλακτικές θέσεις ματίσματος του 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^+ θαλασσαιμίας. Τέτοιες μεταλλάξεις είναι η IVSI-110G>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^+ ή β^{++} , 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 εξώνιο 1 και παράλληλα δημιουργεί την παθολογική αιμοσφαιρίνη Hb E ($\beta^{26} \text{Glu>Lys}$) η οποία είναι συχνή στην ΝΑ Ασία [20].

- Άλλες μεταλλάξεις που επηρεάζουν την επεξεργασία του RNA εντοπίζονται στην πόλυ A ουρά του γονιδίου (AATAAA) ή στην 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή του γονιδίου (σχήμα 12) δημιουργώντας αλληλόμορφα με φαινότυπο β^+ θαλασσαιμίας [20].
- Περίπου οι μισές από τις μεταλλάξεις που ευθύνονται για β-θαλασσαιμία επηρεάζουν τη μετάφραση του RNA (σχήμα 12) και όλες έχουν σαν αποτέλεσμα β^0 θαλασσαιμία [20].



Σχήμα 12. Σημειακές μεταλλάξεις που ευθύνονται για τη β-θαλασσαιμία. The molecular basis of β -thalassemia. Thein SL. Cold Spring Harb Perspect Med. 2013 [20]

- 1) Λιγότερο συχνές είναι οι μεταλλάξεις β-θαλασσαιμίας 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 105 bp έως και περισσότερο από 60 Kb και έχουν σαν αποτέλεσμα β^0 –θαλασσαιμία (σχήμα 11) [20].
- 2) Η έκφραση του β γονιδίου μπορεί επίσης να κατασταλεί από ελλείμματα στη συστοιχία ελέγχου του συμπλέγματος των β γονιδίων αιμοσφαιρίνης (βLCR) με ή χωρίς το γονίδιο β-σφαιρίνης όπως στη $\epsilon\delta\beta^0$ –θαλασσαιμία (σχήμα 11) [20].
- 3) Υπάρχουν κάποιες σπάνιες μορφές β-θαλασσαιμίας που κληρονομούνται με επικρατούντα τρόπο. Σε αυτό τον τύπο κληρονομικότητας ένα και μόνο παθολογικό αλληλόμορφο προκαλεί την κλινική εκδήλωση της νόσου. Έχουν αναφερθεί περισσότερα από 30 τέτοια αλληλόμορφα β-θαλασσαιμίας [20].

2.2 Μοριακή ετερογένεια της β-θαλασσαιμίας στην Ελλάδα

Οι γενετικές διαταραχές που ευθύνονται για τη β-θαλασσαιμία, στον Ελληνικό χώρο, παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια [21-23]. Από μελέτες που έχουν γίνει σε ασθενείς με β-θαλασσαιμία 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 (σχήμα 13) [23].

Mutation	Phenotype	Case number	Frequency %
IVS-I-110 G→A	β^+	1599	42.1
CD39 C→T	β^0	714	18.8
IVS-I-1 G→A	β^0	487	12.8
IVS-I-6 T→C	β^+	307	8.1
IVS-II-745 C→G	β^+	239	6.3
IVS-II-1 G→A	β^0	125	3.3
CD6 - A	β^0	63	1.7
-101 C→T	β^+	60	1.6
-87 C→G	β^+	40	1.0
CD5 - CT	β^0	31	0.8
CD8 - AA	β^0	30	0.8
Rare mutations		101	2.7
Total		3796	100

Σχήμα 13. Οι συχνότερες μεταλλάξεις του β-γονιδίου στην Ελλάδα. The molecular heterogeneity of beta-thalassemia in Greece. Boussiou M, Karababa P, Sinopoulou K, Tsaftaridis P, Plata E, Loutradi-Anagnostou A. Blood Cells Mol Dis. 2008 [23].

2.3 Παθογένεια β-θαλασσαιμίας

Η βασική βλάβη στη β-θαλασσαιμία είναι η μείωση ή η πλήρης αναστολή σύνθεσης αλυσίδων β-σφαιρίνης με επακόλουθη την περίσσεια α-αλυσίδων. Οι άμεσες επιπτώσεις είναι η συνολική μείωση παραγωγής της αιμοσφαιρίνης και η μη ισορροπημένη σύνθεση αλυσίδων αιμοσφαιρίνης.

Η μη ισορροπημένη σύνθεση των αλυσίδων έχει πολύ σοβαρές επιπτώσεις στα προγονικά ερυθροκύτταρα.

Οι α-άλυσοι είναι εξαιρετικά ασταθείς και καθιζάνουν γρήγορα στους πρόδρομους ερυθροβλάστες δημιουργώντας ενδοπυρηνικά έγκλειστα, τα οποία προκαλούν μεμβρανική βλάβη και εκτεταμένη καταστροφή των πρόδρομων ερυθροβλαστών στον μυελό των οστών, πριν από την ωρίμανση τους, και δημιουργία εξωμυελικών εστιών αιμοποίησης, διαδικασία η οποία ονομάζεται μη αποδοτική ερυθροποίηση και αποτελεί το κύριο παθογενετικό χαρακτηριστικό της β-θαλασσαιμίας (σχήμα 14) [24].

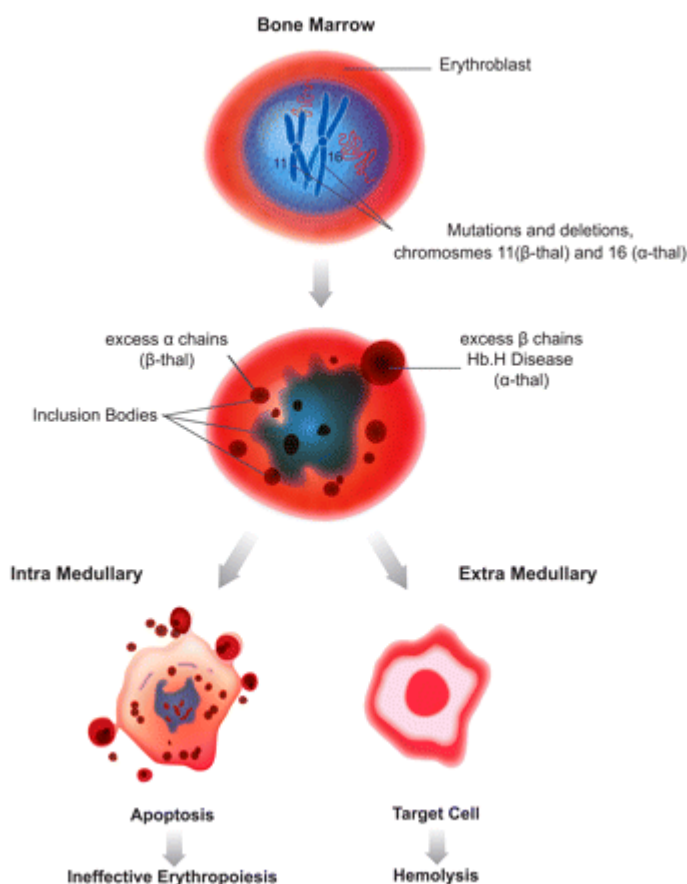
Η περιφερική αιμόλυση που συμβάλει στον βαθμό της αναιμίας, οφείλεται επίσης στις αδιάλυτες αλυσίδες α-σφαιρίνης οι οποίες προκαλούν βλάβες στη μεμβράνη των περιφερειακών ερυθροκυττάρων (σχήμα 14) [24].

Πρώτη αντίδραση στην μη αποτελεσματική ερυθροποίηση και αναιμία είναι η αυξημένη παραγωγή ερυθροποιητίνης η οποία οδηγεί σε υπερτροφία του ερυθροποιητικού μυελού σε μυελικά και εξωμυελικά σημεία, με αποτέλεσμα τις χαρακτηριστικές βλάβες στα οστά του κρανίου και του προσώπου, λέπτυνση του φλοιού και παθολογικά κατάγματα σε μακριά οστά, εξωμυελικές μάζες και συμβάλει στη σπληνομεγαλία.

Η αναιμία μπορεί να προκαλέσει υπερτροφία της καρδίας και σοβαρή καρδιακή ανεπάρκεια.

Η μη αποδοτική ερυθροποίηση σχετίζεται επίσης με αυξημένη απορρόφηση σιδήρου. Η υπερσιδήρωση προκαλείται επίσης από την αυξημένη εντερική απορρόφηση του σιδήρου λόγω ανεπάρκειας της εφιδίνης που παράγεται από τα ηπατοκύτταρα και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ομοιοστασίας του σιδήρου.

Ο βαθμός της μη ισορροπης σύνθεσης των αλυσίδων σφαιρίνης καθορίζεται από το είδος της μετάλλαξης του β-γονιδίου.



Σχήμα 14. Επιπτώσεις της περίσσειας ελεύθερων α ή β-αλυσίδων στη θαλασσαιμία . How I treat thalassemia. Eliezer A. Rachmilewitz, and Patricia J. Giardina Blood 2011;118:3479-3488 [24].

2.4 Κλινική ταξινόμηση β-θαλασσαιμίας

Υπάρχει εξαιρετικά μεγάλη ποικιλία μορφών, ανάλογα με το αν υπάρχει ομοζυγωτική ή ετεροζυγωτική κατάσταση και αν υπάρχει πλήρης ή μερική αδυναμία παραγωγής αλυσίδων.

Η β-θαλασσαιμία περιλαμβάνει τρεις κύριες μορφές:

1. Η μείζων θαλασσαιμία (μεσογειακή αναιμία ή αναιμία του Cooley)
2. Η ενδιάμεση θαλασσαιμία
3. Η ελάσσων θαλασσαιμία (φορέας β-θαλασσαιμίας, ή στίγμα β-θαλασσαιμίας, ή ετερόζυγη β-θαλασσαιμία).

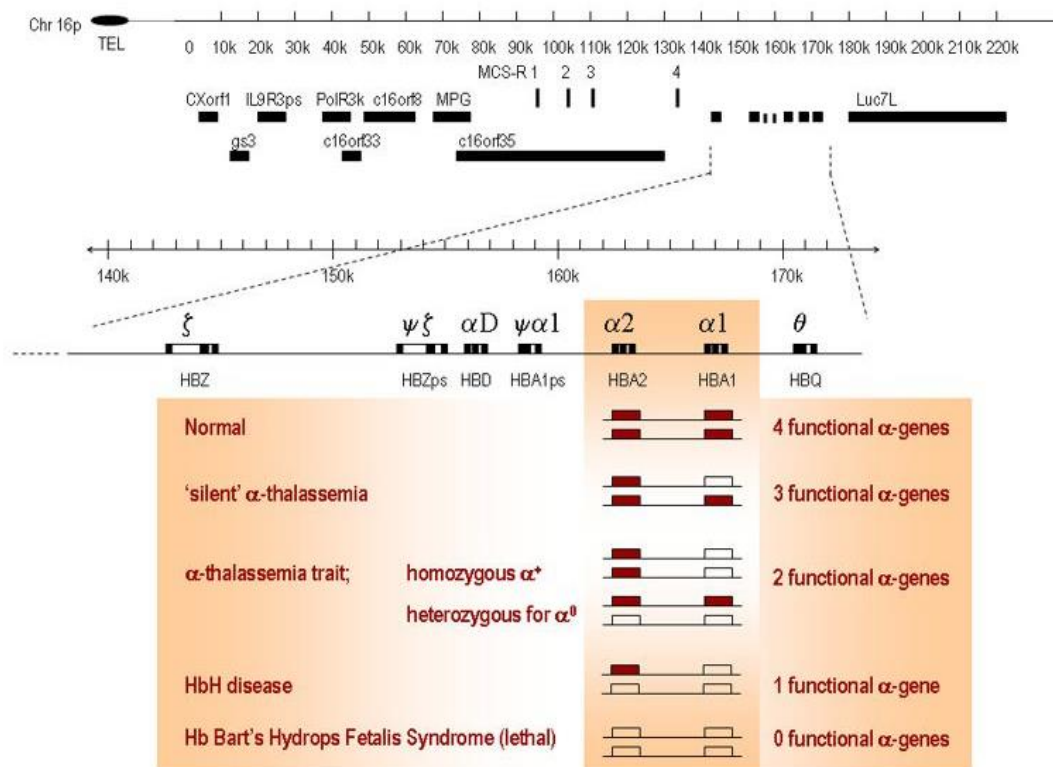
3. Α-ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΑ

Η α-θαλασσαιμία χαρακτηρίζεται από μειωμένη παραγωγή των α-αλυσίδων της αιμοσφαιρίνης.

3.1 Μοριακή βάση α-θαλασσαιμίας:

Οι α-θαλασσαιμίες οφείλονται κατά πλειοψηφία σε απώλειες (deletions) α γονιδίων, οι οποίες καταστέλλουν μερικώς ή πλήρως την παραγωγή των α αλυσίδων ή, σπανιότερα, σε σημειακές μεταλλάξεις που μειώνουν την σύνθεση των α –αλυσίδων. Παγκοσμίως έχουν περιγραφεί περισσότερες από 80 διαφορετικές μεταλλάξεις οι οποίες προκαλούν α-θαλασσαιμία [25-32].

Το τελικό ποσό των συντιθέμενων α-αλυσίδων εμφανίζει σημαντική ετερογένεια, που περιπλέκεται και από το γεγονός ότι υπάρχουν δύο α γονίδια σε κάθε χρωμόσωμα 16 και ότι το γονίδιο α2 εκφράζεται πολύ περισσότερο από το α1 [25-32].



Σχήμα 15. Το σύμπλεγμα των γονιδίων της α σφαιρίνης και η κατάταξη των γενετικών διαταραχών καθώς και η φαινοτυπική τους έκφραση . The structure of the α -globin gene cluster on chromosome 16. Recent advances in the molecular understanding of non-transfusion-dependent thalassemia. Galanello R. Blood Rev. 2012 [25]

Οι μεταλλάξεις εκείνες οι οποίες αποφέρουν μερική απώλεια στη σύνθεση των α αλυσίδων από το παθολογικό χρωμόσωμα είναι γνωστές ως μεταλλάξεις α⁺, ενώ εκείνες που προκαλούν ολοκληρωτική απώλεια της σύνθεσης των α γονιδίων είναι γνωστές ως μεταλλάξεις α⁰ [25-32].

Οι περισσότερες περιπτώσεις α-θαλασσαιμικών φαινοτύπων συνδυάζονται με τρία ελλείμματα, το -α^{3.7} α⁺ (πιο συνηθισμένο στην Αφρική, Μεσόγειο, Μ. Ανατολή και Ασία), το -α^{4.2} α⁺ (σε Ασία, Μεσόγειο, Μ. Ανατολή, ΝΑ. Ασία και Ειρηνικό) και το --^{SEA} α⁰ (κυρίως Κίνα και ΝΑ. Ασία) [25-32].

Όταν πρόκειται για έλλειψη ενός μόνο γονιδίου από ένα χρωμόσωμα, τότε η κατάσταση χαρακτηρίζεται ως “ετερόζυγη” και συμβολίζεται ως α⁺, οπότε οι φορείς είναι -α/α. Όταν η έλλειψη αφορά δύο α γονίδια από το ίδιο χρωμόσωμα, τότε η κατάσταση συμβολίζεται ως α⁰ και οι φορείς είναι -/α. Όταν η βλάβη είναι έλλειψη ενός α γονιδίου σε κάθε χρωμόσωμα οι φορείς είναι -α/-α. Όταν πρόκειται για μετάλλαξη, όπως στην β-θαλασσαιμία, που μειώνει την σύνθεση των αλυσίδων χωρίς έλλειψη του γονιδίου, τότε ισχύει το σύμβολο αth (σχήμα 15) [25-32].

Το κλινικό φάσμα της α-θαλασσαιμίας είναι πολύ μεγάλο και κυμαίνεται από τελείως ασυμπτωματικές μορφές μέχρι πολύ σοβαρές, ασύμβατες με τη ζωή καταστάσεις, που προκαλούν ενδομήτριο θάνατο [25-32].

3.2 Μοριακή ετερογένεια α-θαλασσαιμίας στην Ελλάδα

Στην Ελλάδα 7-8% του πληθυσμού είναι φορείς της α⁺ θαλασσαιμίας και άλλο 1% είναι φορείς κάποιου α⁰ ελλείμματος ή πιο σπάνιας μετάλλαξης που αδρανοποιεί ένα α γονίδιο. Με βάση την ανάλυση των γονοτύπων σε περιστατικά με HbH, το πιο συχνό έλλειμμα που συναντάται σε ποσοστό >50% των παθολογικών αλληλομόρφων είναι το -α^{3.7}. Ακολουθούν τα -^{MED} και -α^{20.5} ενώ σπανιότερα είναι τα -α^{4.2} και -α^{5.2} [33-34].

Οι συχνότερες σημειακές νουκλεοτιδικές αλλαγές που προκαλούν α-θαλασσαιμία στην Ελλάδα είναι η α^{TSAUDI}, που εντοπίζεται στην ουρά πολυαδενυλίωσης του α2 (AATAAA>AATAAG), και η α^{Hph}. Σε μικρότερη συχνότητα συναντώνται η α^{TPA} στην ουρά πολυαδενυλίωσης του α2 (AATAAA>AATAAA) καθώς και οι μεταλλάξεις που προκαλούν τις υπερασταθείς αιμοφαιρίνες Hb Agrinio και Hb Icaria [33-34,36].

Σπανιότερα απαντώνται μεταλλάξεις στο α1 ή το α2 γονίδιο που προκαλούν τη σύνθεση των υπερασταθών αιμοσφαιρινών και συνοδεύονται με εικόνα α-θαλασσαιμίας όπως η Hb Taybe [37], η Hb Heraklion (α1, cd36/37 delCCC, Pro) [35], η Hb Adana (α1 ή α2, cd59 GGC>GAC, Gly>Asp) [38].

3.3 Παθογένεια α-θαλασσαιμίας

Η ετερογένεια των εκδηλώσεων της α-θαλασσαιμίας καθορίζεται από το ποσό των α-αλυσίδων που είναι διαθέσιμες για να ενωθούν με τις κανονικά συντιθέμενες β-αλυσίδες και να σχηματίσουν HbA [24].

Οι α 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 [1-2].

Όταν το έλλειμμα είναι μικρό, τότε αυτό υπερκαλύπτεται εύκολα από τα άλλα α γονίδια και η ποσότητα της ερυθροκυτταρικής αιμοσφαιρίνης δεν μειώνεται. Όμως όταν το έλλειμμα των α-αλυσίδων είναι μεγαλύτερο, τα υπόλοιπα α γονίδια δεν επαρκούν να το συμπληρώσουν. Επιπλέον, αυξάνεται ολόένα και περισσότερο η περίσσεια β-αλυσίδων που δημιουργείται, επειδή αυτές συντίθενται κανονικά αλλά παραμένουν ελεύθερες, γιατί δεν βρίσκουν α-αλυσίδες για να σχηματίσουν HbA (σχήμα 14) [24].

Κατά κανόνα, οι ελεύθερες β-αλυσίδες σχηματίζουν τετραμερή (β_4) μόρια που, στην ηλεκτροφόρηση του αιμολύματος αναγνωρίζονται ως αιμοσφαιρίνη H.

Στα νεαρά ερυθροκύτταρα, τα β_4 μόρια παραμένουν διαλυτά, είναι όμως άχρηστα για την μεταφορά του οξυγόνου, γιατί συνδέονται με αυτό, αλλά δεν μπορούν να το αποδώσουν στους ιστούς. Επιπλέον, τα β_4 μόρια οξειδώνονται εύκολα, μετουσιώνονται και κατακρημνίζονται μέσα στα ερυθροκύτταρα, επιφέροντας σημαντικές λειτουργικές διαταραχές.

Στην ακραία περίπτωση της πλήρους αναστολής της σύνθεσης όλων των α-αλυσίδων, η κατάσταση δεν είναι συμβατή με την ζωή και το έμβρυο πεθαίνει ενδομητρίως (εμβρυϊκός ύδρωψ). Στην περίπτωση αυτή τα ερυθροκύτταρα περιέχουν μόνον γ-αλυσίδες και καθόλου (ή ίχνη) HbA.

3.4 Οι φαινότυποι της α-θαλασσαιμίας

Υπάρχουν 4 βασικές φαινοτυπικές κατηγορίες α-θαλασσαιμίας (σχήμα 15) [25]:

- 1) Ο τύπος -α/αα ή $\alpha^{th}\alpha/\alpha\alpha$, ονομάζεται σιωπηλή ή ήπια ετερόζυγη α-θαλασσαιμία, και δεν εμφανίζει αιματολογικές διαταραχές.
- 2) Ο τύπος --/αα ή -α/-α εμφανίζει ήπια υποχρωμία και μικροκυττάρωση των ερυθρών και ενίοτε μικρή αναιμία. Αποτελεί την τυπική ετερόζυγη α-θαλασσαιμία.

3) Η αιμοσφαιρινοπάθεια H (HbH) είναι η πιο σοβαρή μορφή της α-θαλασσαιμίας που είναι συμβατή με τη ζωή και οφείλεται σε έλλειψη 3 γονιδίων (-/-α) με αποτέλεσμα τη μείωση της παραγωγής των α-αλυσίδων στο περίπου 25% της φυσιολογικής. Η σχετική περίσσεια των β-αλυσίδων σχηματίζει ένα τετραμερές γνωστό ως HbH (β₄), απ' όπου η νόσος πήρε το όνομα της. Χαρακτηρίζεται από ήπια έως βαριά αιμολυτική αναιμία, συμβατή με τη ζωή χωρίς (συχνές) μεταγγίσεις, σπληνομεγαλία και σοβαρή αιμολυτική κρίση σε καταστάσεις οξέωσης και σε λοιμώξεις.

4) Η έλλειψη όλων των α γονιδίων, η οποία είναι ασύμβατη με τη ζωή (εμβρυϊκός ύδρωπας-Hb Bart's), καθώς το έμβρυο είτε αποβιώνει ενδομητρίως είτε αναπτύσσει ύδρωπα και αποβιώνει μετά τον τοκετό.

ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ

A. ΥΠΕΡΠΗΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΗ ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΑ

Πριν από την έναρξη τακτικών μεταγγίσεων και θεραπείας αποσιδήρωσης, η θαλασσαιμία ήταν μία ταχέως εξελισσόμενη θανατηφόρα νόσος [41]. Το 1982 ο Οικονομίδης, σε μελέτη 444 Ελλήνων ασθενών, αναφέρει επιβίωση 24% στα 28 έτη ζωής [39] και το 1989 οι Zurlo και συν. αναφέρουν επιβίωση 40% στα 25 έτη ζωής [40]. Οι εφαρμοζόμενες όμως σήμερα θεραπευτικές παρεμβάσεις (αποσιδήρωση, μεταγγίσεις κ.α) έχουν αυξήσει το προσδόκιμο επιβίωσης των ασθενών με θαλασσαιμία οι οποίοι φτάνουν πλέον στην ώριμη ενήλικη ζωή, οδηγώντας στην ανίχνευση και την περιγραφή καταστάσεων, όπως τα θρομβοεμβολικά φαινόμενα, που επιπλέκουν την κλινική πορεία των ασθενών, και των οποίων ο ρόλος ήταν μέχρι πρόσφατα ασαφής.

Η εμφάνιση θρομβοεμβολικών επεισοδίων, κυρίως σε ασθενείς με ενδιάμεση θαλασσαιμία, οδήγησε στην ταυτοποίηση μιας υπερπηκτικής κατάστασης στη θαλασσαιμία. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν σημαντικές αιμοστατικές διαταραχές σε ασθενείς με μείζονα β-θαλασσαιμία και ενδιάμεση β-θαλασσαιμία και επίσης σε ασθενείς με α-θαλασσαιμία (αιμοσφαιρινοπάθεια Η).

Τόσο φλεβικά όσο και αρτηριακά συμβάντα, συμπεριλαμβανομένων των σπάνιων θρομβωτικών επεισοδίων στον εγκέφαλο, έχουν περιγραφεί με υψηλότερη εμφάνιση στην ενδιάμεση θαλασσαιμία από ότι στη μείζονα θαλασσαιμία.

Η θαλασσαιμία φαίνεται να ανήκει στα νοσήματα που παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο θρόμβωσης με την επισήμανση ότι, ο κίνδυνος αυτός δεν είναι ίδιος για όλους τους ασθενείς με θαλασσαιμία αλλά αφορά σε μια συγκεκριμένη ομάδα ασθενών που θα μπορούσαν να χαρακτηρισθούν ως ομάδα υψηλού κινδύνου.

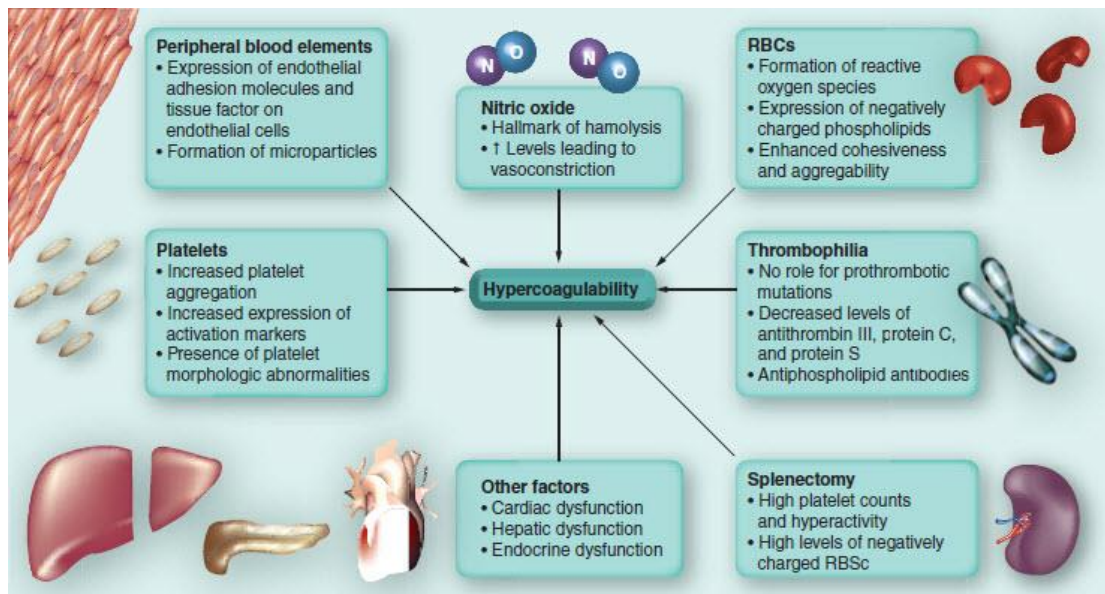
B. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΥΠΕΡΠΗΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗΝ ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΑ

Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές η ενεργοποίηση του πηκτικού μηχανισμού στη θαλασσαιμία αποδίδεται σε πολλούς παράγοντες και στις περισσότερες περιπτώσεις, συνδυασμός περισσοτέρων από μιας διαταραχής οδηγούν στην κλινική εκδήλωση θρόμβωσης [42-49].

Στους παθογενετικούς μηχανισμούς εμπλέκονται (σχήμα 16) [42-49]:

- Παθολογικά ερυθροκύτταρα στα οποία υπάρχει διαταραχή της κατανομής των λιπιδίων της μεμβράνης

- Ενεργοποίηση αιμοπεταλίων
- Ενεργοποίηση των μονοκυττάρων - ουδετεροφίλων
- Ενεργοποίηση ενδοθηλιακών κυττάρων
- Κληρονομικοί παράγοντες θρομβοφιλίας - Ενεργοποίηση των παραγόντων πήξης
- Σπληνεκτομή
- Αιμόλυση - Διαταραχές στην ομοιόσταση του μονοξειδίου του αζώτου (NO)
- Άλλοι παράγοντες



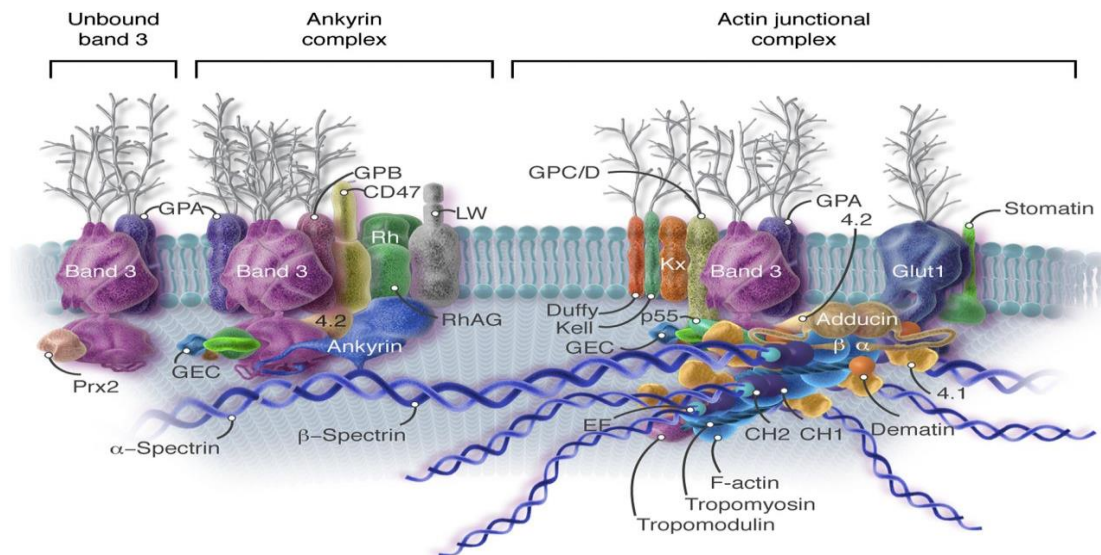
Σχήμα 16. Παράγοντες που συνεισφέρουν στην παθογένεια της υπερπηκτικότητας στη θαλασσαιμία. Hypercoagulability in β -thalassemia: a status quo. MD Cappellini. Expert Rev. Hematol, 505–512 ,2012 [47].

1. Παθολογικά ερυθροκύτταρα

1.1 Ερυθροκυτταρική μεμβράνη

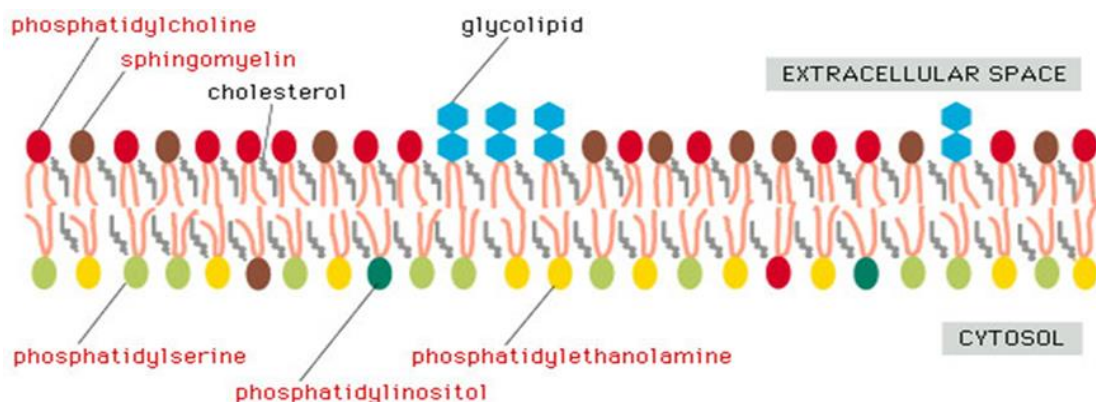
Η ερυθροκυτταρική μεμβράνη αντιπροσωπεύει μόνο το 1% του βάρους του ερυθρού, παρέχει όμως στο κύτταρο σημαντικές μηχανικές ιδιότητες όπως η παραμορφωσιμότητα, η ελαστικότητα και η ρευστότητα. Χάρη σε αυτές το ερυθροκύτταρο μπορεί να διατηρεί την ακεραιότητά του κατά τη διάρκεια των 120 ημερών που βρίσκεται στην κυκλοφορία περνώντας μέσα από τριχοειδή, των οποίων ο αυλός είναι στενότερος από αυτά, και να ανθίσταται στις μηχανικές κακώσεις που επιφέρει η αδιάκοπη διέλευσή του μέσα από τις βαλβίδες της καρδιάς.

Οι ιδιότητες αυτές εξασφαλίζονται με την ειδική κατασκευή της μεμβράνης του. Πρόκειται για μια διπλοστοιβάδα λιποειδών, η οποία υποστηρίζεται από έναν πρωτεϊνικό σκελετό και διαπεράται από διαμεμβρανικές πρωτεΐνες με διάφορες ιδιότητες (σχήμα 17) [50].

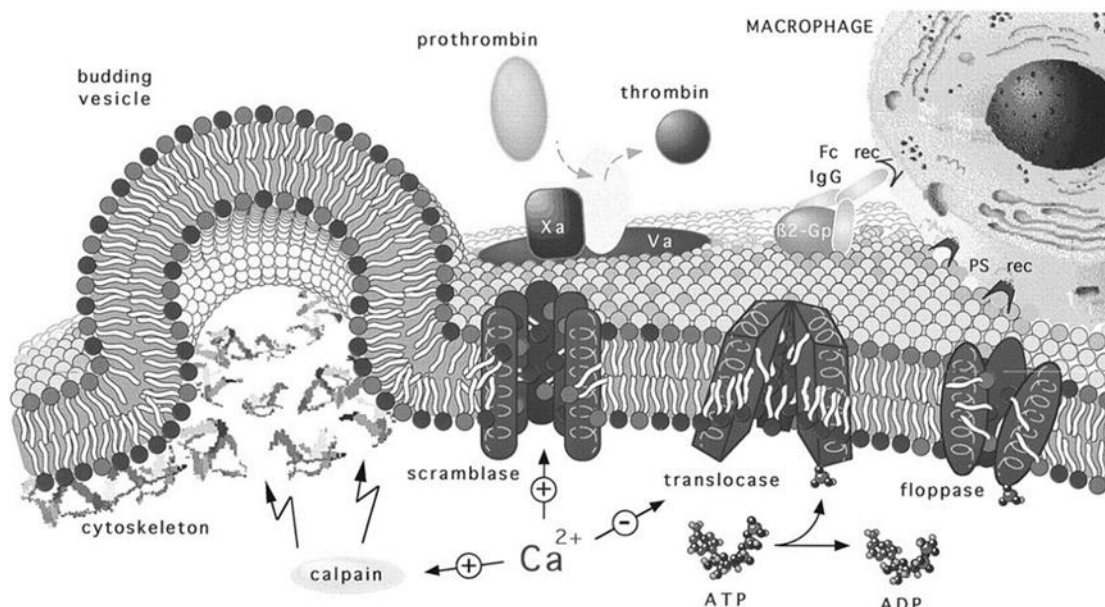


Σχήμα 17. Δομική οργάνωση της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης. Anatomy of the red blood cell membrane skeleton: unanswered questions. Samuel E Lux IV, Blood 2016;127:187-199 [50].

Τα λιπίδια αποτελούν το 50% του βάρους της μεμβράνης. Κυρίως πρόκειται για φωσfolιπίδια (54%), μη εστεροποιημένη χοληστερόλη (43%) και γλυκολιπίδια (3%). Ενώ η χοληστερόλη είναι ισομερώς κατανεμημένη στις δύο λιπιδικές μονοστιβάδες, τα τέσσερα κύρια φωσfolιπίδια παρουσιάζουν ασύμμετρη κατανομή. Στην εξωτερική περιοχή της διπλοστιβάδας βρίσκονται κατά κύριο λόγο φωσφατιδυλχολίνη και σφιγγομυελίνη ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης και όλα τα μόρια της φωσφατιδυλσερίνης (PS) και της φωσφοινοσιτίδης περιορίζονται στην εσωτερική λιπιδική μονοστιβάδα. (σχήμα 18) [50-51].



Σχήμα 18. Λιπιδιακή διπλοστιβάδα ερυθροκυττάρου. Molecular biology of the cell. (Garland Science 2008)



Σχήμα 19. Διατήρηση ασυμμετρίας φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης
Pathophysiologic Implications of Membrane Phospholipid Asymmetry in Blood Cells. Robert F.A. Zwaal and Alan J. Schroit. *Blood* 1997;89:1121-1132 [51].

Η διατήρηση της ασυμμετρίας των φωσφολιπιδίων φαίνεται να εξασφαλίζεται από τη δράση μιας ATP-εξαρτώμενης αμινοφωσφολιπιδικής τρανσλοκάσης (floppase) που μεταφέρει φωσφατιδυλσερίνη και φωσφατιδυλεθανολαμίνη από την εξωτερική στην εσωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης και από ένα μη ειδικό ένζυμο που μεταφέρει φωσφολιπίδια από την εσωτερική στην εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης. Επιπρόσθετα, ένα ένζυμο που ενεργοποιείται από το ασβέστιο (scramblase) προκαλεί την ανάμειξη όλων των φωσφολιπιδίων ώστε να επιτευχθεί ταχεία αποκάλυψη της φωσφατιδυλσερίνης (σχήμα 19) [51].

Άθροιση PS στην εξωτερική επιφάνεια της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης παρατηρείται στα γηραιά ερυθροκύτταρα και αποτελεί το σήμα αναγνώρισης και απομάκρυνσής τους από τα κύτταρα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος [52]. Επιπλέον όμως, η PS προσφέρει θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα X και του συμπλέγματος προθρομβινάσης που οδηγεί σε ενεργοποίηση του παράγοντα X και τη μετατροπή της προθρομβίνης σε θρομβίνη [52].

Οι πρωτεΐνες της μεμβράνης διακρίνονται σε διαμεμβρανικές και περιφερειακές (σχήμα 17) [50].

Οι διαμεμβρανικές, εισχωρούν ή διαπερνούν τη διπλοστιβάδα των λιπιδίων και αλληλεπιδρούν με τον υδρόφοβο λιπιδικό πυρήνα. Οι περισσότερες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες αποτελούν τα ερυθροκυτταρικά αντιγόνα. Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες εμφανίζουν μεγάλη λειτουργική ετερογένεια. Χρησιμεύουν ως μεταφορείς, συνδέτες με άλλα κύτταρα του αίματος και του ενδοθηλίου, καθώς και ως υποδοχείς σημάτων. Στις διαμεμβρανικές

πρωτεΐνες συγκαταλέγονται η ζώνη 3 (ο διάυλος ανταλλαγής ανιόντων, AE1), η υδατοπορίνη 1 (AQP1), ο μεταφορέας γλυκόζης 1 (Glut1), διάφορα ερυθροκυτταρικά αντιγόνα, η Rhesus-σχετιζόμενη γλυκοπρωτεΐνη (Rh-AG), οι αντλίες K⁺, Na⁺ κ.α. Στις πρωτεΐνες με λειτουργίες πρόσδεσης περιλαμβάνεται η ICAM-4 η οποία αντιδρά με ιντεγκρίνες και με το αντιγονικό σύστημα Lu. Σημαντικές επίσης διαμεμβρανικές πρωτεΐνες είναι οι γλυκοφορίνες A, B, C, D [50].

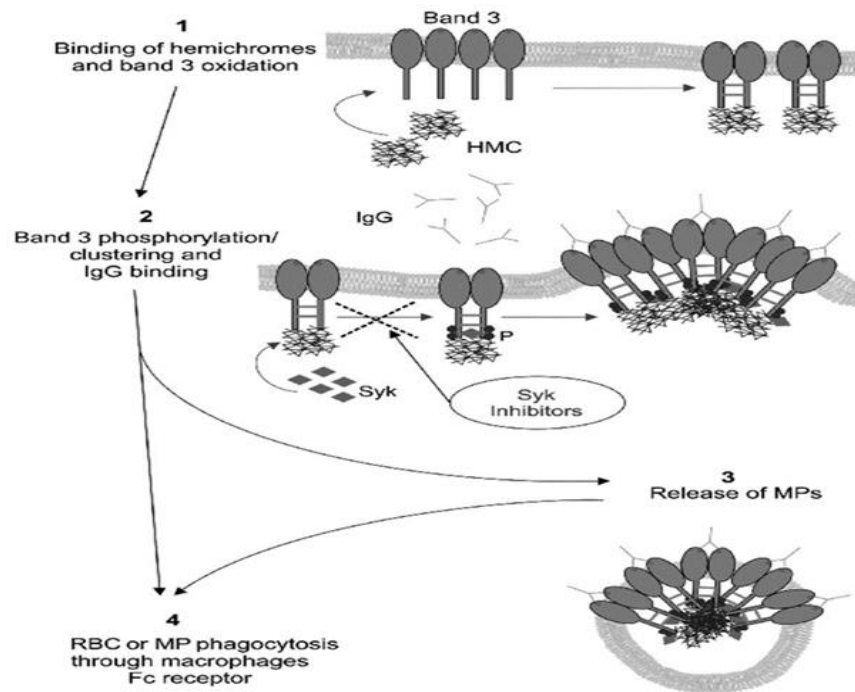
Οι περιφερειακές ή σκελετικές πρωτεΐνες, αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες και λιπίδια στη μεμβρανική επιφάνεια, αλλά δεν εισχωρούν στο λιπιδικό πυρήνα. Κύριο στοιχείο του συστήματος είναι η σπεκτρίνη: δύο σχετικά όμοια μεγάλα επιμήκη μόρια, η σπεκτρίνη α και η σπεκτρίνη β, που ενώνονται αντιπαράλληλα σχηματίζοντας ετεροδιμερή, τα οποία συνδέονται τελικο-τελικά με τρόπο ώστε το σύνολο να παίρνει τη μορφή δικτύου που εκτείνεται κάτω από όλη την κυτταρική επιφάνεια (κυτταροσκελετός, «οριζόντια αλληλεπίδραση»). Η σταθεροποίηση του δικτύου εξασφαλίζεται με πολλές άλλες πρωτεΐνες, (αγκυρίνη, πρωτεΐνες 4.1, 4.2, ακτίνη, αδουσίνη, τροπομυοσίνη, p55, τροπομοδουλίνη κ.α.), οι οποίες συνδέουν, άμεσα ή έμμεσα, κομβικά σημεία του δικτύου με τα εσωτερικά άκρα διαφόρων διαμεμβρανικών πρωτεϊνών (ζώνη 3, γλυκοφορίνες, κ.ά.) εξασφαλίζοντας την «κάθετη» στερεότητα του συστήματος [50].

1.2 Η ερυθροκυτταρική μεμβράνη στη θαλασσαιμία

Η θαλασσαιμία οφείλεται σε μερική ή πλήρη έλλειψη α ή β αλυσίδων, που έχει ως συνέπεια την διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ α και β αλυσίδων, και την κατακρήμνιση της περίσσειας αυτών.

Οι α- και β-αλυσίδες σφαιρίνης που υπάρχουν σε περίσσεια, είναι ασταθείς, οξειδώνονται και καθιζάνουν μέσα στα ερυθρά σχηματίζοντας αιμοχρώματα (hemichromes). Επίσης προκαλούν οξειδωτικό stress στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη που οδηγεί σε μειωμένη δραστηριότητα της φλιπάσης στα ερυθροκύτταρα [42,54].

Τα αιμοχρώματα προκαλούν οξείδωση της ζώνης 3 σχηματίζοντας δισουλφιδικές γέφυρες μεταξύ των δύο καταλοίπων κυστεΐνης στο κυτταροπλασματικό τμήμα της ζώνης 3. Η κινάση Syk (splenic tyrosine kinase) δεσμεύει την οξειδωμένη ζώνη 3 και φωσφορυλιώνει τα κατάλοιπα τυροσίνης στον κυτταροπλασματικό τομέα της ταινίας 3. Η φωσφορυλίωση της τυροσίνης προκαλεί την αποσταθεροποίηση της ζώνης 3 από τον κυτταροσκελετό, επιτρέποντας τη συσώρευση και σύνδεση της ζώνης 3 με τα φυσικά παραγόμενα IgG αντισώματα. Τα συμπλέγματα ζώνης 3/ αιμοχρώματα απελευθερώνονται με τη μορφή μικροσωματιδίων. Τα μικροσωματίδια και τα οψωνισμένα με IgG ερυθροκύτταρα φαγοκυττάρωνται από μακροφάγα (σχήμα 20) [54].



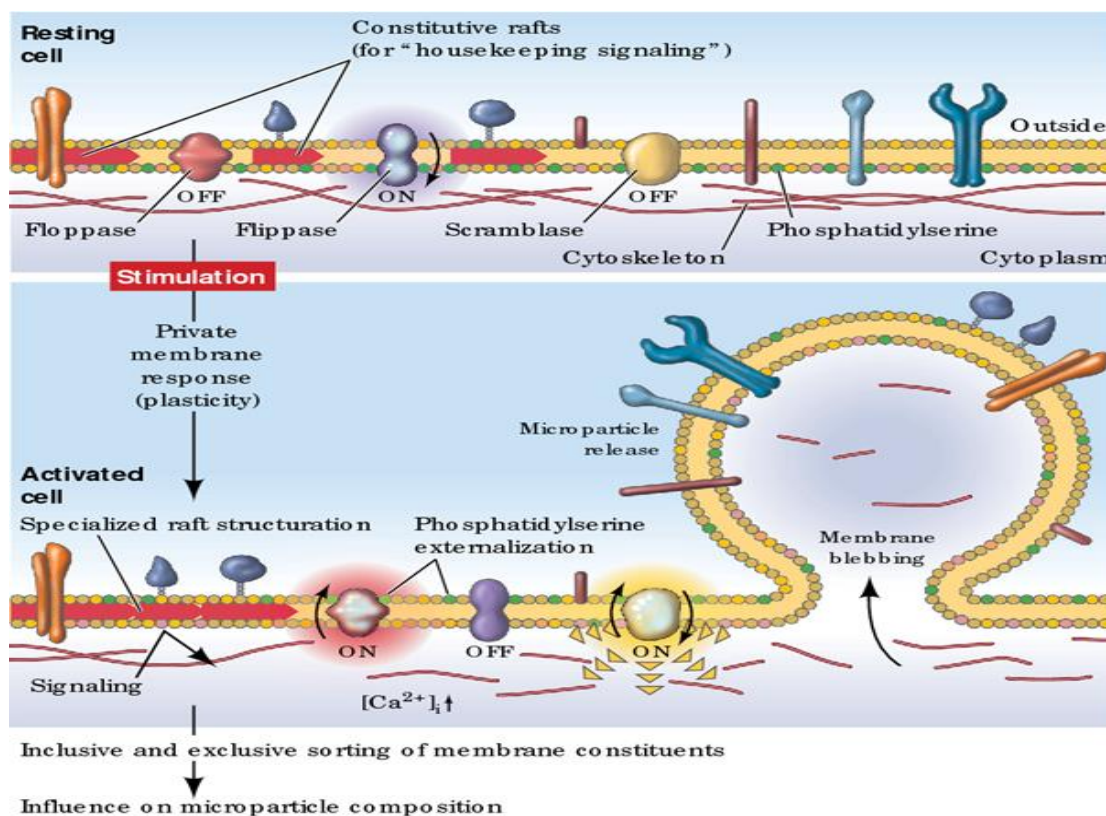
Σχήμα 20. Απελευθέρωση μικροσωματιδίων από τα θαλασσαιμικά ερυθροκύτταρα. Thalassemic erythrocytes release microparticles loaded with hemichromes by redox activation of p72Syk kinase. Ferru E, Pantaleo A, Carta F, Mannu F, Khadjavi A, Gallo V, Ronzoni L, Graziadei G, Cappellini MD, Turrini F. Haematologica 2014. 99:570-578. [54]

Οξειδωτικό stress προκαλεί και η αίμη, προϊόν αποδόμησης της αιμοσφαιρίνης μετά την απόσπαση του πρωτεϊνικού τμήματος (α-και β-αλυσίδες) μέσω απελευθέρωσης τοξικού μη συνδεδεμένου με τρανσφερίνη σιδήρου και ελεύθερων ριζών οξυγόνου (σχήμα 22) [42].

Τελικό αποτέλεσμα αποτελεί η απώλεια της κανονικής ασύμμετρης κατανομής των φωσfolιπιδίων της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων και της μετατόπισης της φωσφατιδυλσερίνης στο εξωτερικό μέρος της μεμβράνης (flip-flor) που έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή θρασμάτων ή μικροσωματιδίων (microparticles) με εκτεθειμένη φωσφατιδυλσερίνη (σχήμα 22) [42, 56-58].

Τα μικροσωματίδια αποτελούν μικρά κυστίδια από τις κυτταρικές μεμβράνες που απελευθερώνονται κατά την ενεργοποίηση ή την απόπτωση των κυττάρων. Προέρχονται από τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα αιμοπετάλια, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα μονοκύτταρα (σχήμα 21) [61].

Στους ασθενείς με θαλασσαιμία, ιδιαίτερα σε όσους έχουν υποβληθεί σε σπληνεκτομή έχει παρατηρηθεί αυξημένος αριθμός κυκλοφορούντων μικροσωματιδίων προερχόμενα από τα ερυθροκύτταρα [62-63].



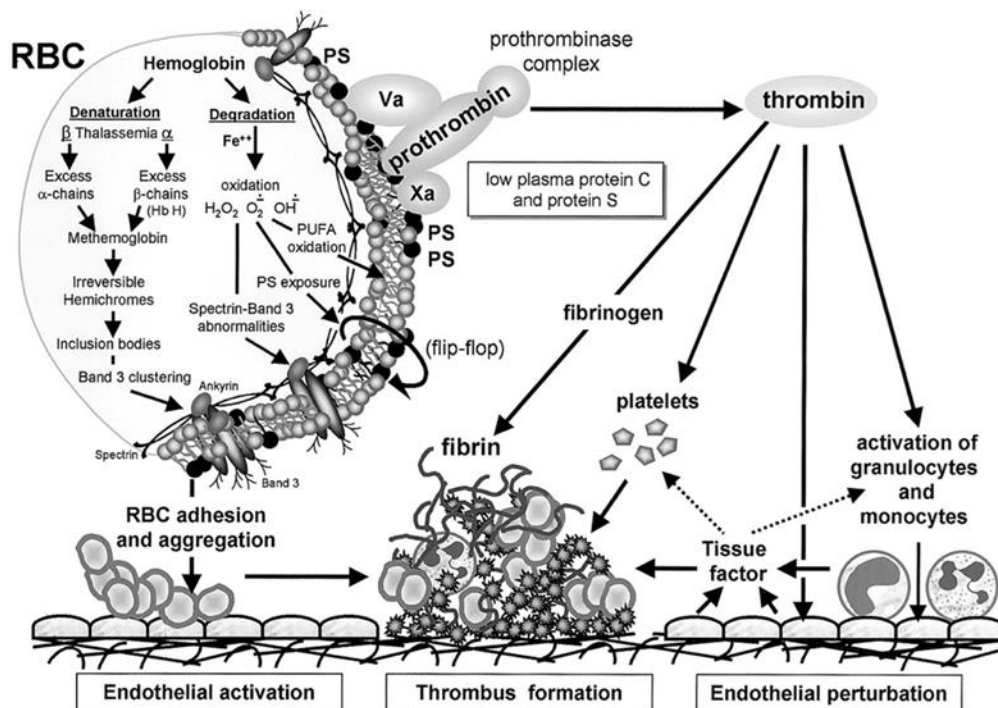
Σχήμα 21. Παραγωγή μικροσωματιδίων από την κυτταρική μεμβράνη. Membrane microparticles : two sides of the coin. Hugel B, Martinez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM. Physiology (Bethesda) 2005;20-7 [61].

Ως εκ τούτου, στη β-θαλασσαιμία παρατηρείται παθολογική έκθεση φωσφατιδυλσερίνης στην επιφάνεια των ερυθρών, τα οποία οδηγούνται σε πρώιμο γήρας και καταστρέφονται μέσω φαγοκυττάρωσης. Ωστόσο, στο σύντομο χρόνο ζωής τους, η φωσφατιδυλσερίνη προσφέρει θέσεις πρόσδεσης και ενεργοποίησης του παράγοντα X και του συμπλέγματος προθρομβινάσης με τελικό αποτέλεσμα το σχηματισμό θρομβίνης [42, 56-58].

Στη θαλασσαιμία τα παθολογικά ερυθρά συμπεριφέρονται ως ενεργοποιημένα αιμοπετάλια.

Πειραματικές εργασίες κατέδειξαν ότι η αννεξίνη V, η οποία συνδέεται με αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια, αναχαιτίζει την ενεργοποίηση της πήξης από τα ερυθροκύτταρα των ασθενών με θαλασσαιμία και μειώνει την έκφραση των δεικτών ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων [54].

In vitro, τα ερυθρά των ασθενών με θαλασσαιμία παρουσιάζουν αυξημένη συγκολλητικότητα εμφανίζοντας εικόνα rouleaux. Το μέγεθος όμως των rouleaux ερυθροκυττάρων μειώνεται μετά από πρόσμιξη με φυσιολογικά ερυθρά γεγονός που εξηγεί και τη μεγαλύτερη συχνότητα θρομβωτικών επεισοδίων σε ασθενείς με ενδιάμεση θαλασσαιμία, που δεν υποβάλλονται σε συστηματικές μεταγγίσεις [60].



Σχήμα 22. Διαταραχές ερυθροκυτταρικής μεμβράνης στη θαλασσαιμία. The hypercoagulable state in thalassemia. Amiram Eldor, and Eliezer A. Rachmilewitz. Blood 2002;99:36-43 [42].

Συμπερασματικά, η μελέτη των ερυθροκυττάρων των ασθενών με θαλασσαιμία κατέδειξε ότι οι ανακατατάξεις των λιπιδίων της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης σε συνδυασμό με το συνυπάρχον οξειδωτικό stress έχουν ως αποτέλεσμα ενεργοποίηση του καταρράκτη της πήξης.

Η ομάδα ασθενών με θαλασσαιμία με τις σοβαρότερες διαταραχές αυτού του τύπου είναι οι ασθενείς που δεν μεταγγίζονται συστηματικά και έχουν υποβληθεί σε σπληνεκτομή με αποτέλεσμα να έχουν το μεγαλύτερο αριθμό παθολογικών ερυθρών (ερυθροβλαστών) στο αίμα [62-64].

2. Ενεργοποίηση αιμοπεταλίων

Πολλαπλές in vitro μελέτες έχουν καταδείξει ότι τα αιμοπετάλια των ασθενών με θαλασσαιμία παρουσιάζουν διαταραχές που κατά κύριο λόγο αφορούν: την επιβίωση, τον αριθμό, τη λειτουργικότητα και την ενεργοποίησή τους [65, 67]. Παρατηρήθηκε σημαντική βράχυνση του χρόνου επιβίωσης των αιμοπεταλίων σε ασθενείς με μείζονα και ενδιάμεση θαλασσαιμία με ή χωρίς σπληνεκτομή. Το φαινόμενο αυτό αποδόθηκε στην αυξημένη κατανάλωση αιμοπεταλίων λόγω της χρόνιας υπερπηκτικής κατάστασης [65].

Στους ασθενείς με β-θαλασσαιμία που υποβάλλονται σε σπληνεκτομή εμφανίζεται θρομβοκυττάρωση όπως συμβαίνει και στο γενικό πληθυσμό. Ενώ όμως στον υγιή πληθυσμό ο αριθμός των αιμοπεταλίων επανέρχεται

σύντομα στα φυσιολογικά όρια, στους ασθενείς με θαλασσαιμία η συνυπάρχουσα αναιμία συντηρεί τη θρομβοκυττάρωση για πολλά έτη μετά τη σπληνεκτομή. Σε κλινικές μελέτες έχει επανειλημμένα τονισθεί ότι η συχνότητα των θρομβωτικών επεισοδίων είναι μεγαλύτερη στους σπληνεκτομηθέντες ασθενείς [122-124]. Η επιμένουσα θρομβοκυττάρωση αποτελεί μια από τις σημαντικότερες αιτίες θρομβογένεσης [122-124].

Υπάρχει μεγάλος αριθμός μελετών in vitro, οι οποίες έχουν καταδείξει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων σε ασθενείς με β-θαλασσαιμία με ή χωρίς σπληνεκτομή.

- 1) Με κυτταρομετρία ροής έχει βρεθεί αυξημένη έκφραση των μορίων ενεργοποίησης CD62P (P-selectin) και CD63 [68].
- 2) Η χρόνια ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων αποδεικνύεται και από την αύξηση της θρομβοξάνης (TXB₂), του αιμοπεταλιακού παράγοντα 3 και 4 (PF₃, PF₄) και της β-θρομβογλοβουλίνης (β-Thromboglobulin) στον ορό και των μεταβολιτών της προστακυκλίνης (PGI₂) και θρομβοξάνης (TXA₂) στα ούρα [66].
- 3) Η ασθενής απάντηση των αιμοπεταλίων των ασθενών με θαλασσαιμία in vitro σε αγωνιστές όπως το κολλαγόνο, η επινεφρίνη και το ADP αποδίδεται στη χρόνια ενεργοποίησή τους, χωρίς δυνατότητες περαιτέρω εξωγενούς ενεργοποίησης [67].

Μελέτες επίσης κατέδειξαν ότι σε ασθενείς με θαλασσαιμία, ιδιαίτερα στους σπληνεκτομηθέντες, υπάρχει αυξημένος αριθμός κυκλοφορούντων μικροσωματιδίων προερχόμενα από ενεργοποιημένα αιμοπετάλια ικανά να συνεισφέρουν στην υπερπηκτική κατάσταση της νόσου [72-73].

3. Ενεργοποίηση μονοκυττάρων-ουδετεροφίλων

Η ενεργοποίηση των μονοκυττάρων παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση ή τη βλάβη των ενδοθηλιακών κυττάρων σε ασθενείς με θαλασσαιμία στους οποίους παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα παράγοντα που διεγείρει τις αποικίες των μονοκυττάρων (M-CSF) καθώς και αυξημένη φαγοκυτταρική δραστηριότητα των μονοκυττάρων έναντι των ερυθρών αιμοσφαιρίων [74].

Αυξημένη φαγοκυτταρική δραστηριότητα παρατηρήθηκε και στα ουδετερόφιλα των ασθενών με θαλασσαιμία, ιδιαίτερα εκείνων ηλικίας άνω των 5 ετών [75]. Απομάκρυνση των λευκοκυττάρων μέσω των ειδικών φίλτρων βελτίωσε τις δοκιμασίες της αναπνευστικής λειτουργίας, σε διάστημα έξι μηνών, σε ασθενείς με θαλασσαιμία, αποδεικνύοντας την βλαπτική επίδραση των ενεργοποιημένων ουδετεροφίλων στους πνεύμονες των ασθενών με θαλασσαιμία [76].

Η ενεργοποίηση των μονοκυττάρων-ουδετεροφίλων αποκτά ιδιαίτερη σημασία σε καταστάσεις λοίμωξης ή φλεγμονής κατά τη διάρκεια των οποίων ενισχύεται η υπερπηκτικότητα της θαλασσαιμίας.

4. Ενεργοποίηση ενδοθηλιακών κυττάρων

Το αγγειακό ενδοθήλιο παρεμβάλλεται μεταξύ του υποενδοθηλιακού ιστού και του αίματος, δεν αποτελεί απλά μια διαχωριστική μεμβράνη αλλά ζωντανό ιστό με σύνθετες και θεμελιώδους σημασίας λειτουργίες, όπως η συμμετοχή στη ρύθμιση της πήξης, της αιματικής ροής, του τόνου των αγγείων και των ανοσολογικών αντιδράσεων, μέσω της σύνθεσης και της έκφρασης ποικίλων μορίων και παραγόντων.

Η αιμοσφαιρίνη και η αίμη, προϊόντα καταστροφής των ερυθροκυττάρων στο πλάσμα ή στον ορό των ασθενών με θαλασσαιμία, καθώς και ο ελεύθερος σίδηρος (NTBI) προκαλούν ενεργοποίηση ή βλάβη των ενδοθηλιακών κυττάρων με αποτέλεσμα υψηλή έκφραση ενδοθηλιακών πρωτεϊνών προσκόλλησης και συγκεκριμένα του ενδοκυτταρίου μορίου προσκόλλησης 1 (Intercellular Adhesion Molecule-1, ICAM1), του μορίου προσκόλλησης του αγγειακού παράγοντα (Vascular Cell Adhesion Molecule-1, VCAM-1), της E- και P-σελεκτίνης, του παράγοντα von Willebrand και της θρομβομοντουλίνης [77-78, 83].

In vitro, σε κυτταροκαλλιέργειες, τα ερυθροκύτταρα ασθενών με β-θαλασσαιμία και ενδιάμεση β-θαλασσαιμία εμφανίζουν κατά 10 έως 25 φορές μεγαλύτερη προσκόλληση στα ενδοθηλιακά κύτταρα [79].

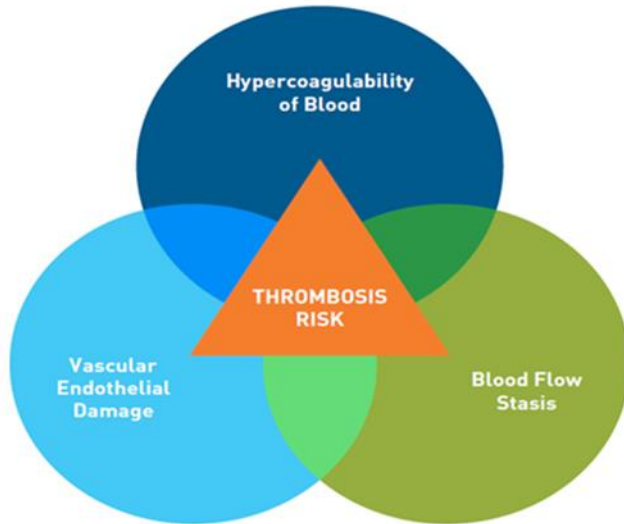
Επιπλέον, στους ασθενείς με θαλασσαιμία βρέθηκαν να κυκλοφορούν ελεύθερα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία διαπιστώθηκε ότι εκφράζουν πλην των ενδοθηλιακών πρωτεϊνών προσκόλλησης (ICAM-1, VCAM-1) και μόρια του ιστικού παράγοντα (TF) [80] ο οποίος αφενός μεν συμβάλλει στην ενεργοποίηση του μηχανισμού της πήξης και περαιτέρω της θρόμβωσης μέσω του παράγοντα VII [82], αφετέρου προσελκύει στα σημεία της εστιακής βλάβης κυρίως λευκοκύτταρα [81].

Μελέτες των τελευταίων ετών, αναδεικνύουν το ρόλο της φλεγμονής στις βλάβες του ενδοθηλίου. Αυξημένες τιμές προ-φλεγμονωδών κυτοκίνων, όπως η IL-6 [86], καθώς και αυξημένες τιμές δεικτών φλεγμονής όπως η CRP [84-85] παρατηρήθηκαν σε ασθενείς με θαλασσαιμία. Ειδικά η CRP πιστεύεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην αγγειακή νόσο προάγοντας την προ-φλεγμονώδη αντίδραση.

Στο ήδη ενεργοποιημένο ενδοθήλιο των ασθενών με θαλασσαιμία, ιδιαίτερα εκείνων που δεν μεταγγίζονται συστηματικά και συνυπάρχει το στοιχείο της αιμόλυσης, ενώ παράλληλα οι ασθενείς αυτοί έχουν βαριά αιμοσιδήρωση (υψηλά επίπεδα φερριτίνης, NTBI), είναι προφανής η περαιτέρω επιβάρυνση και μεγιστοποίηση της βλάβης από τα συστηματικά νοσήματα, όπως είναι η παχυσαρκία, η υπέρταση, η υπερλιπιδαιμία, ο σακχαρώδης διαβήτης και από το μη υγιεινό τρόπο ζωής (κάπνισμα, έλλειψη άσκησης).

5. Κληρονομικοί παράγοντες θρομβοφιλίας - Ενεργοποίηση των παραγόντων πήξης

Στα μέσα του 19ου αιώνα ο Virchow πρότεινε για την ερμηνεία της παθογένεσης των θρομβωτικών διαταραχών την κλασική πλέον τριάδα που περιλαμβάνει: στάση, βλάβη του ενδοθηλίου και υπερπηκτική κατάσταση.



Σχήμα 23. Τριάδα του Virchow

Ο ρόλος της στάσης και της αγγειακής βλάβης στην παθογένεια της θρόμβωσης μελετήθηκαν εξονυχιστικά στα επόμενα 100 χρόνια. Πολύ πιο πρόσφατα, η καλύτερη κατανόηση του καταρράκτη της πήξης, σε συνδυασμό με την πρόοδο της μοριακής διερεύνησης, κατάφερε να αποσαφηνίσει πολλές από τις «υπερπηκτικές καταστάσεις» του Virchow, ιδιαίτερα τις κληρονομούμενες διαταραχές που συνδυάζονται με τη θρόμβωση.

Ο όρος θρομβοφιλία χρησιμοποιείται σήμερα για να περιγράψει την αυξημένη τάση για φλεβική κυρίως θρομβοεμβολή, ως συνέπεια διαταραχής στο σύστημα της πήξης.

Οι θρομβοφιλικές διαταραχές μπορεί να είναι κληρονομικές ή επίκτητες. Οι αιτίες κληρονομικής θρομβοφιλίας [90,95-96] περιλαμβάνουν μια ομάδα απολύτως κληρονομούμενων διαταραχών, όπως οι ανεπάρκειες των φυσικών αντιπηκτικών (αντιθρομβίνη, πρωτεΐνη C, πρωτεΐνη S) από ποικίλες γενετικές βλάβες, ο παράγοντας V Leiden και η μετάλλαξη G20210A της προθρομβίνης και μια δεύτερη με πολυπαραγοντικές και τουλάχιστον μερικώς κληρονομούμενες διαταραχές. Βασικοί παθογενετικοί μηχανισμοί της κληρονομικής θρομβοφιλικής διάθεσης είναι η ελάττωση των φυσικών αντιπηκτικών αφενός και η αυξημένη δραστηριότητα παραγόντων της πήξης αφετέρου. Η ανεπάρκεια των φυσικών αντιπηκτικών, τα οποία παίζουν

σημαντικό ρόλο στην αδρανοποίηση παραγόντων, αναστέλλοντας έτσι την πήξη, οδηγεί σε αύξηση της παραγωγής θρομβίνης και σημαντική προδιάθεση για θρόμβωση.

Η συνολική επίπτωση της αυστηρά κληρονομικής θρομβοφιλίας είναι περίπου 10% στο γενικό πληθυσμό και 24% - 37% σε ασθενείς με φλεβική θρομβοεμβολή [95-96]. Οι συχνότερες (και ηπιότερες) συγγενείς θρομβοφιλίες, FV Leiden και μετάλλαξη FII G20210A, ανευρίσκονται περίπου στο 50% των περιπτώσεων θρομβοφιλίας στους Καυκάσιους [95-96]. Ελλείψεις των PC, PS και AT είναι υπεύθυνες για τις περισσότερες από τις υπόλοιπες, ενώ εξαιρετικά σπάνιες είναι οι λειτουργικές διαταραχές του ινωδογόνου, οι δυσινωδογοναιμίες. Η επίπτωση της ανεπάρκειας των φυσικών ανασταλτών στο γενικό πληθυσμό είναι εξαιρετικά μικρή, $\leq 1\%$, ενώ σε ασθενείς με εν τω βάθει φλεβοθρόμβωση ανέρχεται σε 7-13% [95-96,97]. Η ανεπάρκεια PC, PS, AT πολλαπλασιάζει το σχετικό κίνδυνο ανάπτυξης θρομβοεμβολικού επεισοδίου σε σχέση με το γενικό πληθυσμό κατά 7.3, 8.5 και 8.1 φορές αντιστοίχως. Η ανεπάρκεια της AT συσχετίζεται με υποτροπιάζοντα θρομβοεμβολικά επεισόδια [95-96,97].

Οι μελέτες που αναφέρονται στον επιπολασμό των κληρονομικών θρομβοφιλικών παραγόντων σε ασθενείς με μείζονα και ενδιάμεση θαλασσαιμία είναι περιορισμένες και δεν καταδεικνύουν διαφορές, σε σχέση με το γενικό πληθυσμό [99-102].

Σε μελέτες από την Ανατολική Μεσόγειο η συχνότητα των μεταλλάξεων της προθρομβίνης (G20210A), του παράγοντα V Leiden (G1691A) και της MTHFR (C677T) δεν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τις ομάδες ελέγχου [99-102]. Οι Zalloua και συνεργάτες αναφέρουν ότι, από 50 ασθενείς με ενδιάμεση β-θαλασσαιμία, οι 4 (8%) παρουσίασαν κάποιο θρομβοεμβολικό επεισόδιο, εκ των οποίων οι 2 ήταν ετεροζυγώτες της μετάλλαξη MTHFR C677T [99]. Οι Rahimi και συνεργάτες σε 158 πάσχοντες με β-θαλασσαιμία (μείζονα και ενδιάμεση), δεν αναφέρουν θρομβοεμβολικό επεισόδιο σε κανένα από τους φορείς των αντίστοιχων μεταλλάξεων [100]. Τέλος η σύγκριση δύο όμοιων ομάδων πολυμεταγγιζόμενων ασθενών με θετικό και αρνητικό ιστορικό θρομβοεμβολικής νόσου αντίστοιχα, δεν αποκάλυψε σημαντική διαφορά στη συχνότητα των θρομβοφιλικών μεταλλάξεων, αποδεικνύοντας ότι η παρουσία θρομβοφιλικών μεταλλάξεων σε θαλασσαιμικούς ασθενείς δεν αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου στην εκδήλωση θρομβοεμβολικού επεισοδίου [102].

Σημαντική μείωση των επιπέδων των φυσικών αναστολέων της πήξης (PC, PS, AT) παρατηρείται σε ασυμπτωματικούς ασθενείς με θαλασσαιμικά σύνδρομα. Σε μελέτη ομάδας ασθενών με μείζονα θαλασσαιμία η δραστηριότητα των PC και PS βρέθηκε μειωμένη ήδη από την παιδική ηλικία [103]. Ο έλεγχος και η σύγκριση της δραστηριότητας των παραπάνω αναστολέων πήξης σε διαφορετικές ηλικιακές ομάδες (ενήλικες και παιδιά) έδειξε ότι, η δραστηριότητα της PC και της PS ήταν σημαντικά μειωμένη και στις

δύο ομάδες σε σχέση με ομάδα ελέγχου ($p < 0.001$) [104]. Τα ευρήματα αυτά δεν αποδόθηκαν σε ηπατική δυσλειτουργία, γεγονός που επιβεβαιώνεται και σε μεταγενέστερες μελέτες [105-107].

Παρόμοια ευρήματα σε ασθενείς με μείζονα θαλασσαιμία αναφέρονται σε βιβλιογραφικές αναφορές με συσχέτιση των χαμηλών επιπέδων PC ή και PS με την πρόοδο της ηλικίας, τα αυξημένα επίπεδα φερριτίνης [108], το θετικό ιστορικό σπληνεκτομής [106,109] και τη μειωμένη συχνότητα μεταγγίσεων [107]. Μειωμένα επίπεδα δραστηριότητας PC και PS αναφέρονται και σε ασθενείς με ενδιάμεση θαλασσαιμία, παιδιά και ενήλικες. Τέλος σε πρόσφατη μελέτη αναφέρεται μειωμένη δραστηριότητα της πρωτεΐνης Z, που λειτουργεί ως συμπάραγοντας στην αναστολή του παράγοντα Xa, χωρίς όμως να διευκρινίζεται ο ρόλος της στην παθογένεια της υπερπηκτικότητας στη θαλασσαιμία [105].

Μειωμένη δραστηριότητα της AT επίσης αναφέρεται σε μελέτες θαλασσαιμικών ασθενών με μείζονα ή ενδιάμεση θαλασσαιμία, με συσχέτιση των μειωμένων επιπέδων με την αύξηση της ηλικίας [103], τα αυξημένα επίπεδα φερριτίνης [108], το θετικό ιστορικό σπληνεκτομής [108-109,122] και την ύπαρξη ηπατικής δυσλειτουργίας [108]. Σε κάποιες βιβλιογραφικές αναφορές δεν επιβεβαιώνεται η συσχέτιση μειωμένων επιπέδων AT και σπληνεκτομής [110,113], ενώ σε κάποιες άλλες η δραστηριότητα της AT παραμένει σε φυσιολογικά επίπεδα σε σχέση με τους υπόλοιπους φυσικούς αναστολείς της πήξης που παρουσιάζουν μειωμένη δραστηριότητα [104,106,113,114].

Περιορισμένες αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία αναλύουν τα επίπεδα των παραγόντων πήξης και τη συμβολή τους στη χρόνια κατάσταση υπερπηκτικότητας στη θαλασσαιμία. Μειωμένα επίπεδα ινωδογόνου αναφέρονται σε ασθενείς με β-θαλασσαιμία / HbE [112-113], ενώ φυσιολογικά επίπεδα παρουσίασε ομάδα παιδιών με μείζονα β-θαλασσαιμία [103]. Σε άλλη μελέτη τα επίπεδα προθρομβίνης βρέθηκαν σημαντικά χαμηλότερα σε ενήλικες και παιδιά με μείζονα β-θαλασσαιμία σε σχέση με ομάδα ελέγχου, ενώ οι παράγοντες V, VII, X βρισκόταν σε φυσιολογικά επίπεδα στην ίδια ομάδα ασθενών [104]. Αντίθετα τα επίπεδα προθρομβίνης σε ομάδα ασθενών με β-θαλασσαιμία / HbE ήταν φυσιολογικά, όπως και τα επίπεδα των παραγόντων VII, IX και XI, με μικρή μείωση των αντίστοιχων επιπέδων των παραγόντων V και VIII στους σπληνεκτομηθέντες ασθενείς σε σχέση με την ομάδα ελέγχου [112].

Διαταραχές στους δείκτες σχηματισμού θρομβίνης και ινωδόλυσης έχουν παρατηρηθεί σε μεγάλο αριθμό ασυμπτωματικών ατόμων με θαλασσαιμία.

Το 1999 οι Eldor και συνεργάτες αναφέρουν σημαντική αύξηση συμπλεγμάτων θρομβίνης – προθρομβίνης (TAT) στο 50% ασυμπτωματικών ασθενών με μείζονα β-θαλασσαιμία, ακόμη και σε μικρές ηλικίες, αλλά φυσιολογικά επίπεδα F1+2 [104]. Το 2000 οι Carpellini και συνεργάτες, αναφέρουν σε ομάδα σπληνεκτομηθέντων ασθενών με ενδιάμεση β-θαλασσαιμία στατιστικά σημαντικά υψηλότερα επίπεδα τμήματος προθρομβίνης (F1+2), ινωδοπεπτιδίου A (FPA) και δ-διμερών (D-dimers), σε

σχέση με τους ασθενείς με ανέπαφο σπλήνα [122]. Η συσχέτιση της διαταραχής σχηματισμού θρομβίνης και ινωδόλυσης με τη σπληνεκτομή αναφέρεται και σε μελέτες ασθενών με β-θαλασσαιμία / HbE, ενώ επιπρόσθετο εύρημα στην ίδια ομάδα αποτελεί η διαπίστωση αυξημένων επιπέδων TAT [112-113]. Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, επιπλέον στοιχεία διαταραχής στο μηχανισμό ινωδόλυσης αποτελούν τα αυξημένα επίπεδα του t-PA και του PAI-1 σε σπληνεκτομηθέντες ασθενείς με β MA / HbE [113]. Τέλος ελαττωμένα επίπεδα του αναστολέα ινωδόλυσης ενεργοποιούμενου από τη θρομβίνη (TAFI) διαπιστώθηκαν σε ανάλογη ομάδα ασθενών [112].

Η παρουσία αντιφωσfolιπιδικών αντισωμάτων (LA, ACA) έχει αναφερθεί στον ορό θαλασσαιμικών ασθενών, ωστόσο η φύση των αντισωμάτων αυτών και η συνύπαρξη HCV λοίμωξης δεν έχει διευκρινιστεί [115]. Οι Giordano και συνεργάτες αναφέρουν ότι το 34% ομάδας πολυμεταγγιζόμενων ασθενών εμφάνισε θετικά αντισώματα έναντι β2-γλυκοπρωτεΐνης Ι, τα οποία συσχετίστηκαν με συνύπαρξη HCV λοίμωξης [115]. Παρόμοια ευρήματα αναφέρουν οι Sharma και συνεργάτες, σε 50 ασθενείς με μείζονα β-θαλασσαιμία, απ' τους οποίους το 16% είχε LA (+), το 6% IgM ACA και το 30% IgG ACA, με θετική συσχέτιση με HCV λοίμωξη. Ωστόσο κανένας από τους παραπάνω ασθενείς δεν εκδήλωσε κλινικά θρόμβωση [116]. Οι Kashef και συνεργάτες παρουσίασαν ανάλογα ποσοστά αντιφωσfolιπιδικών αντισωμάτων (LA και IgG ACA), χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά στα ποσοστά ACA μεταξύ των ασθενών που έπασχαν από HCV λοίμωξη και αυτών που ήταν οροαρνητικοί για τον ιό [117].

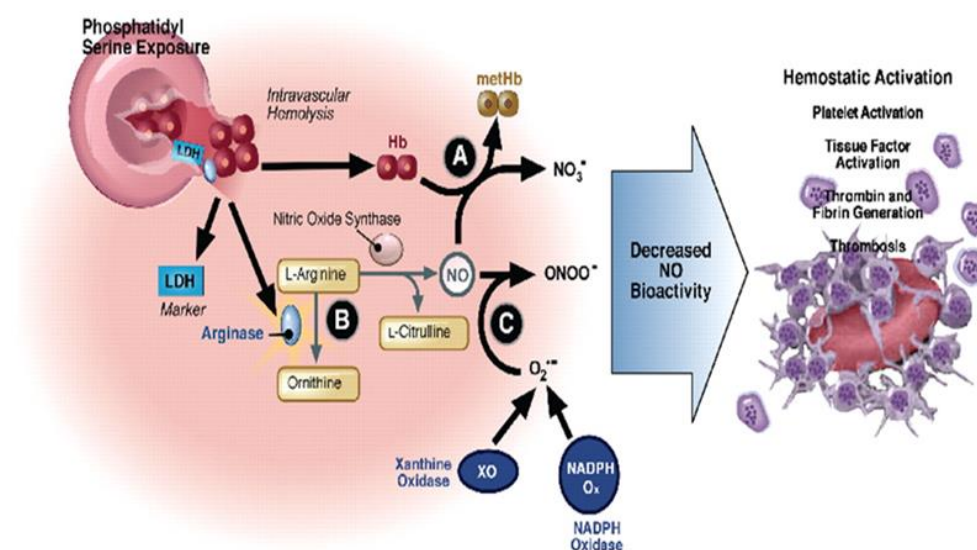
6. Σπληνεκτομή

Θρομβοεμβολικές επιπλοκές είναι συχνές στη θαλασσαιμία και ακόμη πιο συχνές σε σπληνεκτομημένους ασθενείς. Η θρομβοκυττάρωση που παρατηρείται μετά τη σπληνεκτομή, αλλά και η πηξιογόνος επίδραση των ανιονικών φωσfolιπιδίων της επιφάνειας των παθολογικών ερυθροκυττάρων και ερυθροβλαστών, καθώς και ο αριθμός των κυττάρων αυτών στην κυκλοφορία αυξάνεται με την απουσία του σπλήνα με επακόλουθη ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και του πηκτικού μηχανισμού. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει τη σημαντική συμμετοχή του σπληνός και το ρόλο της σπληνεκτομής στον αυξημένο κίνδυνο θρόμβωσης [122-124].

7. Αιμόλυση - Διαταραχές στην ομοιόσταση του μονοξειδίου του αζώτου (NO)

Οι ασθενείς με β-θαλασσαιμία παρουσιάζουν διαταραχές στην ομοιόσταση του μονοξειδίου του αζώτου (NO) οι οποίες οφείλονται στη χρόνια ενδοαγγειακή αιμόλυση (σχήμα 24) [125]. Η αιμοσφαιρίνη που παράγεται κατά την αιμόλυση προκαλεί κατανάλωση του NO. Το NO έχει ισχυρή αγγειοδιασταλτική δράση ενώ παράλληλα αναστέλλει την έκφραση του ιστικού

παράγοντα (TF) από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τη συσσώρευση και την προσκόλληση των αιμοπεταλίων. Η μείωση του NO έχει ως αποτέλεσμα ισχυρή αγγειοσύσπαση, ενώ παράλληλα συμβάλλει στην υπερπηκτικότητα που παρατηρείται στους ασθενείς με β-θαλασσαιμία.



Σχήμα 24. Δράσεις του NO. Hemolysis-associated hypercoagulability in sickle cell disease: the plot (and blood) thickens! Gladwin MT, Kato GJ. Haematologica. 2008 [125]

8. Άλλοι παράγοντες που προάγουν τη θρόμβωση στους ασθενείς με θαλασσαιμία

I. Υπερφόρτωση σιδήρου

Προκύπτει όταν η πρόσληψη σιδήρου αυξάνεται για μακρό χρονικό διάστημα, είτε ως αποτέλεσμα των μεταγγίσεων ερυθροκυττάρων, είτε λόγω αυξημένης απορρόφησης σιδήρου από την πεπτική οδό. Η υπερφόρτωση σιδήρου προκαλεί οξειδωτική βλάβη στους ιστούς και τα κύτταρα, με αποτέλεσμα εμφάνιση παθολογικών ερυθρών στο αίμα, όπως ήδη αναφέρθηκε [54-57].

II. Καρδιακή ανεπάρκεια-Αρρυθμίες

Ο Virchow, πριν από 150 χρόνια, αναγνώρισε τρεις προϋποθέσεις για θρομβογένεση:

- i. μη φυσιολογική ροή αίματος-στάση
- ii. βλάβη του ενδοθηλίου
- iii. υπερπηκτικότητα

Η παθοφυσιολογία της θρομβογένεσης στην καρδιακή ανεπάρκεια θα μπορούσε να εξηγηθεί στο πλαίσιο της τριάδας του Virchow [124]. Οι ασθενείς με θαλασσαιμία εμφανίζουν συχνά καρδιακή δυσλειτουργία κυρίως της αριστεράς κοιλίας, λόγω αιμοσιδήρωσης, αλλά και της δεξιάς κοιλίας λόγω πνευμονικής υπέρτασης. Η στάση του αίματος στις καρδιακές κοιλότητες έχει

ως αποτέλεσμα ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, ενεργοποίηση του μηχανισμού της πήξης και σχηματισμό ενδοκαρδιακών θρόμβων με φυσικό επακόλουθο θρομβοεμβολική νόσο [124].

III. Ενδοκρινικές διαταραχές

Διάφορες ορμονικές διαταραχές έχουν ενοχοποιηθεί για πρόκληση υπερπηκτικότητας, μέσω επίδρασης στην καρδιακή λειτουργία [125].

C. ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΗ ΓΙΑ ΘΡΟΜΒΩΣΗ - ΘΡΟΜΒΟΕΜΒΟΛΙΚΑ ΕΠΕΙΣΟΔΙΑ ΣΤΗ ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΑ

Η θρομβοφιλία μπορεί να εκδηλωθεί με διαφορετικές κλινικές εκδηλώσεις με σημαντικότερες την επιπολής ή εν τω βάθει φλεβοθρόμβωση, την πνευμονική εμβολή και την πνευμονική υπέρταση, την θρόμβωση σε ασυνήθεις περιοχές και θρομβώσεις σε μικρή ηλικία. Οι καθ' έξιν αποβολές, ο τοκετός νεκρού εμβρύου, οι επιπλοκές οι σχετιζόμενες με τη κύηση και πιθανά οι αρτηριακές θρομβώσεις αποτελούν επίσης εκδηλώσεις της.

Οι πρώτες αναφορές θρομβοεμβολικών επεισοδίων στους ασθενείς με θαλασσαιμία προέρχονται από τις αρχές της δεκαετίας του '80 σε νεκροψίες θαλασσαιμικών ασθενών, με ευρήματα αποφρακτικών βλαβών στις πνευμονικές αρτηρίες, σε ποσοστά έως και 44%. Το 1989 οι Zurlo και συνεργάτες σε μελέτη επιβίωσης 1087 Ιταλών ασθενών με μείζονα β-θαλασσαιμία, αναφέρουν ως κύρια αιτία θανάτου τη φλεβική θρόμβωση, στο 2,5% των ασθενών [40], ενώ σε πιο πρόσφατες πολυκεντρικές μελέτες η θρόμβωση παρουσιάζεται ως κύρια αιτία θανάτου σε ποσοστό 3,5- 4% των ασθενών. Στη διεθνή βιβλιογραφία περιγράφονται σποραδικές περιπτώσεις θρομβοεμβολικών επεισοδίων, κυρίως με μορφή πνευμονικής εμβολής, υποτροπιάζουσας αρτηριακής απόφραξης, εν τω βάθει και επιπολής φλεβικής θρόμβωσης άκρων, θρόμβωσης πυλαίας φλέβας και αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου. Έχει μάλιστα βρεθεί ότι οι ασθενείς με ενδιάμεση θαλασσαιμία υποφέρουν συχνότερα από θρομβοεμβολικές επιπλοκές σε σχέση με τους πάσχοντες από ομόζυγη θαλασσαιμία.

Τα δεδομένα που περιγράφουν τη συχνότητα εμφάνισης θρομβωτικών επεισοδίων σε ασθενείς με θαλασσαιμία είναι περιορισμένα.

1. Μία πολυκεντρική μελέτη που περιλάμβανε 9 κέντρα θαλασσαιμίας από την Ιταλία έδειξε ότι το 4% από τους 683 ασθενείς με μείζονα β-θαλασσαιμία και το 9,6% από τους 52 ασθενείς με ενδιάμεση θαλασσαιμία εκδήλωσε θρομβοεμβολικό επεισόδιο [127]. Υπήρξε μια μεγάλη ποικιλία στην εντόπιση: η κύρια εντόπιση (16/32) ήταν το ΚΝΣ, με κλινική εικόνα κεφαλαλγίας, επιληπτικών κρίσεων και ημιπάρεσης. Παρατηρήθηκαν επίσης θρομβωτικά επεισόδια στα πνευμονικά αγγεία (3 ασθενείς), μεσεντέρια αγγεία (1 ασθενής) και στη πυλαία κυκλοφορία (2 ασθενείς). Υπήρξαν 6 περιπτώσεις εν τω βάθει φλεβικής θρόμβωσης. Ενδοκαρδιακοί θρόμβοι βρέθηκαν σε 2 ασθενείς και

παρατηρήθηκαν κλινικά και εργαστηριακά σημεία διάχυτης ενδαγγειακής πήξης σε 2 άλλους, κατά τη διάρκεια εγκυμοσύνης [127]. Η ίδια ομάδα έδειξε έξι χρόνια αργότερα ότι το 1,1% των 720 ασθενών με μείζονα θαλασσαιμία σε επτά ιταλικά κέντρα είχε εκδηλώσει θρόμβωση [128].

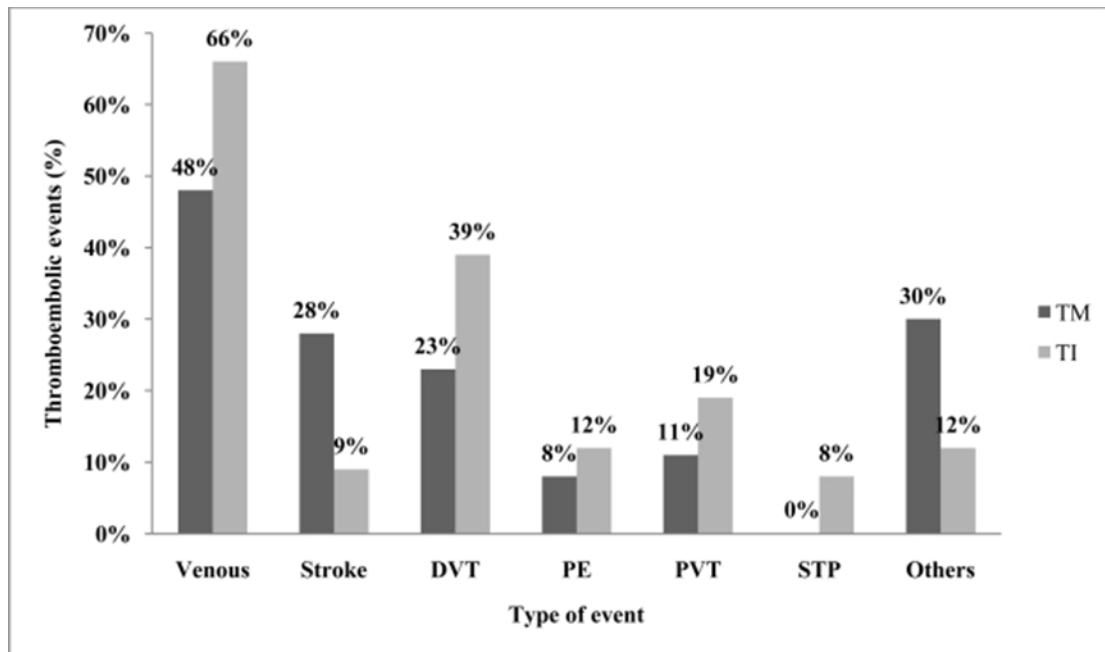
2. Σε μια προοπτική μελέτη που περιελάμβανε 23 ασθενείς με ενδιάμεση θαλασσαιμία (40 άνδρες και 43 γυναίκες, ηλικίας 23 ± 68 ετών, 58/83 σπληνεκτομημένοι) και 65 ασθενείς με μείζονα θαλασσαιμία (29 άνδρες και 36 γυναίκες ηλικίας 18 ± 35 ετών, 48/65 σπληνεκτομημένοι) έγινε αναδρομική μελέτη του κλινικού ιστορικού και των ιατρικών αρχείων για μια δεκαετία (1988 \pm 98) [129]. Οι συμβατικοί παράγοντες κινδύνου για φλεβική θρόμβωση συνήθως δεν υπήρχαν σε αυτούς τους ασθενείς. Συγκεντρώθηκαν πληροφορίες σχετικά με τα θρομβοεμβολικά επεισόδια. Η επίπτωση θρομβωτικού επεισοδίου σε ασθενείς με ενδιάμεση θαλασσαιμία και μείζονα θαλασσαιμία ήταν 29% και 2% αντίστοιχα [129]. Κανένας από τους ασθενείς με ενδιάμεση θαλασσαιμία δεν παρουσίασε επεισόδιο αρτηριακής θρομβοεμβολής. Παροδικό ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο παρατηρήθηκε σε έναν σπληνεκτομημένο ασθενή με μείζονα θαλασσαιμία στην ηλικία των 20 ετών [129].

3. Οι θρομβοεμβολικές εκδηλώσεις έχουν περιγραφεί και σε περιπτώσεις σειρών εγκύων γυναικών με ενδιάμεση β-θαλασσαιμία [132,133].

4. Από τις μεγαλύτερες μελέτες αποτελεί μια πολυκεντρική μελέτη με 8.860 ασθενείς, 2.190 με ενδιάμεση θαλασσαιμία και 6.670 ασθενείς με μείζονα θαλασσαιμία από την λεκάνη της Μεσογείου και το Ιράν. Στη μελέτη αυτή, οι Taher και συνεργάτες αναφέρουν ότι θρόμβωση παρουσίασε το 1.65% του συνόλου των ασθενών, το 3.9% των ασθενών με ενδιάμεση θαλασσαιμία και το 0.9% των ασθενών με μείζονα θαλασσαιμία [126].

Στο σύνολο των περιπτώσεων, φλεβοθρομβώσεις παρουσίασε το 57%, αρτηριακές θρομβώσεις το 40% και θρομβώσεις και στο αρτηριακό και στο φλεβικό σκέλος το 3%. Οι φλεβικές θρομβώσεις ήταν συχνότερες (66%) στους ασθενείς με ενδιάμεση θαλασσαιμία ενώ οι αρτηριακές ήταν σημαντικά συχνότερες στους ασθενείς με μείζονα θαλασσαιμία. Κατά σειρά συχνότητας αφορούσαν: εν τω βάθει φλεβοθρόμβωση (32%), εγκεφαλικά έμφρακτα (18%), θρόμβωση της πυλαίας φλέβας (16%), πνευμονική εμβολή (13%) και επιπολής θρομβοφλεβίτιδα (4.7%) (σχήμα 25) [126]. Υποτροπιάζοντα θρομβοεμβολικά επεισόδια παρουσίασε το 31.2% των ασθενών [126].

Η μέση ηλικία των ασθενών στο χρόνο που αυτοί παρουσίασαν θρομβοεμβολικό επεισόδιο ήταν τα 30 ± 13 έτη και στο σύνολο σχεδόν των περιπτώσεων (93%) είχαν σπληνεκτομηθεί. Η συχνότητα των θρομβωτικών επεισοδίων ήταν 4,38 φορές μεγαλύτερη ($p < 0,001$) στους ασθενείς με ενδιάμεση θαλασσαιμία, ενώ πιο συχνά εμφανιζόταν στις γυναίκες (53,8%), και σε ασθενείς που διατηρούσαν χαμηλή αιμοσφαιρίνη $< 9 \text{ gr/dl}$ (68%) [126].



Σχήμα 25. Τύπος θρομβοεμβολικών επεισοδίων στην ενδιάμεση θαλασσαιμία (TI) σε σύγκριση με τη μείζονα θαλασσαιμία (TM). DVT = εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση, PE = πνευμονική εμβολή, PVT = θρομβωση πυλαίας φλέβα, STP = επιφανειακή θρομβοφλεβίτιδα. Prevalence of thromboembolic events among 8,860 patients with thalassaemia major and intermedia in the Mediterranean area and Iran. Taher A, Isma'eel H, Mehio G, Bignamini D, Kattamis A, Rachmilewitz EA, Cappellini MD. *Thromb Haemost.* 2006 [126].

5. Στην Optimal Care Study, που είχε ως στόχο την επισκόπηση της πρακτικής στη διαχείριση των ασθενών με ενδιάμεση θαλασσαιμία με στόχο τη μείωση των επιπλοκών σε περιοχές ενδημικότητας της νόσου, μελετήθηκαν 584 ασθενείς με ενδιάμεση β-θαλασσαιμία (ασθενείς από έξι διαφορετικά κέντρα: Λίβανο, Ιταλία, Ιράν, Αίγυπτο, Ηνωμένα Αραβικά Εμιράτα και Ομάν) [134].

Η μελέτη έδειξε ότι η θρομβοεμβολική νόσος, κυρίως η φλεβική, ήταν η πέμπτη πιο συχνή επιπλοκή, επηρεάζοντας περίπου το 14% των ασθενών. Βασικοί ανεξάρτητοι παράγοντες κινδύνου για θρομβωτικά συμβάντα ήταν η σπληνεκτομή, η υπερφόρτωση σιδήρου (φερριτίνη ορού ≥ 1000 ng/ml), η ηλικία η μεγαλύτερη των 35 ετών και η τιμή της αιμοσφαιρίνης μικρότερη από 9 g/dl [134].

6. Στην αναδρομική ανασκόπηση των δεδομένων της Optimal Care Study οι μελετητές αποφάνθηκαν ότι οι σπληνεκτομημένοι ασθενείς με ενδιάμεση θαλασσαιμία που αναπτύσσουν θρομβοεμβολικό επεισόδιο χαρακτηρίζονται από υψηλό αριθμό ερυθροβλαστών ($\geq 300 \times 10^6/l$) και αιμοπεταλίων ($\geq 500 \times 10^9/l$), είναι πιο πιθανό να έχουν ενδείξεις πνευμονικής υπέρτασης και να μην μεταγγίζονται συστηματικά [135]. Η μελέτη εξέτασε επιπλέον τον χρόνο που χρειάστηκε ένα θρομβωτικό γεγονός να αναπτυχθεί μετά από σπληνεκτομή και διαπίστωσε ότι ο διάμεσος χρόνος μέχρι τη θρόμβωση είναι 8 έτη [135].

7. Ένα από τα κύρια όργανα που προσβάλλονται από την θρομβοεμβολική νόσο στη θαλασσαιμία όπως προαναφέρθηκε, είναι το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ). Η περιγραφή περιπτώσεων προσβολής του ΚΝΣ, απαντάται σε βιβλιογραφικές αναφορές από τη δεκαετία του 1970 [130]. Το 1972, οι Λογοθέτης και συνεργάτες περιέγραψαν την εκδήλωση νευρολογικών ελλειμμάτων συμβατών με παροδικά ισχαιμικά επεισόδια, στο 20% ενός συνόλου 136 θαλασσαιμικών ασθενών [130].

Ο επιπολασμός των αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων σε μη μεταγγισιοεξαρτώμενους ασθενείς με ιστορικό θρόμβωσης κυμαίνεται μεταξύ 5% -9% [126,129,136].

Στη διεθνή βιβλιογραφία λίγες αναφορές περιστατικών έχουν περιγράψει συχνή εμφάνιση αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων σε ασθενείς με ενδιάμεση β- θαλασσαιμία με σύνδρομο moyamoya [137-138].

Ωστόσο, υψηλότερος επιπολασμός σιωπηλών εγκεφαλικών εμφράκτων έχει τεκμηριωθεί σε ασθενείς με ενδιάμεση θαλασσαιμία [140].

Το 1999, μια από τις πρώτες μελέτες που διεξήχθη ανέδειξε την παρουσία, σε ποσοστό 37,5%, βλαβών ενδεικτικών σιωπηλών εμφράκτων στη μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου σε 16 ασυμπτωματικούς ασθενείς με ενδιάμεση β-θαλασσαιμία (διάμεση ηλικία 29 έτη), οι οποίοι δεν είχαν προδιαθεσικούς παράγοντες για αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο [141]. Στη μελέτη αυτή η συχνότητα εγκεφαλικής βλάβης αυξανόταν με την πρόοδο της ηλικίας και ήταν αντιστρόφως ανάλογη των επιπέδων αιμοσφαιρίνης. Οι βλάβες που παρατηρήθηκαν ήταν ήπια ατροφία στο 31% των περιπτώσεων, ισχαιμικές αλλοιώσεις κυρίως μικρού μεγέθους σε ποσοστό 25% των ασθενών, ενώ μετρίου και μεγάλου μεγέθους βλάβες βρέθηκαν στο 6,5% των πασχόντων. Η εντόπιση των βλαβών ήταν στη λευκή ουσία και τα βασικά γάγγλια [141].

Πιο πρόσφατα (2010), διεξήχθη μια μελέτη στο Λίβανο στην οποία οι ερευνητές χρησιμοποιώντας μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου μελέτησαν 30 σπληνεκτομημένους ενήλικες ασθενείς με ενδιάμεση β-θαλασσαιμία (διάμεση ηλικία 32 έτη) οι οποίοι επιλέχθηκαν από μια μεγαλύτερη ομάδα ασθενών με βάση την απουσία νευρολογικών σημείων και συμπτωμάτων και την απουσία παραγόντων κινδύνου για αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο [142]. Κανένα από τα άτομα δεν λάμβανε αντιαιμοπεταλιακή ή αντιπηκτική θεραπεία. Δεκαοκτώ ασθενείς (60%) είχαν απεικονιστικά ευρήματα ισχαιμίας με παρουσία μιας ή περισσότερων αλλοιώσεων, που αφορούσαν όλες την λευκή εγκεφαλική ουσία. Στους περισσότερους ασθενείς αναδείχτηκαν πολλαπλές βλάβες. Η μετωπιαία λευκή εγκεφαλική ουσία ήταν σχεδόν πάντα εμπλεκόμενη, ακολουθούμενη από την ινιακή και βρεγματική λευκή εγκεφαλική ουσία. Περίπου στο 94% των ασθενών ανευρέθηκαν βλάβες μικρού έως μετρίου μεγέθους (<1,5 cm) και σε μόνο ένα ασθενή βλάβη μεγάλου μεγέθους (> 1,5 cm). Η μεγάλη ηλικία και η απουσία μεταγγίσεων θεωρήθηκαν ως ανεξάρτητοι επιβαρυντικοί παράγοντες με υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης και μεγαλύτερο αριθμό βλαβών στην εγκεφαλική ουσία [142].

Άλλη μια μελέτη η οποία επίσης διεξήχθη στο Ιράν μελέτησε 30 τυχαία επιλεγμένους ενήλικες ασθενείς με ενδιάμεση β-θαλασσαιμία (διάμεση ηλικία 24 έτη), οι οποίοι είχαν υποβληθεί σε σπληνεκτομή και είχαν αριθμό αιμοπεταλίων $\geq 500 \times 10^9/l$ και επίπεδο αιμοσφαιρίνης >7 g/dL. Σιωπηλές ισχαιμικές αλλοιώσεις στην μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου παρατηρήθηκαν σε 8 ασθενείς (26,7%) [143].

Αν και οι προηγηθείσες μελέτες απέτυχαν να συμπεριλάβουν μια ομάδα ελέγχου, η συχνότητα εμφάνισης σιωπηλών εγκεφαλικών εμφράκτων που ανακαλύφθηκαν παρεμπιπτόντως σε απεικονίσεις εγκεφάλου υγιών ατόμων παρόμοιας ηλικιακής ομάδας (<50 ετών) κυμάνθηκε από 0% έως 11%, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι περιγραφείσες αλλαγές είναι παθολογικές και όχι φυσιολογικές παραλλαγές [142].

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι παρόμοιες παρατηρήσεις δεν παρατηρήθηκαν σε παιδιά με ενδιάμεση β-θαλασσαιμία [145].

Επιπλέον, μόνο μία μελέτη αξιολόγησε τον επιπολασμό των σιωπηλών εγκεφαλικών βλαβών σε 67 ασυμπτωματικούς ασθενείς με β-θαλασσαιμία / HbE (διάμεση ηλικία 31 έτη) και το ποσοστό ήταν επίσης υψηλό (24%). Κύρια εντόπιση ήταν η λευκή ουσία του εγκεφάλου. Στη μελέτη αυτή η επίπτωση των βλαβών ήταν μεγαλύτερη στους άντρες, αυξανόταν με την πρόοδο της ηλικίας, ενώ δεν υπήρχε συσχέτιση με τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης και το ιστορικό σπληνεκτομής [146].

Πιο πρόσφατα (2016), μια μελέτη που διεξήχθη σε 40 ασθενείς με β-θαλασσαιμία που υποβάλλονται σε τακτικές μεταγγίσεις έδειξε ότι οι συχνές μεταγγίσεις και ο χαμηλός αριθμός αιμοπεταλίων μπορεί να μην συνδέονται πάντα με χαμηλή συχνότητα σιωπηλών εγκεφαλικών βλαβών [147].

Τρεις ανεξάρτητες μελέτες αξιολόγησαν την ενδοκράνια ταχύτητα ροής αίματος σε νευρολογικά ασυμπτωματικούς ασθενείς με ενδιάμεση β-θαλασσαιμία χρησιμοποιώντας διακρανιακό Doppler. Όλες έδειξαν ότι οι μέσες ταχύτητες ροής στην ενδοκρανιακή κυκλοφορία των ασθενών με ενδιάμεση β-θαλασσαιμία ήταν υψηλότερες από τους υγιείς μάρτυρες αλλά ήταν χαμηλότερες από εκείνες που σχετίζονταν με κίνδυνο ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου σε ασθενείς με δρεπανοκυτταρική νόσο (>2 m/s) [145,148,149].

Μελέτες με τη χρήση ποζιτρονικού / αξονικού τομογράφου (PET-CT) και μαγνητικής αγγειογραφίας εγκεφάλου (MRA) έχουν επίσης διεξαχθεί πρόσφατα σε ασθενείς με ενδιάμεση β-θαλασσαιμία [150,151]. Μία μελέτη που περιελάμβανε 29 ασυμπτωματικούς, σπληνεκτομημένους ενήλικες ασθενείς, αποκάλυψε ότι το 27,6% των ασθενών είχε ευρήματα αρτηριακής στένωσης σε MRA. Σε δύο ασθενείς ανευρέθηκαν στενώσεις σε περισσότερες από μια αρτηρίες και η συνηθέστερα εμπλεκόμενη αρτηρία ήταν η έσω καρωτιδική αρτηρία. Μεταξύ των 12 ταυτοποιημένων στενωτικών βλαβών, 9 ήταν ήπιες ($\leq 50\%$ στένωση), 1 ήταν μέτρια (51% -75% στένωση) και οι υπόλοιπες 2 ήταν σοβαρές ($>75\%$ στένωση). Ο κίνδυνος ανάδειξης βλαβών

στην MRA ήταν μεγαλύτερος στους ασθενείς με χαμηλότερα επίπεδα αιμοσφαιρίνης και αυξημένα επίπεδα μη συνδεδεμένου με τρανσφερρίνη σιδήρου [150].

Η εξέταση PET-CT έδειξε ότι η μειωμένη νευρωνική λειτουργία είναι επίσης ένα συνηθισμένο εύρημα (63,3%) σε αυτόν τον πληθυσμό ασθενών. Εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στο αριστερό εγκεφαλικό ημισφαίριο και συνηθέστερα στο βρεγματικό και τον κροταφικό λοβό [151]. Ο κίνδυνος ανεύρεσης ανωμαλιών στο PET-CT βρέθηκε να είναι αυξημένος σε ασθενείς με υψηλή συγκέντρωση σιδήρου στο ήπαρ [151].

Επί του παρόντος δεν υπάρχουν δεδομένα για να προσδιοριστεί εάν οι παρατηρούμενες σιωπηλές εγκεφαλικές βλάβες σε ασθενείς με ενδιάμεση β-θαλασσαιμία είναι αληθινά σιωπηλές. Στο γενικό πληθυσμό και σε ασθενείς με δρεπανοκυτταρική νόσο, τα σιωπηλά εγκεφαλικά επεισόδια, η αρτηριακή στένωση στην MRA και η μειωμένη νευρωνική λειτουργία στο PET-CT έχουν όλα συσχετιστεί με επακόλουθο κίνδυνο ανάπτυξης έκδηλου αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου και ελλειμματική νοητική λειτουργία [140].

Συνοπτικά, από τις προαναφερθείσες μελέτες προκύπτει το συμπέρασμα ότι οι ασθενείς με θαλασσαιμία έχουν και κλινικά κριτήρια αυξημένης προδιάθεσης για θρόμβωση, ιδιαίτερα οι ασθενείς με ενδιάμεση θαλασσαιμία, όσοι έχουν σπληνεκτομηθεί και εκείνοι που δεν μεταγγίζονται συστηματικά. Η ισχυρή συσχέτιση μεταξύ σπληνεκτομής και θρομβωτικών επεισοδίων υπαγορεύει ότι η διαδικασία πρέπει να περιορίζεται στις περιπτώσεις κατά τις οποίες δεν υπάρχει διαθέσιμη εναλλακτική θεραπεία (συμπτωματική σπληνομεγαλία, υπερσπληνισμός).

Απαραίτητες είναι οι κλινικές μελέτες οι οποίες θα αξιολογήσουν τον ρόλο των αντιαιμοπεταλιακών, των αντιπηκτικών, της επαγωγής της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης (υδροξουρία), της μετάγγισης και της αποσιδήρωσης στην πρόληψη των θρομβοεμβολικών επεισοδίων στη θαλασσαιμία.

Ομάδες ασθενών με θαλασσαιμία υψηλού κινδύνου για θρόμβωση

Βάσει των επιδημιολογικών στοιχείων τα οποία αναφέρθηκαν και των παθοφυσιολογικών μηχανισμών υπερπηκτικότητας στη θαλασσαιμία που αναλύθηκαν, ασθενείς υψηλού κινδύνου για θρόμβωση φαίνεται να είναι:

- Ασθενείς ηλικίας >20 ετών.
- Ασθενείς με ενδιάμεση ή μείζονα θαλασσαιμία που δεν μεταγγίζονται συστηματικά και διατηρούν χαμηλά επίπεδα αιμοσφαιρίνης <9gr/dl ή/και υψηλό βαθμό αιμόλυσης.
- Ασθενείς που έχουν σπληνεκτομηθεί, ιδιαίτερα εκείνοι οι οποίοι διατηρούν υψηλό αριθμό αιμοπεταλίων και/ή ερυθροβλαστών στο αίμα.
- Ασθενείς με βαριά αιμοσιδήρωση.

- Ασθενείς με βαριά λοίμωξη.
- Ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια.
- Ασθενείς με ανεπάρκεια φυσικών ανασταλτών της πήξης.
- Ασθενείς που παράλληλα εμφανίζουν και άλλους θρομβοφιλικούς παράγοντες συγγενώς ή επίκτητως.

ΜΕΡΟΣ ΤΕΤΑΡΤΟ-ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ:

Βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν σημαντικές διαταραχές της αιμόστασης σε πάσχοντες από θαλασσαιμία, τόσο σε ασθενείς με μείζονα, ή ενδιάμεση όσο και σε ασθενείς με σοβαρή α - θαλασσαιμία, με αποτέλεσμα η νόσος να χαρακτηρίζεται ως υπερπηκτική κατάσταση.

Η υπερπηκτικότητα στην θαλασσαιμία έχει πολυπαραγοντική αιτιολόγηση. Διαταραχές του ενδοθηλίου, των κυττάρων του αίματος και των παραγόντων της πήξης ενοχοποιούνται για την παθογένεια της. Ειδικότερα, έχει περιγραφεί διαταραχή των λιπιδίων των ερυθρών με έκφραση μορίων φωσφατιδυλοσερίνης στην επιφάνειά τους, ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, όπως επίσης και των ενδοθηλιακών κυττάρων και των μονοκυττάρων και των ουδετεροφίλων. Ελλείψεις παραγόντων πήξης και των φυσικών ανασταλτών έχουν επίσης επισημανθεί στους θαλασσαιμικούς ασθενείς. Η χρόνια αιμόλυση μέσω της απελευθέρωσης μικροσωματιδίων και της επαγόμενης μείωσης του μονοξειδίου του αζώτου και η σπληνεκτομή στην οποία υποβάλλονται συχνά οι ασθενείς, συμβάλλουν επίσης στη διαταραχή της αιμόστασης.

Μέσα στα πλαίσια αυτά έχει περιγραφεί αυξημένο ποσοστό θρομβώσεων, τόσο φλεβικών, όσο και αρτηριακών στους θαλασσαιμικούς ασθενείς. Θρομβωτικά συμβάντα, συμπεριλαμβανομένων των σπάνιων θρομβωτικών επεισοδίων στον εγκέφαλο, έχουν περιγραφεί με υψηλότερη εμφάνιση στην ενδιάμεση θαλασσαιμία από ότι στη μείζονα θαλασσαιμία [42-49].

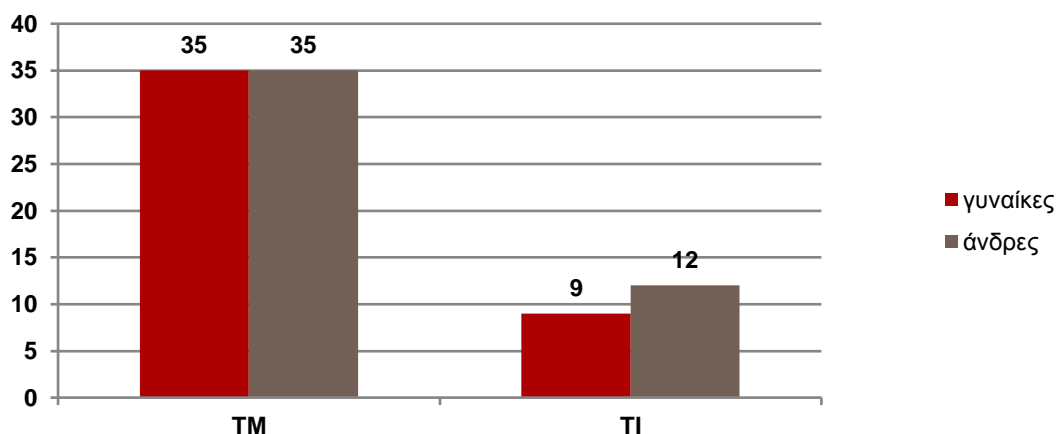
2.ΣΚΟΠΟΣ:

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν:

- 1) η μελέτη της αιμόστασης σε κοορτή θαλασσαιμικών ασθενών,
- 2) η εκτίμηση του επιπολασμού των θρομβοεμβολικών επεισοδίων στους θαλασσαιμικούς ασθενείς,
- 3) ο προσδιορισμός της συχνότητας των κληρονομικών ή επίκτητων διαταραχών πήξης στον πληθυσμό αυτό των ασθενών και
- 4) η συσχέτιση μεταξύ των θρομβοεμβολικών επεισοδίων και των διαταραχών της πήξης.

3.ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ:

Μελετήθηκαν 70 ασθενείς με μείζονα θαλασσαιμία (35 άνδρες, 35 γυναίκες, διάμεσης ηλικίας 39 ετών) και 21 ασθενείς με ενδιάμεση θαλασσαιμία (12 άνδρες, 9 γυναίκες, διάμεσης ηλικίας 45 ετών) που παρακολουθούνται τακτικά στη Μονάδα Μεσογειακής Αναιμίας του Β.Π.Γ.Ν.Η.



* TM=μείζονα θαλασσαιμία, TI=ενδιάμεση θαλασσαιμία

Γράφημα 1. Σύνολο θαλασσαιμικών ασθενών

Η διάμεση παρακολούθηση των ασθενών αυτών ήταν 36 έτη (2-53 έτη).

Η διάγνωση της νόσου των ασθενών βασίστηκε σε εργαστηριακά και κλινικά δεδομένα, καθώς και σε μοριακή ανάλυση των α και β γονιδίων.

Αίμα συλλέχθηκε σε σωληνάρια με κιτρικό οξύ για την εκτίμηση των παραγόντων πήξης και σε EDTA για τον προσδιορισμό των επιπέδων ομοκυστεΐνης και το γονιδιακό έλεγχο. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 4500rpm για 10min, ενώ μέρος αυτών υποβλήθηκε σε διπλή φυγοκέντρηση για ανάκτηση πλάσματος φτωχού σε αιμοπετάλια. Η επεξεργασία των δειγμάτων έγινε σε χρονικό διάστημα μικρότερο των 4 ωρών από την αιμοληψία.

Ακολούθησε ο προσδιορισμός των ακόλουθων παραμέτρων PT, INR, APTT, Fib, D-Dimers, FII, FX, FV, FVII, FVIII, vWFAg, FIX, FXI, FXII, ProtS (Free and Antigen), ProtC, AT, G20210AFII, FVLeiden, MTHFR C667T, Ομοκυστεΐνη και Αντιπηκτικά Λύκου. Χρησιμοποιήθηκε μέθοδος χρωμογόνου υποστρώματος για το προσδιορισμό της AT και της ProtC, χημειοφωταύγειας για την ομοκυστεΐνη και πηξιολογικές μέθοδοι για τις υπόλοιπες παραμέτρους στον αναλυτή TOP IL. Εφόσον η ανάλυση των ανωτέρω παραμέτρων δε γίνονταν άμεσα, δείγματα πλάσματος καταψύχονταν στους -20°C και μελετήθηκαν σε δεύτερο χρόνο. Για την απομόνωση DNA χρησιμοποιήθηκε

DNA isolation kit (Qiagen) και εν συνεχεία το προϊόν υβριδοποιήθηκε σε ταινίες που περιείχαν ειδικά αλληλία ολιγονουκλεοτιδίων.

Η συχνότητα των μεταλλάξεων FV1691A (Leiden) και Prothrombin (PTG20210A) προσδιορίστηκε σε 103 υγιείς μάρτυρες αντίστοιχου φύλου και ηλικίας.

Τα ιατρικά αρχεία των ασθενών ανασκοπήθηκαν αναδρομικά για μια εικοσαετία (1998-2018). Τα κλινικοεργαστηριακά δεδομένα που συλλέχθηκαν περιελάμβαναν τύπο θαλασσαιμίας, δημογραφικά στοιχεία (ηλικία και φύλο), ιστορικό σπληνεκτομής, είδος και εντόπιση θρομβοεμβολικού επεισοδίου, μέση αιμοσφαιρίνη (Hb) προ μετάγγισης, επίπεδα φερριτίνης ορού, τύπο θεραπείας (τακτικές μεταγγίσεις, αποσιδήρωση) (πίνακας 1).

Οι κύριες ενδείξεις για σπληνεκτομή ήταν υπερσπληνισμός, αυξημένες ανάγκες σε μετάγγιση αίματος και συμπτωματική σπληνομεγαλία.

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη δοκιμασία χ^2 .

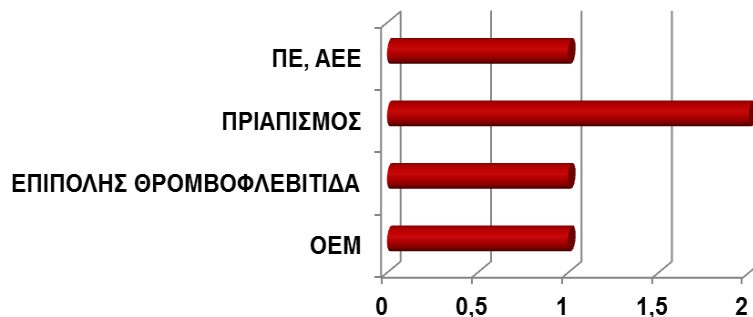
4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ :

Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών περιγράφονται στον πίνακα 1.

	Ενδιάμεση θαλασσαιμία (n=21)	Μείζονα θαλασσαιμία (n=70)	Σύνολο ασθενών (n=91)
Άνδρες, %	57.1 (12/21)	50.0 (35/70)	51.6 (47/91)
Γυναίκες, %	42.9 (9/21)	50.0 (35/70)	48.4 (44/91)
Διάμεση ηλικία κατά την θρόμβωση, έτη	35	38.5	37.5
Σπληνεκτομή, %	23.8 (5/21)	28.8 (20/70)	27.5 (25/91)
Τακτικά μεταγγιζόμενοι, %	38.1 (8/21)	100 (70/70)	85.7 (78/91)
Θρόμβωση, %	4.7 (1/21)	5.7 (4/70)	5.5 (5/91)

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά ασθενών

Από τους 70 ασθενείς με μείζονα θαλασσαιμία, ποσοστό 5.7% (4/70) και από τους 21 ασθενείς με ενδιάμεση θαλασσαιμία, ποσοστό 4.7% (1/21) εκδήλωσαν θρομβοεμβολικό επεισόδιο. Στο συνολικό πληθυσμό, τα θρομβοεμβολικά επεισόδια ήταν κατά 50% φλεβικά και κατά 50% αρτηριακά. Αναλυτικότερα, αφορούσαν πνευμονική εμβολή και αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο σε ένα ασθενή, πριαπισμό σε δύο ασθενείς, οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου σε ένα ασθενή και επεισόδια επιπολής θρομβοφλεβίτιδος σε ένα ασθενή.



Γράφημα 2. Θρομβωτικά επεισόδια στην κοορτή των θαλασσαιμικών ασθενών.

Η διάμεση ηλικία των ασθενών κατά την χρονική στιγμή εκδήλωσης του θρομβοεμβολικού επεισοδίου ήταν τα 37.5 έτη (35 έτη για τους ασθενείς με ενδιάμεση θαλασσαιμία και 38.5 έτη για τους ασθενείς με μείζονα θαλασσαιμία).

Ο ασθενής με ενδιάμεση θαλασσαιμία παρουσίασε φλεβική θρόμβωση, ενώ, αντίθετα, τα αρτηριακά συμβάντα ήταν σημαντικά πιο κοινά (60%) από τα φλεβικά συμβάντα σε ασθενείς με μείζονα θαλασσαιμία. Ο διάμεσος χρόνος εκδήλωσης του θρομβοεμβολικού επεισοδίου μετά από σπληνεκτομή ήταν 17.4 έτη (12-27 έτη).

Ο ασθενής με ενδιάμεση θαλασσαιμία που παρουσίασε θρομβοεμβολικό επεισόδιο ήταν σπληνεκτομημένος, είχε μέση τιμή αιμοσφαιρίνης >10 g/dl και δεν λάμβανε τακτικές μεταγγίσεις αίματος. Από τους 4 ασθενείς με μείζονα θαλασσαιμία που εκδήλωσαν θρομβοεμβολικό επεισόδιο, οι 3 (75%) είχαν υποβληθεί σε σπληνεκτομή και είχαν μέση τιμή αιμοσφαιρίνης > 10 g/dl.

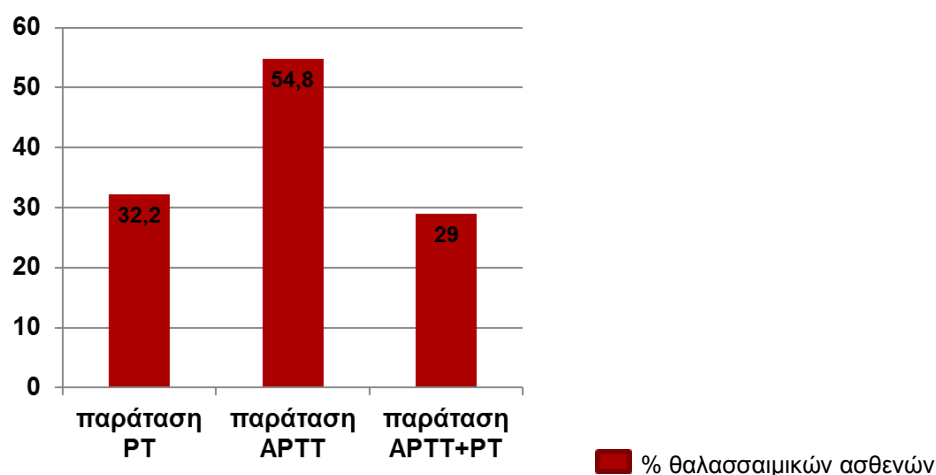
Όλοι οι ασθενείς με μείζονα θαλασσαιμία υποβάλλονταν σε πρόγραμμα τακτικών μεταγγίσεων με διάμεσες ανάγκες ετησίως 49 ΜΣΕ (18-69 ΜΣΕ). Από τους ασθενείς με ενδιάμεση θαλασσαιμία 8 υποβάλλονταν σε πρόγραμμα τακτικών μεταγγίσεων με διάμεσες ανάγκες ετησίως 41ΜΣΕ (18-57 ΜΣΕ) ενώ 5 μεταγγίζονταν περιστασιακά.

Συνολικά σε σπληνεκτομή είχαν υποβληθεί 25/91 (27.5%) ασθενείς, 20/70 (28.5%) ασθενείς με μείζονα θαλασσαιμία και 5/21 (23,8%) ασθενείς με ενδιάμεση θαλασσαιμία.

Προφυλακτική χορήγηση ασπιρίνης λάμβαναν όλοι οι ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε σπληνεκτομή.

Στο πλάσμα 31 ασθενών από το σύνολο των 91 ασθενών (16 άνδρες, 15 γυναίκες, διάμεσης ηλικίας 41 ετών) από τους οποίους 23 έχουν μείζονα θαλασσαιμία και υποβάλλονταν σε πρόγραμμα τακτικών μεταγγίσεων και 8 ενδιάμεση θαλασσαιμία προσδιορίστηκαν οι χρόνοι προθρομβίνης (PT), μερικής ενεργοποιημένης θρομβοπλαστίνης (APTT), ινωδογόνο (Fib) και επίπεδα διμερών ινώδους (D-Dimers). Μελετήθηκαν επίσης τα επίπεδα των παραγόντων FII, FV, FX, FVII, FXII, FXI, FIX, FVIII και vWFAg, των ανασταλτών Prot C, Prot S, ATIII και των αντιπηκτικών λύκου (LA).

Σε σημαντικό ποσοστό των ασθενών παρατηρήθηκαν διαταραχές του βασικού ελέγχου της πήξης. 54,8% εμφάνισαν παράταση του APTT (median APTT 35,6 s, Reference Range, (RR) 25-35 s), 32,2% του PT (median PT 13,2 s, RR 11-14 s), ενώ 29% είχαν παράταση PT και APTT.



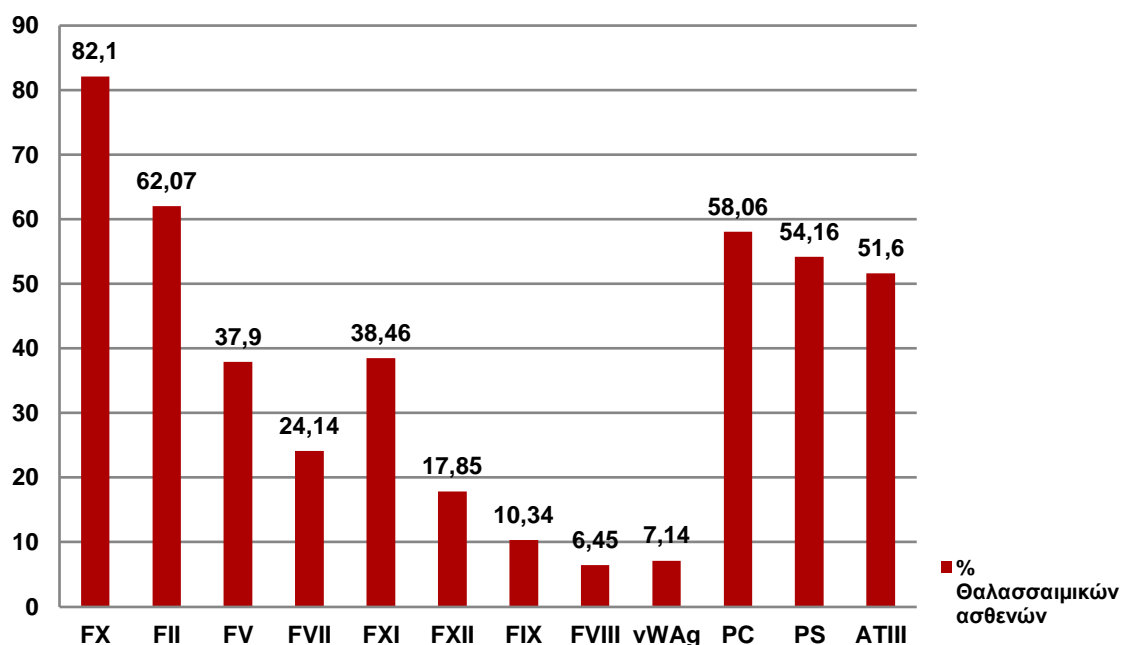
Γράφημα 3. Διαταραχές χρόνων πήξεως

Η πιο συχνή έλλειψη παραγόντων που διαπιστώθηκε ήταν στην κοινή οδό του FX σε ποσοστό 82,1% των ασθενών (median 59,8%, RR 77-131%) και ακολούθως του FII (median 69,2%, RR 79-131%) σε 62,07% των ασθενών, του FV στο 37,9% (median 67,3%, RR 62-139%) και FVII (median 62,2, RR 50-129%) σε 24,14% των ασθενών.

Η αξιολόγηση των παραγόντων της ενδογενούς οδού της πήξης ανέδειξε κυρίως ελλείψεις κυρίως στον FXI σε 38,46% των ασθενών (median 71,3%, RR 65-140%). 17,85% των ασθενών ελλείψεις σε FXII (median 69,35, RR 60-140%,), 10,34% σε FIX (median 94,3%, RR 60-140%), 6,45% σε FVIII

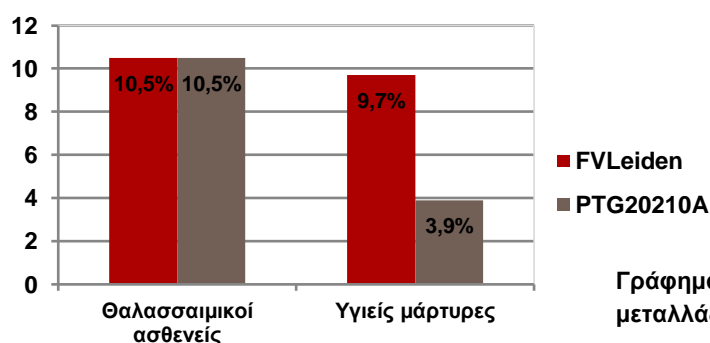
(median 108,1%, RR 50-140%) και 7,14% σε vWFAg (median 101,6%, RR 50-160%).

Διαπιστώθηκε επίσης συχνά μείωση στα επίπεδα των φυσικών ανασταλτών της πήξης, με 58,06% των ασθενών να έχουν χαμηλά επίπεδα Prot C:c (median 72,9%, RR 75-140%), 51,6% ελλείψεις ATIII:c (median 74,5, RR 75-140%) και 54,16% των ασθενών να έχουν χαμηλά επίπεδα Prot S:c (median 62,15%, RR 65-180%). Σε 1 ασθενή (3,22%), ανιχνεύτηκαν αντιπηκτικά λύκου.



Γράφημα 4. Διαταραχές παραγόντων πήξεως

Αναφορικά με την αναζήτηση θρομβοφιλικών γονότυπων σε ασθενείς με θαλασσαιμία μελετήθηκαν 57 από τους 91 ασθενείς με θαλασσαιμία, οι 49 είχαν μείζονα θαλασσαιμία και οι 8 ενδιάμεση θαλασσαιμία (26 άνδρες, 31 γυναίκες, διάμεσης ηλικίας 41 ετών) και 103 υγιείς μάρτυρες αντίστοιχου φύλου και ηλικίας. Η συχνότητα ύπαρξης της μετάλλαξης FV Leiden ήταν 10,5% (6/57) vs. 9,7% (10/103) (OR=1,09, CI= 0,39-3,18, $p=0,4$) και της PTG20210A 10,5% (6/57) vs. 3,9% (4/103) (OR=2,9, 95% CI= 0,79-10,79, $p=0,135$).



Γράφημα 5. Συχνότητα θρομβοφιλικών μεταλλάξεων

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην επίπτωση των συχνότερων θρομβοφιλικών μεταλλάξεων στους θαλασσαιμικούς ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες.

Η αναζήτηση των μεταλλάξεων FV1691A (Leiden) και PTG20210A (Prothrombin), η ανεπάρκεια της αντιθρομβίνης III, η ανεπάρκεια πρωτεΐνης C και S και η υπερομοκυστεϊναιμία πραγματοποιήθηκαν σε όλους τους ασθενείς με θαλασσαιμία με θρομβοεμβολικά επεισόδια (5/5). Από αυτούς τους ασθενείς, 3 (60%) βρέθηκαν να έχουν προδιαθεσικούς γενετικούς παράγοντες για θρόμβωση (3 παράγοντας VLeiden).

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:

Με την βελτίωση των προγραμμάτων τακτικών μεταγγίσεων, καθώς και της βέλτιστης παρακολούθησης και διαχείρισης της υπερφόρτωσης σιδήρου οι ασθενείς με θαλασσαιμία ζουν περισσότερο από ποτέ. Αντίστοιχα, η ιατρική κοινότητα αντιμετωπίζει νέες προκλήσεις όσον αφορά τη διάγνωση και τη θεραπεία επιπλοκών, όπως τα θρομβοεμβολικά φαινόμενα, που επιπλέκουν την κλινική πορεία των ασθενών, και των οποίων ο ρόλος ήταν μέχρι πρόσφατα ασαφής.

Η συχνότητα των θρομβοεμβολικών επεισοδίων στην κοορτή των θαλασσαιμικών ασθενών μας δε διαφέρει σε σχέση με τα διεθνή βιβλιογραφικά δεδομένα.

Οι παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη θρόμβωσης σε ασθενείς με θαλασσαιμία είναι η ηλικία (> 20 ετών), προηγούμενα θρομβοεμβολικά επεισόδια, οικογενειακό ιστορικό και η σπληνεκτομή.

Εργαστηριακοί παράμετροι που υποδηλώνουν αυξημένο κίνδυνο θρόμβωσης είναι ο υψηλός αριθμός αιμοπεταλίων, ο αυξημένος αριθμός στο αίμα ερυθροβλαστών και οι υψηλές τιμές φερριτίνης ορού.

Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ της παράτασης των χρόνων πήξης και χρόνιας ηπατοπάθειας. Η παράταση του PT σχετίζεται θετικά ($r=0,37$) με τον αριθμό των μονάδων συμπυκνωμένων ερυθρών που λάμβαναν οι ασθενείς. Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση με την ύπαρξη σπληνεκτομής.

Οι ασθενείς με θαλασσαιμία εμφανίζουν σημαντικές διαταραχές στον εργαστηριακό έλεγχο της πήξης. Αυτό δεν θα μπορούσε να οφείλεται σε συγγενείς βλάβες, λόγω αφενός μεν της υψηλότερης συχνότητας εμφάνισης των ελλείψεων παραγόντων πήξης σε σχέση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα και αφετέρου ενισχύεται από την ανυπαρξία ανάλογων βλαβών στα υγιή μέλη των οικογενειών των θαλασσαιμικών ασθενών. Η διαταραχή της ηπατικής βιολογίας, λόγω χρόνιας λοίμωξης, αιμοχρωμάτωσης, ένδειας διατροφικών παραγόντων δεν φαίνεται να αποτελεί τη μοναδική αιτία των μειωμένων

επιπέδων των παραγόντων πήξης και των ανασταλτών που παρατηρούνται στους ασθενείς. Η πρόσδεση των παραγόντων αυτών στην επιφάνεια αρνητικά φορτισμένων φωσφολιπιδίων που ανευρίσκονται στα ερυθρά των θαλασσαιμικών ασθενών, αποτελεί μια θελκτική ερμηνεία των ευρημάτων αυτής της μελέτης.

Η συχνότητα εμφάνισης των θρομβοφιλικών γονοτύπων δε διαφέρει μεταξύ των θαλασσαιμικών ασθενών και υγιών μαρτύρων στο πληθυσμό που μελετήθηκε.

Περιορισμό στη μελέτη μας αποτελούν ο μικρός αριθμός περιστατικών και η αναδρομική μελέτη των θρομβοεμβολικών επεισοδίων.

Βιβλιογραφία:

1. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. Schechter AN. *Blood*. 2008 Nov 15;112(10):3927-38.
2. The switch from fetal to adult hemoglobin. Sankaran VG, Orkin SH. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013; 3: a011643.
3. Thalassaemia: the long road from bedside to genome. Weatherall DJ. *Nat Rev Genet*. 2004; 5:625-631
4. A series of cases of splenomegaly in children and peculiar changes in bones; report of cases. Cooley TB, Lee P. *Am J Dis Child* 1927; 34: 347–63
5. Thalassemia. Cohen AR, Galanello R, Pennell DJ, Cunningham MJ, Vichinsky E. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2004:14-34.
6. Thalassaemia. Higgs DR, Engel JD, Stamatoyannopoulos G. *Lancet*. 2012 Jan 28;379(9813):373-83.
7. Thalassaemia. Taher AT, Weatherall DJ, Cappellini MD. *Lancet*. 2018 Jan 13;391(10116):155-167.
8. Clinical Classification, Screening and Diagnosis for Thalassemia. Viprakasit V, Ekwattanakit S. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2018 Apr;32(2):193-211.
9. Phenotype—genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. D. J. Weatherall. *Nature Reviews Genetics* volume 2, pages 245–255 (2001).
10. Haemoglobinopathies in Greece: prevention programme over the past 35 years. Loukopoulos D. *Indian J Med Res*. 2011; 134(4): 572–576
11. The inherited diseases of hemoglobin are an emerging global health burden. Weatherall DJ. *Blood* 2010; 115: 4331–36.
12. Changing patterns of thalassemia worldwide. Vichinsky EP. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1054:18–24.
13. Universal newborn screening for Hb H disease in California. Lorey F, Cunningham G, Vichinsky EP, et al. *Genet Test* 2001; 5: 93–100.
14. Asian immigration and public health in California: thalassemia in newborns in California. Lorey F. *J Pediatr Hematol Oncol* 2000; 22: 564–66.
15. Newborn screening for hemoglobinopathies in California. Michlitsch J, Azimi M, Hoppe C, et al. *Pediatr Blood Cancer*. 2009; 52: 486-490
16. The beta-thalassemias. Olivieri NF. *N Engl J Med* 1999; 341: 99–109.
17. Beta-thalassemia. Rund D, Rachmilewitz E. *N Engl J Med* 2005; 353: 1135–46.
18. Beta-thalassemia. Galanello R, Origa R. *Orphanet J Rare Dis* 2010; 5: 11.
19. Beta-thalassemia: from genotype to phenotype. Danjou F, Anni F, Galanello R. *Haematologica* 2011; 96: 1573–75.
20. The molecular basis of β -thalassemia. Thein SL. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013 May 1;3(5):a011700.

21. Molecular characterization of β -thalassemia in 174 Greek patients with thalassemia major. C. Kattamis, H. Hu, G. Cheng, et al. *Br. J. Haematol.* 74 (1990) 342–346.
22. β -Thalassemia mutations and the underlying β gene cluster haplotypes in the Greek population. P. Kolli, Ph. Karababa, K. Sinopoulou, et al. *Gene Geogr.* 6 (1992) 59-70.
23. The molecular heterogeneity of beta-thalassemia in Greece. Boussiou M, Karababa P, Sinopoulou K, Tsaftaridis P, Plata E, Loutradi-Anagnostou A. *Blood Cells Mol Dis.* 2008; 40:317-319.
24. How I treat thalassemia. Eliezer A. Rachmilewitz and Patricia J. Giardina. *Blood* 2011 118:3479-3488.
25. Recent advances in the molecular understanding of non-transfusion-dependent thalassemia. Galanello R. *Blood Rev.* 2012 Apr;26 Suppl 1:S7-S11.
26. α - Thalassemia. Liebhaber SA. *Hemoglobin.* 1989; 13:68
27. Alpha-thalassaemia. Bernini LF, Hartevelde CL. *Baillieres Clin Haematol.* 1998 Mar;11(1):53-90.
28. Alpha- thalassaemia. Hartevelde CL, Higgs DR. *Orphanet J Rare Dis* 2010; 5: 13.
29. α - Thalassemia. Higgs DR. *Bailliere's Clinical Hematology.* 1993; 6(1):117.
30. The α - thalassemias. Piel FB, Weatherall DJ. *N Engl J Med* 2014; 371: 1908–16.
31. Molecular basis of α - thalassemia. Farashi S, Hartevelde CL. *Blood Cells Mol Dis.* 2018 May;70:43-53
32. The molecular basis of α - thalassemia. Higgs DR. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013 Jan 1;3(1):a011718.
33. Frequency of α -Thalassemia in Greece. Kanavakis E, Tzotzos S, Liapaki A, et al. *Am J Hemat.* 1986; 22:225.
34. 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.
35. Distinct phenotypic expression associated with a new hyperunstable alpha globin variant (Hb Heraklion, $\alpha 1\text{cd}37(\text{C}2)\text{Pro}>0$): comparison to other α -thalassaemic haemoglobinopathies. Traeger-Synodinos J, Papassotiriou I, Metaxotou-Mavrommati A, Vrettou C, Stamoulakatou A, Kanavakis E. *Blood Cells Mol Dis.* 2000; 26:276-284.
36. Variable and often Severe Phenotypic Expression in Patients with the α -thalassemic Variant Hb Agrinio ($\alpha 29 (\text{B}10) \text{Leu} \rightarrow \text{Pro} (\alpha 2)$). Traeger-Synodinos J, Douna V, Papassotiriou I, et al. *Hemoglobin.* 2010; 34:430–438.
37. 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 α +-thalassemia mutations. Douna V, Liapi D, Kampourakis D, et al. *Hemoglobin.* 2008; 32:371–378;

38. A rare thalassemic syndrome caused by interaction of Hb Adana [α 59(E8) GlyAsp] with an α + -thalassemia deletion: clinical aspects in two cases. Douna V, Papassotiriou I, Garoufi A, et al. Hemoglobin. 2008; 32:361–369.
39. Problems related to treatment of beta – thalassemia major. Economidou J. Paediatrician 1982;11:157-77
40. Survival and causes of death in thalassemia major. Zurlo MG , De Stefano P, Borgna – Pignatti C, Di Palma A, Piga A, Melevendi C, et al. Lancet 1989:27-9
41. Survival and complications in Thalassemia. Borgna – Pignatti C, Cappellini MD, De Stefano P, Del Vecchio GC, Forni GL, Gamberini MR, et al. Ann NY Acad Sci 2005;1054: 40-7
42. The hypercoagulable state in thalassemia. Eldor A, Rachmilewitz EA. Blood. 2002 Jan 1;99(1):36-43. Review.
43. Beta-thalassaemia and sickle cell anaemia as paradigms of hypercoagulability. Ataga KI, Cappellini MD, Rachmilewitz EA. Br J Haematol. 2007 Oct;139(1):3-13.
44. Thromboembolic complications in β -thalassemia : Beyond the horizon. Panigrahi I, Agarwal S. Thrombosis Research (2007) 120, 783-789
45. Thalassemia and hypercoagulability. Taher AT, Othrock Z, Uthman I, Cappellini MD. Blood reviews (2008) 22,283-292.
46. Redefining thalassemia as a hypercoagulable state. Cappellini MD, Motta I, Musallam KM, Taher AT. Ann N Y Acad Sci. 2010 Aug;1202:231-6.
47. Hypercoagulability in β -thalassemia: a status quo. Cappellini MD, Poggiali E, Taher AT, Musallam KM. Expert Rev Hematol. 2012 Oct;5(5):505-11; quiz 512.
48. Hypercoagulability in non-transfusion-dependent thalassemia. Cappellini MD, Musallam KM, Poggiali E, Taher AT. Blood Reviews 265 (2012) 520-523
49. Hypercoagulability and Vascular Disease. Taher AT, Cappellini MD, Bou-Fakhredin R, Coriu D, Musallam KM. Hematol Oncol Clin North Am. 2018 Apr;32(2):237-245.
50. Anatomy of the red blood cell membrane skeleton: unanswered questions. Samuel E Lux IV, Blood 2016;127:187-199
51. Pathophysiologic Implications of Membrane Phospholipid Asymmetry in Blood Cells. Robert F.A. Zwaal and Alan J. Schroit. Blood 1997;89:1121-1132
52. Exposure of phosphatidylserine in the outer leaflet of human red blood cells. Relationship to cell density, cell age and clearance by mononuclear cells. Connor J, Pak CC, Schroit AJ. J Biol Chem. 1994;269:2339-2345
53. Red blood cells in thrombosis. Byrnes JR, Wolberg AS. Blood. 2017 Oct 19;130(16):1795-1799.
54. Thalassemic erythrocytes release microparticles loaded with hemichromes by redox activation of p72Syk kinase. Ferru E, Pantaleo A, Carta F, Mannu F, Khadjavi A, Gallo V, Ronzoni L, Graziadei G, Cappellini MD, Turrini F. Haematologica 2014. 99:570-578.

55. Increased procoagulant activity of red blood cells from patients with homozygous sickle cell disease and beta-thalassemia. Helley D, Eldor A, Girot R, Ducrocq R, Guillin MC, Bezeaud A. *Thromb Haemost.* 1996 Sep;76(3):322-7
56. Phosphatidylserine in the outer leaflet of red blood cells from beta-thalassemia patients may explain the chronic hypercoagulable state and thrombotic episodes. Borenstain-Ben Yashar V, Barenholz Y, Hy-Am E, Rachmilewitz EA, Eldor A. *Am J Hematol.* 1993;44:63-65
57. Comparison of the procoagulant activity of red blood cells from patients with homozygous sickle cell disease and b-thalassemia. Helley D, Eldor A, Girot R, Ducrocq R, Guillin MC, Bezeaud A. *Thromb Haemost.* 1996;76:322-327.
58. Membrane phospholipid asymmetry in human thalassemia. Kuypers FA, Yuan J, Lewis RA, et al. *Blood.* 1998;91:3044-3048.
59. Metabolic indicators of oxidative stress correlate with haemichrome attachment to membrane, band 3 aggregation and erythrophagocytosis in beta-thalassemia intermedia. Cappellini MD, Tavazzi D, Duca L, et al. *Br J Haematol.* 1999;104:504-512
60. Enhanced aggregability of red blood cells of beta-thalassemia major patients. Chen S, Eldor A, Barshtein G, et al. *Am J Physiol.* 1996;270H:1951-1956.
61. Membrane microparticles : two sides of the coin. Hugel B, Martinez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM. *Physiology (Bethesda)* 2005;20-7
62. Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with beta-thalassemia intermedia. Habib A, et al. *Haematologica.* 2008 Jun;93(6):941-2.
63. Circulating microparticles in Lebanese patients with beta-thalassemia intermedia. Habib A, Kunzeimann C, Shamseddeen W, Isma' eel H, Zobairi F, Freyssinet J et al. In: *ASH; 2006: Blood 2006.* p.1589
64. Flow cytometric quantitation of red blood cell vesicles in thalassemia. Pattnapanyasat K, Noulisri E, Fucharoen S, Lerdwana S, Lamchiagdhase P, Siritanaratkul N et al. *Cytometry B Clin Cytom* 2004;57:23-31
65. Platelet survival in patients with beta-thalassemia. Eldor A, Krausz Y, Atlan H, Snyder D, Goldfarb A, Hy-Am E, Rachmilewitz EA, Kotze HF, Heyns AD. *Am J Hematol.* 1989 Oct;32(2):94-9
66. In vivo platelet activation in beta-thalassemia major reflected by increased platelet-thromboxane urinary metabolites. Eldor A, Lellouche F, Goldfarb A, Rachmilewitz EA, Maclouf J. *Blood.* 1991 Apr 15;77(8):1749-53
67. Increased circulating platelet aggregates in thalassaemia. Winichagoon P, Fucharoen S, Wasi P. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1981 Dec;12(4):556-60.
68. PADGEM/GMP-140 expression on platelet membranes from homozygous beta thalassaemic patients. Del Principe D, Menichelli A, Di Giulio S, De Matteis W, Cianciulli P, Papa G. *Br J Haematol.* 1993 May;84(1):111-7.
69. In vivo platelet activation and hyperaggregation in hemoglobin E/beta-thalassemia: a consequence of splenectomy. Atichartakarn V,

Angchaisuksiri P, Aryurachai K, Chuncharunee S, Thakkestian A. *Int J Hematol*. 2003 Apr;77(3):299-303

70. Increased platelet adhesion under flow conditions is induced by both thalassemic platelets and red blood cells. Goldschmidt N, Spectre G, Brill A, Zelig O, Goldfarb A, Rachmilewitz E, Varon D. *Thromb Haemost*. 2008 Nov;100(5):864-70
71. Platelet haemostatic properties in β -thalassaemia: the effect of blood transfusion. Trinchero A, Marchetti M, Giaccherini C, Tartari CJ, Russo L, Falanga A. *Blood Transfus*. 2017 Sep;15(5):413-421.
72. Platelet and not erythrocyte microparticles are procoagulant in transfused thalassaemia major patients. Agouti I, Cointe S, Robert S, Judicone C, Loundou A, Driss F, Brisson A, Steschenko D, Rose C, Pondarré C, Bernit E, Badens C, Dignat-George F, Lacroix R, Thuret I. *Br J Haematol*. 2015 Nov;171(4):615-24.
73. Activated platelet-derived microparticles in thalassaemia. Pattanapanyasat K, Gonwong S, Chaichompoo P, Nulsri E, Lerdwana S, Sukapirom K et al. *Br J Haematol* 2007; 136:462-71
74. Increased serum levels of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) in alpha- and beta-thalassemia syndromes: correlation with anaemia and monocyte activation. Wiener E, Wanachiwanawin W, Chinprasertsuk S, et al. *Eur J Haematol*. 1996;57:364-369
75. Elevated polymorphonuclear phagocytic function in thalassemia patients by chemiluminescence. Deo SS, Merchant SM, Kapadia AC. *Indian J Pediatr*. 1994;61:395-399.
76. Effect of the Leukostop filter on pulmonary function following blood transfusion in patients with thalassemia major. Kivity S, Gazy C, Heno N, Greif Z, Topilsky M. *Pediatr Pulmonol*. 1999;28:277-281.
77. Alterations in vascular endothelial cell-related plasma proteins in thalassemic patients and their correlation with clinical symptoms. Butthep P, Bunyaratvej A, Funahara Y, et al. *Thromb Haemost*. 1995;74:1045-1049.
78. Possible evidence of endothelial cell activation and disturbance in thalassemia: an in vitro study. Butthep P, Bunyaratvej A, Funahara Y, et al. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1997;28:141-148A.
79. Enhanced adherence of beta-thalassaemic erythrocytes to endothelial cells. Hovan T, Goldfarb A, Artmann G, Yedgar S, Barshtein G. *Br J Haematol* 1999;106:178-81
80. Increased circulating activated endothelial cells, vascular endothelial growth factor, and tumor necrosis factor in thalassemia. Butthep P, Rummavas S, Wisedpanichkij R, Jindadamrongwech S, Fucharoen S, Bunyaratvej A. *Am J Hematol* 2002;70:100-6.
81. Leukocyte –endothelial adhesion molecules. Carlos TM, Harlan JM. *Blood* 1994;84:2068-101
82. The role of the tissue factor pathway in initiation of coagulation. Mann KG, Van' t Veer C, Cawthern K, Butenas S. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998;9 (Suppl.1):S3-7

83. Endothelial dysfunction and inflammatory process in transfusion-dependent patients with beta-thalassemia major. Aggeli C, Antoniadis C, Cosma C, et al. *Int J Cardiol.* 2005; 105:80-4.
84. Serum C-reactive protein level in postsplenectomized thalassemic patients. Archararit N, Chuncharunee S, Pornvoranunt A, Atamasirikul K, Rachakom B, Atichartakarn V. *J Med Assoc Thai.* 2000; 83(Suppl 1):S63-9
85. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET. *Circulation.* 2000; 102:2165-8.
86. Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein. Verma S, Li SH, Badiwala MV, et al. *Circulation.* 2002; 105:1890-6
87. Non-transfusion-dependent thalassemias. Musallam KM, Rivella S, Vichinsky E, Rachmilewitz EA. *Haematologica.* 2013 Jun;98(6):833-44. doi: 10.3324/haematol.2012.066845.
88. Guidelines for the management of non transfusion dependent thalassaemia (NTDT). Taher A, Vichinsky E, Musallam K, Cappellini MD, Viprakasit V Nicosia, Cyprus: Thalassaemia International Federation, 2013
89. Guidelines for the management of transfusion dependent thalassaemia (TDT). 3rd edn. Cappellini MD, Cohen A, Porter J, Taher A, Viprakasit V. Nicosia, Cyprus: Thalassaemia International Federation, 2014.
90. Inherited thrombophilias. Coppens M, Kaandorp SP, Middeldorp S. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2006; 33:357-374.
91. Elevated levels of FVIII:C within families are associated with an increased risk for venous and arterial thrombosis. Bank I, Libourel EJ, Middeldorp S, et al. *J Thromb Haemost.* 2005; 3:79-84.
92. Elevated factor VIII levels and the risk of thrombosis. Kamphuisen, P.W., Eikenboom, J.C. & Bertina, R.M. (2001b) *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 21, 731–738.
93. Elevated factor VIII levels and risk of venous thrombosis. Jenkins PV, Rawley O, Smith OP, O'Donnell JS. *Br J Haematol.* 2012 Jun;157(6):653-63. doi: 10.1111/j.1365-2141.2012.09134.
94. Hyperhomocysteinemia and venous thrombosis: a meta-analysis. Der Heijer M, Rosendaal FR, Blom HJ, et al. *Thromb Haemost.* 1998; 80:874-877.
95. Laboratory evaluation and clinical characteristics of 2,132 consecutive unselected patients with venous thromboembolism--results of the Spanish Multicentric Study on Thrombophilia (EMET-Study). Mateo J, Oliver A, Borrell M, Sala N, Fontcuberta J. *Thromb Haemost.* 1997 Mar;77(3):444-51.
96. The inherited thrombophilias: genetics, epidemiology, and laboratory evaluation. Buchanan GS, Rodgers GM, Branch DW. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2003; 17:397-411.
97. The epidemiology of venous thromboembolism in Caucasians and African-Americans: the GATE Study. Dowling NF, Austin H, Dilley A, Whitsett C, Evatt BL, Hooper WC. *J Thromb Haemost.* 2003 Jan;1(1):80-7

98. Risk factors for venous thrombosis in the black population. Patel RK, Ford E, Thumpston J, Arya R. *Thromb Haemost.* 2003 Nov;90(5):835-8
99. Incidence of thromboembolic events in Lebanese thalassemia intermedia patients. Zalloua PA, Shbaklo H, Mourad YA, Koussa S, Taher A. *Thromb Haemost* 2003;89:767-8
100. Prevalence of thrombotic risk factors among beta thalassemia patients from Western Iran. Rahimi Z, Ghaderi M, Nagel RL, Muniz A. *J Thromb Thrombolysis* 2008;26:229-33
101. Hypercoagulable state and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T mutation in patients with beta-thalassemia major in Kuwait. Mustafa NY, Marouf R, Al-Humood S, Al-Fadhli SM, Mojiminiyi O. *Acta Haematol* 2010;123:37-42
102. Thrombophilia in thalassemia major patients: analysis of genetic predisposing factors. Iolascon A, Giordano P, Storelli S, Li HH, Coppola B, Piga A, et al. *Haematologica* 2001;86:1112-3
103. Thalassemia major: on the verge of bleeding or thrombosis? Naithani R, Chandra J, Narayan S, Sharma S, Singh V. *Hematology* 2006;11:57-61
104. A chronic hypercoagulable state in patients with beta-thalassaemia major is already present in childhood. Eldor A, Durst R, Hy-Am E, Goldfarb A, Gillis S, Rachmilewitz EA. *Br J Haematol* 1999;107:739-46
105. Plasma protein Z and protein C inhibitors and their role in hypercoagulability of thalassemia. Del Vecchio GC, Nigro A, Giordano P, Schettini F, Altomare M, Pietrapertosa A, et al. *Acta Haematol* 2007;118:136-40
106. Anticoagulant system activity in splenectomized versus non-splenectomized Iranian patients with beta-thalassemia major. Rashidi A, Alavi S, Arzanian MT, Ahmadinejad M. *Pediatr Hematol Oncol* 2007;24:645-7
107. Protein C levels in beta-thalassemia major patients in the east Nile delta of Egypt. Hassan TH, Elbehedy RM, Youssef DM, Amr GE. *Hematol Oncol Stem Cell Ther* 2010;3:60-5
108. Protein C and antithrombin III in polytransfused thalassemic patients. Musumeci S, Leonardi S, Di Dio R, Fischer A, Di Costa G. *Acta Haematol* 1987;77:30-3
109. Haemostatic disorders in nonsplenectomized and splenectomized thalassaemic children. Shebl SS, el-Sharkawy HM, el-Fadaly NH. *East Mediterr Health J* 1999;5:1171-7
110. Assessment of coagulation state and its related factors in thalassemia intermedia patients referred to thalassemia research center at Boali Sina Hospital Sari/IR Iran in 2007. Karami H, Vahidshahi K, Kosarian M, Karami H, Shahmohammadi S, Dabirian M, et al. *Pak J Biol Sci* 2010;13:448-5
111. Protein C and protein S deficiency in thalassemic patients. Shirahata A, Funahara Y, Opartkiattikul N, Foucharoen S, Laosombat V, Yamadak K, et al. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1992;23:65-73
112. Hemostatic alterations in splenectomized and non-splenectomized patients with beta thalassemia/hemoglobin E disease. Tripatara A,

Jetsrisuparb A, Teeratakulpisarn J, Kuaha K. *Thromb Res* 2007;120:805-10

113. Hemostatic and thrombotic markers in patients with hemoglobin E/beta-thalassemia disease. Angchaisuksiri P, Atichartakarn V, Aryurachai K, Archararit N, Chuncharunee S, Tiraganjana A, et al. *Am J Hematol* 2007;82:1001-4
114. Thrombotic risk of children with thalassemia. Chuansumrit A, Hathirat P, Isarangkura P, Pintadit P, Mahaphan W. *J Med Assoc Thai* 1993;76:80-4
115. Lupus anticoagulant, anticardiolipin antibodies and hepatitis C virus infection in thalassaemia. Giordano P, Galli M, Del Vecchio GC, Altomare M, Norbis F, Ruggeri L, et al. *Br J Haematol* 1998;102:903-6
116. Lupus anticoagulant and anticardiolipin antibodies in polytransfused beta thalassemia major. Sharma S, Raina V, Chandra J, Narayan S, et al. *Hematology* 2006;11:287-90
117. Antiphospholipid antibodies and hepatitis C virus infection in Iranian thalassemia major patients. Kashef S, Karimi M, Amirghofran Z, Ayatollahi M, Pasalar M, Ghaedian MM, et al. *Int J Lab Hematol* 2008;30:11-6
118. Resistance to activated protein C in thalassaemic patients: an underlying cause of thrombosis. Giordano P, Del Vecchio GC, Altomare M, Coppola B, Schettini F, Iolascon A, et al. *Eur J Haematol* 1998 ;61:123-7
119. Recurrent thromboembolism in a patient with beta thalassemia major associated with double heterozygosity for factor V R506Q and prothrombin G20210A mutations. Kahn JE, Veyssier-Belot C, Renier JL, de Mazancourt P, Peltier JY, de Raucourt E. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002;13:461-3
120. Splenectomy and thrombosis: the case of thalassemia intermedia. Taher AT, Musallam KM, Karimi M, El-Beshlawy A, Belhoul K, Daar S, Saned M, Cesaretti C, Cappellini MD. *J Thromb Haemost.* 2010
121. Coagulation and splenectomy: an overview. Cappellini MD, Grespi E, Cassinerio E, et al. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1054:317-24
122. Venous thromboembolism and hypercoagulability in splenectomized patients with thalassaemia intermedia. Cappellini MD, Robbiolo L, Bottasso BM, Coppola R, Fiorelli G, Mannucci AP. *Br J Haematol.* 2000 Nov;111(2):467-73.
123. Hemolysis-associated hypercoagulability in sickle cell disease: the plot (and blood) thickens! Gladwin MT, Kato GJ. *Haematologica.* 2008 Jan;93(1):1-3.
124. Does heart failure confer a hypercoagulable state? Virchow's triad revisited. Lip GY, Gibbs CR. *J Am Coll Cardiol* 1999;33:1424-6
125. Endocrine complications of thalassemia. Tiosano D, Hochberg Z. *J Endocrinol Invest* 2001;24:716-23
126. Prevalence of thromboembolic events among 8,860 patients with thalassaemia major and intermedia in the Mediterranean area and Iran. Taher A, Isma'eel H, Mehio G, Bignamini D, Kattamis A, Rachmilewitz EA, Cappellini MD. *Thromb Haemost.* 2006 Oct;96(4):488-91.

127. Thromboembolic events in beta thalassemia major: an Italian multicenter study. Borgna Pignatti C, Carnelli V, Caruso V, Dore F, De Mattia D, Di Palma A, Di Gregorio F, Romeo MA, Longhi R, Mangiagli A, Melevendi C, Pizzarelli G, Musumeci S. *Acta Haematol.* 1998;99(2):76-9.
128. Survival and complications in patients with thalassemia major treated with transfusion and deferoxamine. Borgna-Pignatti C, Rugolotto S, De Stefano P, Zhao H, Cappellini MD, Del Vecchio GC, et al. *Haematologica.* 2004;89:1187–1193.
129. Venous thromboembolism and hypercoagulability in splenectomized patients with thalassaemia intermedia. Cappellini MD, Robbiolo L, Bottasso BM, Coppola R, Fiorelli G, Mannucci AP. *Br J Haematol.* 2000 Nov;111(2):467-73
130. Thalassemia major (homozygous beta-thalassemia). A survey of 138 cases with emphasis on neurologic and muscular aspects. Logothetis J, Constantoulakis M, Economidou J, et al. *Neurology* 1972; 22:294–304.
131. Thalassemia and Venous Thromboembolism. Julien Succar, Khaled M. Musallam, and Ali T. Taher. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2011
132. Pregnancy outcome in patients with beta-thalassemia intermedia at two tertiary care centers, in Beirut and Milan. Nassar AH, Naja M, Cesaretti C, Eprassi B, Cappellini MD, Taher A. *Haematologica.* 2008 Oct;93(10):1586-7.
133. Pregnancy in beta-thalassemia intermedia: 20-year experience of a Greek thalassemia center. Voskaridou E, Balassopoulou A, Boutou E, Komninaka V, Christoulas D, Dimopoulou M, Delaki EE, Loukopoulos D, Terpos E. *Eur J Haematol.* 2014 Dec;93(6):492-9
134. Overview on practices in thalassemia intermedia management aiming for lowering complication rates across a region of endemicity: the OPTIMAL CARE study. Taher AT, Musallam KM, Karimi M, El-Beshlawy A, Belhoul K, Daar S, Saned MS, El-Chafic AH, Fasulo MR, Cappellini MD. *Blood.* 2010 Mar 11;115(10):1886-92.
135. Splenectomy and thrombosis: the case of thalassemia intermedia. Taher AT, Musallam KM, Karimi M, El-Beshlawy A, Belhoul K, Daar S, et al. *J Thromb Haemost.* 2010;8:2152–2158.
136. Cerebrovascular accident in beta-thalassemia major (beta-TM) and beta-thalassemia intermedia (beta-TI). Karimi M, Khanlari M, Rachmilewitz EA. *Am J Hematol.* 2008 Jan;83(1):77-9.
137. Beta-thalassemia intermedia associated with moyamoya syndrome. Göksel BK, Ozdogu H, Yildirim T, Oğuzkurt L, Asma S. *J Clin Neurosci.* 2010 Jul;17(7):919-20.
138. Moyamoya disease associated with hemoglobin Fairfax and beta-thalassemia. Marden FA, Putman CM, Grant JM, Greenberg J. *Pediatr Neurol.* 2008 Feb;38(2):130-2.
139. Stroke in a young boy with β -thalassemia intermedia secondary to moyamoya syndrome. Oberoi S, Bansal D, Singh P, Marwaha RK. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2010 Oct;32(7):568-70.

140. Cerebral infarction in β -thalassemia intermedia: breaking the silence. Musallam KM, Taher AT, Karimi M, Rachmilewitz EA. *Thromb Res* 2012; 130: 695–702.
141. MR imaging of the brain: findings in asymptomatic patients with thalassemia intermedia and sickle cell-thalassemia disease. Manfre L, Giarratano E, Maggio A, et al. *AJR Am J Roentgenol* 1999;173(6):1477–80
142. Asymptomatic brain magnetic resonance imaging abnormalities in splenectomized adults with thalassemia intermedia. Taher AT, Musallam KM, Nasreddine W, et al. *J Thromb Haemost* 2010;8(1):54–9
143. Magnetic resonance imaging to determine the incidence of brain ischaemia in patients with beta-thalassaemia intermedia. Karimi M, Bagheri H, Rastgu F, et al. *Thromb Haemost* 2010;103(5):989–93.
144. Frequency and distribution of asymptomatic brain lesions in patients with beta-thalassemia intermedia. Karimi M, Haghpanah S, Bagheri MH, et al. *Ann Hematol* 2012;91(12):1833–8
145. Subclinical central nervous system involvement and thrombophilic status in young thalassemia intermedia patients of Greek origin. Teli A, Economou M, Rudolf J, et al. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2012;23(3):195–202
146. Clinical silent cerebral infarct (SCI) in patients with thalassemia diseases assessed by magnetic resonance imaging (MRI). Metarugcheep P, Chanyawattiwongs S, Srisubat K, et al. *J Med Assoc Thai* 2008;91(6):889–94
147. The frequency of silent cerebral ischemia in patients with transfusion-dependent beta-thalassemia major. Karimi M, Toosi F, Haghpanah S, et al. *Ann Hematol* 2016;95(1):135–9
148. Intracranial blood flow velocity in patients with beta-thalassemia intermedia using transcranial doppler sonography: a case-control study. Ashjazadeh N, Emami S, Petramfar P, et al. *Anemia* 2012;2012:798296
149. Intracranial blood flow velocities in patients with sickle cell disease and beta-thalassemia intermedia. Abboud MR, Maakaron JE, Khoury RA, et al. *Am J Hematol* 2013;88(9):825
150. Brain magnetic resonance angiography in splenectomized adults with beta-thalassemia intermedia. Musallam KM, Beydoun A, Hourani R, et al. *Eur J Haematol* 2011;87(6):539–46.
151. Brain positron emission tomography in splenectomized adults with beta-thalassemia intermedia: uncovering yet another covert abnormality. Musallam KM, Nasreddine W, Beydoun A, et al. *Ann Hematol* 2012;91(2):235-41.

