



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΝΟΣ. ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

**«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ: ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΚΤΕΛΕΣΗ»**

MSc: "Clinical Trials: Design and Conduct"

Διευθυντής

Ευάγγελος Τέρπος, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

**Αναδρομική Μελέτη της προγνωστικής αξίας των ιστολογικών ευρημάτων της Βιοψίας ήπατος σε Ασθενείς με Μεσογειακή Αναιμία.**

**Retrospective Study of the Prognostic Value of Histological Findings of Liver Biopsy in Patients with Thalassemia.**

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ ΚΟΥΜΑΣΗ

ΑΜ: 20190061

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

Επιβλέπων καθηγητής ΜΔΕ:

ΑΝΤΩΝΙΟΣ ΚΑΤΤΑΜΗΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗΣ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΚΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2021



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΝΟΣ. ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ: ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΚΤΕΛΕΣΗ»**

**MSc: "Clinical Trials: Design and Conduct"**

**Διευθυντής**

**Ευάγγελος Τέρπος, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ**

**Αναδρομική Μελέτη της προγνωστικής αξίας των ιστολογικών ευρημάτων της Βιοψίας ήπατος σε Ασθενείς με Μεσογειακή Αναιμία.**

**Retrospective Study of the Prognostic Value of Histological Findings of Liver Biopsy in Patients with Thalassemia.**

**ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑΚΟΥΜΑΣΗ**

**ΑΜ: 20190061**

**ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**Τα Μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής**

**Επιβλέπων:** Καττάμης Αντώνιος, Καθηγητής Παιδιατρικής Αιματολογίας-Ογκολογίας Ιατρικής Σχολής Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Τμήμα Παιδιατρικής Αιματολογίας-Ογκολογίας, Α' Παιδιατρικής Κλινικής ΕΚΠΑ, Νοσοκομείο Παίδων "Αγ. Σοφία".\_\_\_\_

**Μέλος:** Ευάγγελος Τέρπος, Καθηγητής Αιματολογίας στη Θεραπευτική Κλινική της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, Θεραπευτική κλινική "Αλεξάνδρα".

**Μέλος:** Ευστάθιος Καστρίτης, Αναπληρωτής Καθηγητής Θεραπευτικής Παθολογίας/Ογκολογίας, Θεραπευτική Κλινική της Ιατρικής σχολής του ΕΚΠΑ (ΠΓΝΑ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ)

**ΑΘΗΝΑ 2021**

## *Ευχαριστίες*

Η Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία με τίτλο **“Αναδρομική Μελέτη της προγνωστικής αξίας των ιστολογικών ευρημάτων της Βιοψίας ήπατος σε Ασθενείς με Μεσογειακή Αναιμία”** εκπονήθηκε στη Μονάδα Μεσογειακής Αναιμίας της Α΄ Πανεπιστημιακής Κλινικής του Νοσοκομείου Παίδων “Η Αγία Σοφία”.

Την επίβλεψη είχε ο Καθηγητής Παιδιατρικής Αιματολογίας-Ογκολογίας της Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ και Πρόεδρος της Ελληνικής Εταιρείας Παιδιατρικής Αιματολογίας-Ογκολογίας, κ.Αντώνιος Καττάμης, προς τον οποίο θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες για τη συνεχή καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές του σε όλη τη διάρκεια της μελέτης.

Είμαι ιδιαίτερα ευγνώμων στον Καθηγητή Αιματολογίας της Θεραπευτικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, κ.Ευάγγελο Τέρπο και τον Αν. Καθηγητή Θεραπευτικής – Παθολογίας/Ογκολογίας της Θεραπευτικής Κλινικής της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, κ.Ευστάθιο Καστρίτη, οι οποίοι με ευχαρίστηση δέχτηκαν να συμμετέχουν στην Τριμελή Συμβουλευτική μου Επιτροπή.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ, κα.Κωνσταντίνα Τηνιακού, για την αξιολόγηση των ιστολογικών ευρημάτων της Βιοψίας ήπατος, και στην Παιδίατρο-Αιματολόγο Διευθύντρια Β΄ Παιδιατρικής Κλινικής Γ. Νοσοκομείο Παίδων Πεντέλης και Επιστημονική Συνεργάτης Μονάδας Μ.Α. της Α΄ Παιδιατρικής Κλινικής Παν/μίου Αθηνών Νοσοκομείου Παίδων «Η Αγία Σοφία», κα.Σταυρούλα Κωσταρίδου, για τη συλλογή των δεδομένων, καθώς και στη Μαθηματικό-Βιοστατιστικό MSc Ευαγγελία Νίτσα, για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων και τη χρήσιμη βοήθεια στην ερμηνεία τους.

Η παρούσα μελέτη δε θα μπορούσε να έχει πραγματοποιηθεί χωρίς το κλινικό και ερευνητικό έργο του Ομότιμου Καθηγητή Παιδιατρικής Πανεπιστημίου Αθηνών, κ.Χρήστου Καττάμη και του Παιδίατρου, τ.Δ/ντη Μονάδας Μεσογειακής Αναιμίας Α΄ Παιδιατρικής Κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. Βασίλειου Λαδή.

Νιώθω ακόμα την ανάγκη να ευχαριστήσω όλους τους γιατρούς της Μονάδας Μεσογειακής Αναιμίας, οι οποίοι ήταν πρόθυμοι κάθε στιγμή να με βοηθήσουν και με τις σημαντικές υποδείξεις τους να συμβάλλουν στην άρτια ολοκλήρωση της μελέτης.

Σε όλη αυτή την προσπάθεια, είχα δίπλα μου την οικογένειά μου, η οποία με τη στήριξη και την υπομονή της, είναι πάντα εκεί να μου υπενθυμίζει να μη σταματώ να προσπαθώ για όσα ονειρεύομαι.

## Περιεχόμενα

<i>Περίληψη</i> .....	5
<i>Abstract</i> .....	6
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	8
1. Αιμοσφαιρινοπάθειες.....	8
2. Επιδημιολογικά Χαρακτηριστικά.....	9
3. Παθογένεια.....	9
4. Κλινικές Εκδηλώσεις.....	12
5. Θεραπευτική Αντιμετώπιση.....	13
6. Ηπατική Νόσος.....	17
7. Μέθοδοι προσδιορισμού φορτίου σιδήρου (Fe).....	23
B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	24
1. ΣΚΟΠΟΣ.....	24
2. Υλικό και Μέθοδος.....	24
3. Αποτελέσματα.....	28
4. Συζήτηση – Συμπεράσματα.....	46
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	49

## Περίληψη

Ιστορικό: Η ηπατίτιδα C και η χρόνια υπερφόρτωση σιδήρου είναι οι κύριες αιτίες της ηπατικής νόσου, που εκδηλώνεται ως προχωρημένη ίνωση, κίρρωση ή/και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα(HKK). Η ‘goldstandard’ μέθοδος για την αξιολόγηση της ηπατικής βλάβης είναι η βιοψία ήπατος.

Σκοπός: Αξιολόγηση της προγνωστικής αξίας της βιοψίας ήπατος στη μακροχρόνια νοσηρότητα και θνητότητα των ασθενών με μεσογειακή αναιμία.

Μέθοδος: Αναδρομική μελέτη σε ασθενείς με μεταγγισιοεξαρτώμενη(TDT)ή μη μεταγγισιοεξαρτώμενη(NTDT) β-θαλασσαιμία, που υποβλήθηκαν σε βιοψία ήπατος το 1992-2005 και παρακολούθηθηκαν έως 31/12/2020.Ηπατικά συμβάματαορίστηκαν ως κίρρωση ήπατος, HKK ή θάνατος από ηπατικά αίτια.

Αποτελέσματα:87 ασθενείς υποβλήθηκαν σε βιοψία ήπατος σε ηλικία  $21,8\pm 6,1$ έτη και παρακολούθηθηκαν για 19,4έτη. Παρατηρήθηκαν 14(16,1%) συμβάματα:7 HKK, 4 κίρρωση και 3 θάνατοι. Σε ηλικία 50ετών, το EFSήταν 75%, ενώ 25% των ασθενών εμφάνισε ηπατική νόσο 24,4 χρόνια μετά τη βιοψία.Υψηλά επίπεδα φερριτίνης κατά την ημερομηνία της βιοψίας σχετίζονται με υψηλή σιδήρωσηήπατος ( $p=0.0003$ ). Η υψηλή σιδήρωση ενέχει μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης ηπατικής νόσου σε σύγκριση με τη χαμηλή, (HR 3,00,  $p=0,05$ ), σταθμισμένο για την ηλικία(aHR2,9, $p=0,07$ ). Αύξηση της φερριτίνης κατά 50μg/L,αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης ηπατικής νόσου(aHR 1,02,  $p=0,03$ ).Δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της ανάπτυξης ηπατικής νόσου με το φύλο, την ηπατίτιδα C και το βαθμό της ίνωσης,  $p=0,2$ , $p=0,3$  και  $p=0,2$ ,αντίστοιχα.

Συμπεράσματα: Η εμφάνιση ηπατικής νόσου τείνει να αυξάνεται μετά την 4<sup>η</sup> δεκαετία της ζωής, ενώ τα αυξημένα επίπεδα φερριτίνης και σιδήρωσηςαποτελούν σημαντικούς παράγοντες κινδύνου.Ο βαθμός ηπατικής ίνωσης δεν φαίνεται να σχετίζεται στην εμφάνιση συμβαμάτωνκαι ενδεχομένως να οφείλεται σε σταθεροποίηση ή/και αναστροφή της ίνωσης που επιτυγχάνεται με τις τρέχουσες θεραπείες αποσιδήρωσης.

## *Abstract*

Background: Hepatitis C and chronic iron overload are the main causes of liver disease, presenting as advanced fibrosis, cirrhosis and/or hepatocellular carcinoma (HCC). The 'gold standard' method for assessing liver damage is liver biopsy.

Purpose: Evaluation of the prognostic value of liver biopsy in long-term morbidity and mortality of patients with  $\beta$ -Thalassemia.

Method: Retrospective analysis in a group of Transfusion-Dependent (TDT) or Non-Transfusion-Dependent (NTDT)  $\beta$ -Thalassemia patients, who had undergone liver biopsy from 1992 to 2005, and were followed till 31/12/2020. Hepatic events were defined as liver cirrhosis, HCC, or death due to liver disease.

Results: 87 patients had undergone liver biopsy at the age of  $21.8 \pm 6.1$  years and were monitored for 19.4 years. We identified 14 (16.1%) events; 7 HCC, 4 liver cirrhosis and 3 deaths from liver-related causes. At 50 years of age, DFS was 75%, while 25% of patients developed liver disease in 24.4 years after date of biopsy. High ferritin levels are associated with high siderosis levels ( $p=0.0003$ ). High siderosis carries a greater risk for developing liver disease compared to low siderosis, (HR 3.00,  $p=0.05$ ), HR adjusted for age (aHR 2.9,  $p=0.07$ ). An increase of 50  $\mu\text{g/L}$  in serum ferritin level is associated with an increased risk of developing liver disease (aHR 1.02,  $p=0.03$ ). No statistically significant correlation was found between the development of liver disease and sex, hepatitis C and the degree of fibrosis,  $p=0.2$ ,  $p=0.3$  and  $p=0.2$ , respectively.

Conclusions: The occurrence of liver-disease is increasing after the 4<sup>th</sup> decade of life. High ferritin and siderosis levels may be significant risk factors. Degree of liver fibrosis does not seem to be related to progression, which may be due to stabilization and/or reversal of fibrosis achieved with current chelation therapy.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η β-θαλασσαιμία (μεσογειακή αναιμία) αποτελεί ένα από τα πιο συνήθη γενετικώς κληρονομούμενα νοσήματα παγκοσμίως (Borgna-Pignatti and Gamberini, 2011). Η επιβίωση έχει βελτιωθεί σημαντικά τις τελευταίες δεκαετίες, λόγω των θεραπευτικών εξελίξεων που παρατείνουν το προσδόκιμο ζωής των ασθενών, ωστόσο η θνητότητα παραμένει σημαντικά αυξημένη σε σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό, με κύρια αιτία την επαγόμενη από την υπερφόρτωση του οργανισμού με σίδηρο, τοξικότητα (Ladis *et al.*, 2005, 2011). Μελέτες έχουν δείξει πως η καρδιακή ανεπάρκεια, η οποία ήταν στο παρελθόν η κύρια αιτία θανάτου, φαίνεται να εμφανίζεται, πλέον, λιγότερα συχνά, ωστόσο η υπερφόρτωση του σιδήρου στο ήπαρ εξακολουθεί να είναι συχνή στους θαλασσαιμικούς ασθενείς (Aydinok *et al.*, 2015). Η τοξικότητα του σιδήρου στο ήπαρ, καθώς και οι ιογενείς λοιμώξεις, ιδιαίτερα η ηπατίτιδα C, συμβάλλουν στην εξέλιξη της ηπατικής νόσου σε κίρρωση και Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (Borgna-Pignatti *et al.*, 2014). Η άμεση ιστολογική εξέταση του ηπατικού ιστού που λαμβάνεται με τη βιοψία, αποτελεί εξαιρετικά ευαίσθητη και ειδική μέθοδο για τη διάγνωση και σταδιοποίηση της ηπατικής νόσου, ωστόσο η προγνωστική της αξία δεν είναι καλά τεκμηριωμένη (Taher and Saliba, 2017).

Σκοπός της παρούσας αναδρομικής μελέτης είναι η αξιολόγηση της προγνωστικής αξίας των ιστολογικών ευρημάτων της βιοψίας ήπατος στη μακροχρόνια νοσηρότητα και θνητότητα των ασθενών με μεσογειακή αναιμία.

## A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1. Αιμοσφαιρινοπάθειες

Οι αιμοσφαιρινοπάθειες αποτελούν τις πιο συχνές παγκοσμίως κληρονομικές μονογονιδιακές διαταραχές και εμπίπτουν σε δύο μεγάλες κατηγορίες: Τα θαλασσαιμικά σύνδρομα, με τις  $\alpha$ ,  $\beta$  και  $\delta\beta$  θαλασσαιμίες να αποτελούν τους κύριους τύπους θαλασσαιμίας με κλινική σημασία, και τις δομικές παραλλαγές της αιμοσφαιρίνης, με τις πιο συχνές και κλινικά σημαντικές παραλλαγές να είναι οι HbS, HbE, HbC και HbD.

Οι θαλασσαιμίες είναι μια κατηγορία διαταραχών που προκαλούνται από τη μειωμένη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης A( $\alpha_2\beta_2$ ), του κύριου μεταφορέα οξυγόνου των ενηλίκων, η οποία οφείλεται σε ελαττωματική παραγωγή των άλφα( $\alpha$ ) αλυσίδων,  $\alpha$ -θαλασσαιμία ή και βήτα( $\beta$ ) αλυσίδων σφαιρίνης,  $\beta$ -θαλασσαιμία (Traeger-Synodinos *et al.*, 2015; Bhattacharya, 2017).

Η  $\beta$ -θαλασσαιμία χαρακτηρίζεται από τη μειωμένη σύνθεση ( $\beta^+$ ) ή την πλήρη απουσία ( $\beta^0$ ) των αλυσίδων  $\beta$ -σφαιρίνης στο μόριο της αιμοσφαιρίνης, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση στην περιφερική κυκλοφορία αίματος, μη δεσμευμένων αλυσίδων σφαιρίνης, που κατακρημνίζονται σε πρόδρομες μορφές ερυθροκυττάρων στο μυελό των οστών και σε ώριμα ερυθροκύτταρα, οδηγούν σε αναποτελεσματική ερυθροποίηση και περιφερική αιμόλυση.

Η  $\beta$ -θαλασσαιμία διακρίνεται σε 3 κύριες μορφές, βάσει του γονοτύπου και της κλινικής εικόνας:

- την «ελάσσων θαλασσαιμία»
- την «ενδιάμεση θαλασσαιμία»
- τη «μείζων θαλασσαιμία», γνωστή ως αναιμία Cooley

Η κλινική εικόνα της  $\beta$ -θαλασσαιμίας καθορίζεται από το βαθμό ανισορροπίας παραγωγής των  $\alpha$  και μη  $\alpha$  αλυσίδων σφαιρίνης και ποικίλλει από την ασυμπτωματική μορφή του ετεροζυγώτη της  $\beta$ -θαλασσαιμίας (ελάσσων), έως την πιο σοβαρή κλινική εικόνα της μείζονος θαλασσαιμίας που απαιτεί διά βίου μετάγγιση (Mettananda *et al.*, 2017).



## 2. Επιδημιολογικά Χαρακτηριστικά

Οι αιμοσφαιρινοπάθειες, τα τελευταία χρόνια, αποτελούν ένα ευρωπαϊκό ζήτημα δημόσιας υγείας, κυρίως λόγω των μεταναστευτικών εισροών από χώρες με υψηλό επιπολασμό της νόσου, όπως είναι οι χώρες της Μεσογείου, η υποσαχάρια Αφρική, η Μέση Ανατολή, η Ινδική ήπειρος και η Νοτιοανατολική Ασία.

Σε παγκόσμιο επίπεδο, εκτιμάται ότι υπάρχουν >270.000.000 φορείς αιμοσφαιρινοπαθειών, εκ των οποίων 80.000.000 είναι φορείς β-θαλασσαιμίας.

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι 300.000- 400.000 βρέφη ετησίως παρουσιάζουν σοβαρές διαταραχές της αιμοσφαιρίνης, ενώ 23.000 γεννήσεις, ετησίως, αναλογούν σε βρέφη με μείζονα β-θαλασσαιμία. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι έως και το 90% των γεννήσεων αυτών συναντάται σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές (Modell and Darlison, 2008; Weatherall, 2010).

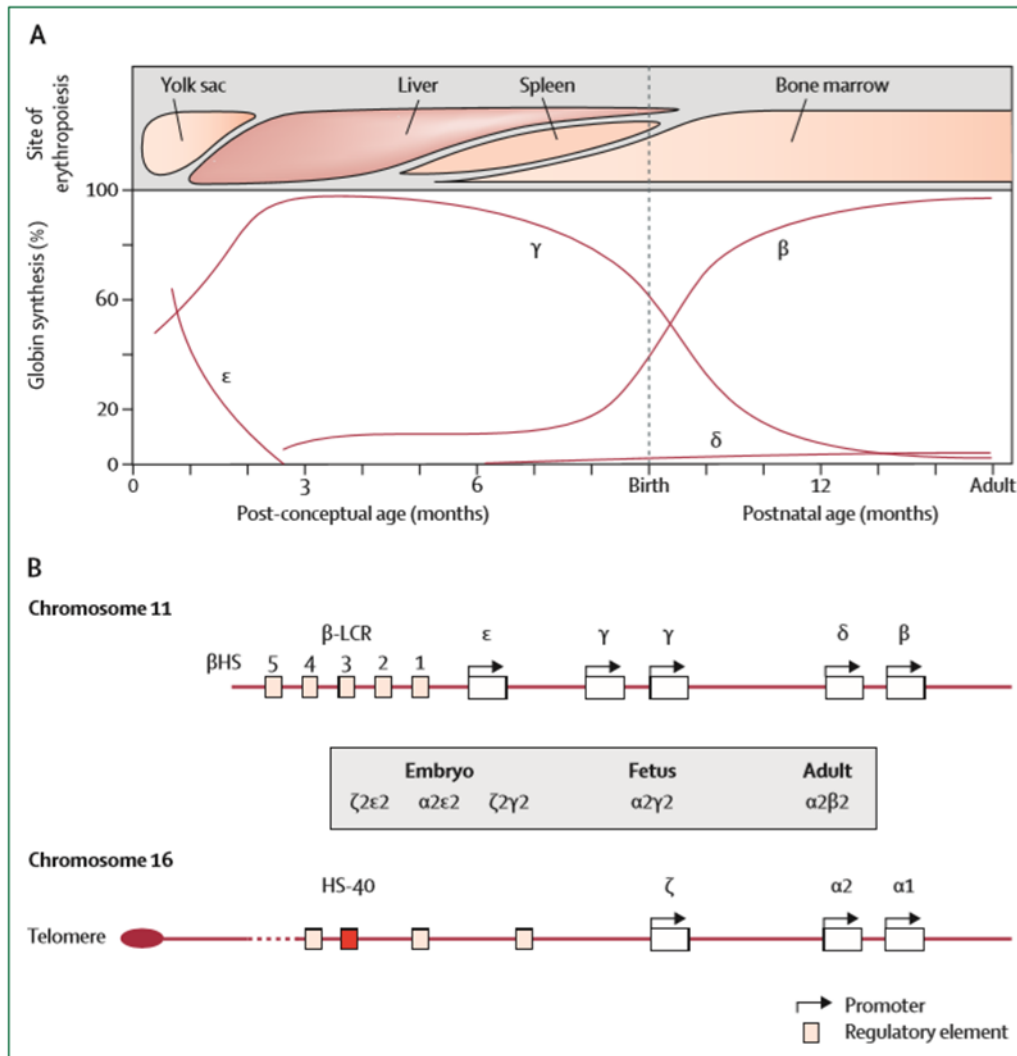
## 3. Παθογένεια

Τα τελευταία 50 χρόνια έχει γίνει μεγάλη πρόοδος στη διερεύνηση της γενετικής φύσης των διαταραχών της αιμοσφαιρίνης, με αποτέλεσμα τώρα να είναι γνωστές οι πλήρεις αλληλουχίες DNA των γενετικών τόπων της α- και β-σφαιρίνης και για πάνω από 1000 παραλλαγές αιμοσφαιρίνης.

Η αιμοσφαιρίνη είναι ένα τετραμερές μόριο, που αποτελείται από δύο α-τύπου αλυσίδες σφαιρίνης, καθεμία από τις οποίες αποτελείται από 141 αμινοξέα, και δύο β-τύπου αλυσίδες σφαιρίνης, καθεμία από τις οποίες αποτελείται από 146 αμινοξέα. Μία ομάδα αίμης στο μόριο της αιμοσφαιρίνης, η οποία δεσμεύει το οξυγόνο και διευκολύνει τη μεταφορά και την ανταλλαγή αερίων, συνδέεται μη ομοιοπολικά με κάθε πολυπεπτιδική αλυσίδα (McGann, Nero and Ware, 2017).

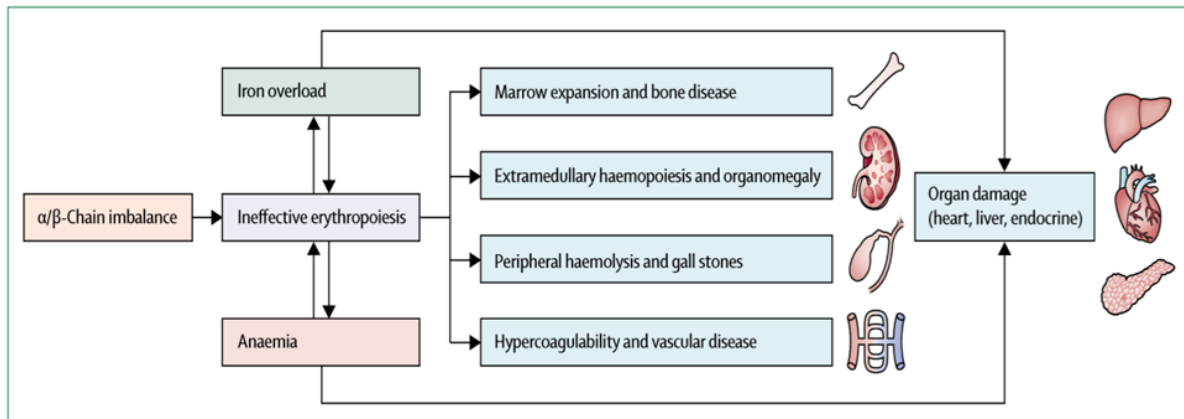
Κατά τα διάφορα στάδια ανάπτυξης του οργανισμού, παράγονται διαφορετικοί τύποι αιμοσφαιρίνης. Δύο διαδοχικά γονίδια στο χρωμόσωμα 16 (16p13.3), ρυθμίζουν την παραγωγή της α-σφαιρίνης, ενώ η παραγωγή της β-σφαιρίνης ρυθμίζεται από ένα μόνο γονίδιο που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11 (11p15.5). Κατά μήκος των χρωμοσωμάτων, πλην των δύο α και του β γονιδίου, βρίσκονται διατεταγμένα και άλλα γονίδια καθώς και ψευδογονίδια (στο χρωμόσωμα 16, τα ζ γονίδια και στο χρωμόσωμα 11, τα ε, Gγ, Aγ, δ γονίδια) με τη σειρά με την οποία εκφράζονται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης για να παράγουν διαφορετικά τετραμερή αιμοσφαιρίνης: εμβρυονική αιμοσφαιρίνη (HbGower-I [ $\zeta 2\epsilon 2$ ], HbGower-II [ $\alpha 2\epsilon 2$ ], και HbPortland [ $\zeta 2\gamma 2$ ]), εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη F( $\alpha 2\gamma 2$ ) και διαδοχικά τις αιμοσφαιρίνες των ενηλίκων A ( $\alpha 2\delta 2$ ) και A<sub>2</sub> ( $\alpha 2\beta 2$ ) (Weatherall and Clegg, 2001).

έκφραση των γονιδίων σφαιρίνης ελέγχεται από απομακρυσμένα ρυθμιστικά στοιχεία κατά μήκος των χρωμοσωμάτων, (Li, Q., et al., 2002; Bernini, L.F. and C.L. Harteveld, 1998.). Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν πέντε ρυθμιστικά στοιχεία που ρυθμίζουν την παραγωγή β-σφαιρίνης και αναφέρονται ως περιοχή ελέγχου γενετικού τύπου β-σφαιρίνης (β-LCR). Αντίστοιχα, υπάρχουν τέσσερα ρυθμιστικά στοιχεία, υπεύθυνα για την παραγωγή α-σφαιρίνης, εκ των οποίων ένα, το HS-40, φαίνεται να έχει τον κυρίαρχο ρόλο (Weatherall and Clegg, 2001).



Εικόνα 1. Σύνθεση του μορίου της αιμοσφαιρίνης. (Α) Διαδοχικά στάδια σύνθεσης της αιμοσφαιρίνης κατά την ανάπτυξη. (Β) Δομή συστάδας γονιδίων χρωμοσωμάτων 11 και 16 και τύποι αιμοσφαιρίνης που παράγονται (Higgs, Engel and Stamatoyannopoulos, 2012).

Η κύρια παθοφυσιολογία στη β-θαλασσαιμία έγκειται στην ανεπαρκή σύνθεση β αλυσίδων σφαιρίνης, προκειμένου να συνδεθούν με τις α αλυσίδες σφαιρίνης για τη δημιουργία των τετραμερών μορίων της αιμοσφαιρίνης των ενηλίκων A (α<sub>2</sub>β<sub>2</sub>). Η περίσσεια των α αλυσίδων δημιουργεί ομοτετραμερή μόρια(α<sub>4</sub>) που είναι ασταθή, σχηματίζουν ίζηματα και οδηγούν σε σχηματισμό αντιδραστικών ριζών οξυγόνου. Το ίζημα κατακρημνίζεται στα πρόδρομα κύτταρα της ερυθροειδούς σειράς, προκαλώντας δυσερυθροποίηση και βλάβη στη μεμβράνη των ώριμων ερυθρών αιμοσφαιρίων, προκαλώντας αιμόλυση με κύρια εκδήλωση τη χρόνια αναιμία και την επακόλουθο ιστική υποξία(Schrier, 1994).



Εικόνα 2. Παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί β-θαλασσαιμίας (Taher, Weatherall and Cappellini, 2018).

Η μειωμένη οξυγόνωση των ιστών οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων ερυθροποιητίνης και διέγερση της ερυθροποίησης με αποτέλεσμα την αναποτελεσματική ερυθροποίηση, καθώς τα ερυθρά που παράγονται δεν περιέχουν φυσιολογική αιμοσφαιρίνη.

Την αναποτελεσματική ερυθροποίηση ακολουθεί μια σειρά παθοφυσιολογικών μηχανισμών. Η αυξημένη ερυθροποίηση στο μυελό των οστών έχει σαν επακόλουθο να προκαλούνται σκελετικές παραμορφώσεις και οστεοπενία, αλλά και μάζες εξωμυελικής αιμοποίησης παρασπονδυλικά. Καθώς η εξωμυελική αιμοποίηση επεκτείνεται στον σπλήνα και στο ήπαρ, παρατηρείται σπληνομεγαλία και ηπατομεγαλία, αντίστοιχα. Η αυξημένη απορρόφηση του σιδήρου από το έντερο, αλλά κυρίως ο σίδηρος που προέρχεται από τις μεταγγίσεις, έχουν σαν αποτέλεσμα την υπερφόρτωση του οργανισμού με σίδηρο και την επακόλουθη νοσηρότητα διαφόρων οργάνων, κυρίως του ήπατος, της καρδιάς και των ενδοκρινών αδένων (Nienhuis and Nathan, 2012; Taher, Weatherall and Cappellini, 2018).

#### 4. Κλινικές Εκδηλώσεις

Η κλινική εικόνα των β-θαλασσαιμιών παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια ανάλογη της μοριακής τους βλάβης. Στους ετεροζυγώτες της β-θαλασσαιμίας, παρατηρείται μία ήπια έως μέτρια υπόχρωμη μικροκυτταρική αναιμία, χωρίς στοιχεία αιμόλυσης ή κλινικά ευρήματα, ενώ στους διπλούς ετεροζυγώτες ή ομοζυγώτες, δηλαδή στους πάσχοντες από μείζονα θαλασσαιμία, παρατηρείται μια σοβαρή μεταγγισιοεξαρτώμενη αιμολυτική αναιμία. Ως ενδιάμεση β-θαλασσαιμία αναγνωρίζεται ένας ηπιότερος κλινικός φαινότυπος. Σε αυτήν την περίπτωση παρατηρείται μια μέτρια, μη μεταγγισιοεξαρτώμενη αιμολυτική αναιμία. Περιστασιακά, μπορεί να χρειαστεί μετάγγιση, εάν υπάρξει επιδείνωση της αναιμίας, λόγω σχετικών επιπλοκών. Οι ασθενείς αυτοί παρουσιάζουν μία πιο ήπια κλινική εικόνα, λόγω της λιγότερο σοβαρής ανισορροπίας α και μη α-σφαιρίνης, με αποτέλεσμα τη μειωμένη περίσσεια ελεύθερων α-αλυσίδων, που προκαλούν αναποτελεσματική ερυθροποίηση. Σε αυτό μπορεί να συμβάλλει η κληρονομικότητα ηπιότερων μεταλλάξεων της β-θαλασσαιμίας, η συνύπαρξη α-θαλασσαιμίας ή και η συν-κληρονομικότητα μιας μετάλλαξης, που προκαλεί αυξημένη παραγωγή της γ-αλυσίδας της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης (Forget and Franklin Bunn, 2013).

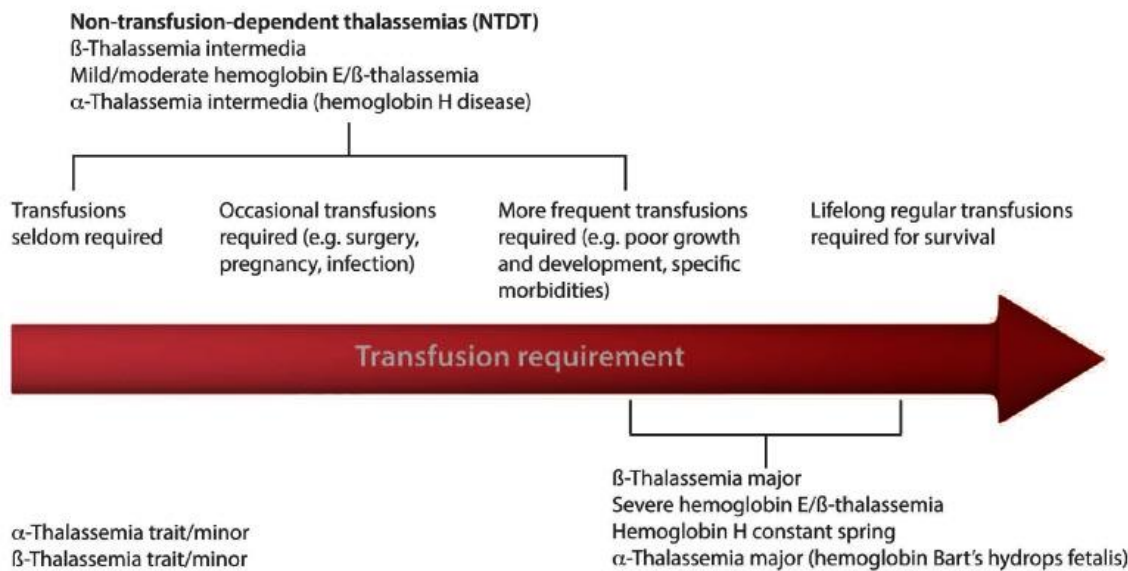
Καθώς τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης απενεργοποιούνται φυσιολογικά μεταξύ των πρώτων 6 μηνών και 2 ετών της ζωής, οι πρώτες κλινικές εκδηλώσεις των ασθενών με μείζονα θαλασσαιμία εμφανίζονται συνήθως εντός αυτού του χρονικού διαστήματος. Οι ασθενείς παρουσιάζουν συμπτώματα σοβαρής αναιμίας (Hb <7 g/dl), ίκτερο, ωχρότητα, καθυστέρηση στην ανάπτυξη, σκελετικές παραμορφώσεις, κοιλιακή διόγκωση λόγω προοδευτικής σπληνομεγαλίας και ηπατομεγαλίας, συχνές λοιμώξεις και σκελετικές παραμορφώσεις, με αποτέλεσμα να κρίνεται επιτακτική η ανάγκη τακτικών μεταγγίσεων. Οι ασθενείς που δεν έλαβαν θεραπεία ή η θεραπεία τους ήταν ανεπαρκής, παρουσιάζουν σε σημαντικό βαθμό καθυστέρηση της ανάπτυξης και οστικές αλλοιώσεις, οι οποίες περιλαμβάνουν παραμορφώσεις των μακριών οστών, κρανιακές παραμορφώσεις και οστεοπόρωση. Η έγκαιρη και σωστή αντιμετώπιση των ασθενών με μεταγγισιοεξαρτώμενη β-θαλασσαιμία, έχει σαν αποτέλεσμα την ελαχιστοποίηση των ευρημάτων (Mehta *et al.*, 2015).

## 5. Θεραπευτική Αντιμετώπιση

Η κλινική πορεία των ασθενών με β-θαλασσαιμία μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο κατά την πρώτη δεκαετία της ζωής, εάν αφηθούν χωρίς θεραπεία. Οι σημαντικές πρόοδοι κατά τις τελευταίες τρεις δεκαετίες στην αντιμετώπιση της νόσου, έχουν συμβάλλει στη συνεχή βελτίωση της επιβίωσης των ασθενών κι έχουν αλλάξει ριζικά την ποιότητα ζωής τους. (Ladis *et al.*, 2013). Η κλασική θεραπευτική αντιμετώπιση περιλαμβάνει συστηματικές μεταγγίσεις από την πρώιμη παιδική ηλικία, και την εντατική αποσιδήρωση. Η σπληνεκτομή και η αντιμετώπιση των επιπλοκών των διαφόρων οργάνων αποτελούν πρόσθετες θεραπευτικές ενέργειες, όπως και η ψυχολογική στήριξη. Ωστόσο, νεότερες προσεγγίσεις, όπως η μεταμόσχευση Αρχέγονων Αιμοποιητικών Κυττάρων (AAK), όπου μπορεί να εφαρμοστεί, έχει αποδώσει πολύ καλά αποτελέσματα (Modell, 1977). Ακολουθεί η Γονιδιακή Θεραπεία (ΓΘ) με ενθαρρυντικές προοπτικές (Neufeld *et al.*, 1972). Φαρμακευτικές ουσίες που παρεμβαίνουν στους παθογενεσιουργούς μηχανισμούς της νόσου βρίσκονται σε προχωρημένα στάδια κλινικών μελετών (Dussiot *et al.*, 2014; Cappellini *et al.*, 2020). Η ανάγκη συμμόρφωσης των ασθενών στη θεραπεία και η αυστηρή τήρηση των θεραπευτικών πρωτοκόλλων, αποτελούν προϋπόθεση για την αποτελεσματικότητα της. Η ανάπτυξη προηγμένων τεχνικών για την παρακολούθηση της επαγόμενης από τη μετάγγιση υπερφόρτωσης του οργανισμού με σίδηρο, όπως η απεικόνιση της καρδιάς και του ήπατος μέσω της μαγνητικής τομογραφίας αποτελούν σημαντικό παράγοντα για την παρακολούθηση και καλή διαχείριση της θεραπευτικής αντιμετώπισης.

### Μετάγγιση

Κατά την τελευταία δεκαετία, η διάκριση των θαλασσαιμιών βασίζεται σε μεγάλο βαθμό σε κριτήρια κλινικής διαχείρισης. Η διαδικασία των συστηματικών μεταγγίσεων, εκτός από την ασφάλεια και την κατάλληλη επεξεργασία των ερυθρών, περιλαμβάνει την εξασφάλιση της απαιτούμενης ποσότητας αίματος και τη διασφάλιση καθορισμένης συχνότητας των μεταγγίσεων. Έτσι, οι μεταγγίσεις αποτελούν τη βασική αντιμετώπιση και αντικατοπτρίζουν έμμεσα τη σοβαρότητα της νόσου. Με βάση τις ανάγκες του κάθε πάσχοντα για μετάγγιση, σήμερα η β-θαλασσαιμία, χαρακτηρίζεται ως εξαρτώμενη από τη μετάγγιση θαλασσαιμία (Transfusion Dependent Thalassemia- TDT) ή μη εξαρτώμενη από τη μετάγγιση θαλασσαιμία (Non-Transfusion Dependent Thalassemia- NTDT), με την τελευταία κατηγορία να απαιτεί περιστασιακά μεταγγίσεις. Η μετάγγιση στοχεύει στη διόρθωση της αναιμίας, εξουδετέρωση της υποξίας και καταστολή σε σημαντικό βαθμό όλων των υποκείμενων παθοφυσιολογικών μηχανισμών της νόσου (Taher, Weatherall and Cappellini, 2018).



Εικόνα 3. Κατηγοριοποίηση των διαφόρων τύπων θαλασσαιμίας ανάλογα με την ανάγκη για μετάγγιση (Musallam *et al.*, 2013).

### Υπερφόρτωση Σιδήρου και Αγωγή Αποσιδήρωσης

Η υπερφόρτωση του οργανισμού με σίδηρο αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα στη β-θαλασσαιμία τόσο για τους TDT, όσο και για τους NTDT ασθενείς, καθώς η κύρια αιτία που την προκαλεί είναι οι μεταγγίσεις ερυθρών αιμοσφαιρίων και λιγότερο η αυξημένη απορρόφηση σιδήρου από το γαστρεντερικό σωλήνα. Καθώς ο οργανισμός δε διαθέτει μηχανισμό αποβολής της περίσσειας του σιδήρου, ο σίδηρος μπορεί να συσσωρευτεί και να φτάσει σε τοξικά επίπεδα, σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα. Πιο συγκεκριμένα, δύο μονάδες αίματος ανά μήνα, οι οποίες περιλαμβάνουν 200-250mg σιδήρου ανά μονάδα, θα έχουν ως αποτέλεσμα την προσθήκη 20g περίσσειας σιδήρου στον οργανισμό σε 4 χρόνια (Cohen, 2006). Σημαντικό ρόλο στην ομοίωση του σιδήρου στον οργανισμό παίζει η εψιδίνη. Αν και φυσιολογικά, η υπερφόρτωση του οργανισμού με σίδηρο αυξάνει την παραγωγή εψιδίνης, με αποτέλεσμα τη μείωση της εντερικής απορρόφησης του σιδήρου, στη β-θαλασσαιμία η παραγωγή εψιδίνης είναι χαμηλή και κατά συνέπεια η απορρόφηση σιδήρου είναι υψηλή (Gardenghi *et al.*, 2010).

Στο πλάσμα, ο σίδηρος συνδέεται με την τρανσφερίνη. Όταν η προσδετική ικανότητα της τρανσφερίνης είναι πλέον κορεσμένη, σε ποσοστό >80%, ο σίδηρος συσσωρεύεται στον ορό σε ελεύθερη μορφή και ονομάζεται Non-Transferrin Bound Iron (NTBI). Η μεγαλύτερη ποσότητα του σιδήρου εισέρχεται στα κύτταρα μέσω ενός επιφανειακού υποδοχέα τρανσφερίνης (TfR1) και ενσωματώνεται κυρίως στην αίμη,

προκειμένου να σχηματίσει το μόριο της αιμοσφαιρίνης ή αποθηκεύεται αρχικά στα μακροφάγα κύτταρα του ΔΕΣ και στη συνέχεια στα παρεγχυματικά κύτταρα των διαφόρων οργάνων, κυρίως στο ήπαρ (80%), με τη μορφή της φερριτίνης. Ένα μικρό κλάσμα σιδήρου παραμένει χαλαρά συνδεδεμένο σε άλλες ενώσεις, όπως είναι η ασταθής δεξαμενή σιδήρου (LIP). Σε αυτή τη μορφή, ο «ελεύθερος» σίδηρος ενδοκυτταρικά αποτελεί ισχυρό καταλύτη για το σχηματισμό ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS), η αλληλεπίδραση των οποίων με τα κυτταρικά συστατικά είναι τοξική (Hershko *et al.*, 1978; Maria Sposi, 2020).

Τρεις χηλικοί παράγοντες βρίσκονται επί του παρόντος σε κλινική χρήση, δεσμεύοντας την ελεύθερη τοξική μορφή της περίσσειας σιδήρου και διευκολύνοντας με αυτό τον τρόπο την απέκκρισή του.

Η δεφεροξαμίνη (DFO), είναι η πρώτη που χρησιμοποιήθηκε κλινικά. Αν και οι ανεπιθύμητες ενέργειες που παρουσιάζει η χρήση της είναι ελάχιστες, ο τρόπος χορήγησής της μέσω βραδείας υποδόριας έγχυσης με τη βοήθεια φορητής αντλίας, καθιστά τη συμμόρφωση των ασθενών χαμηλή.

Η δεφεριπρόνη (DFP), αποτελεί τον πρώτο από του στόματος χηλικό παράγοντα, που συμβάλλει στην απομάκρυνση της περίσσειας σιδήρου κυρίως από την καρδιά. Η κύρια επιπλοκή της συγκεκριμένης ουσίας είναι η ουδετεροπενία σε ποσοστό περίπου 5%.

Τέλος, η δεφερασιρόξη (DFX) είναι ο νεότερος από του στόματος χηλικός παράγοντας. Ανεπιθύμητες ενέργειες εμφανίζονται σε ποσοστό 10% των ασθενών και περιλαμβάνουν κοιλιακό άλγος, ναυτία, διάρροια, καθώς και δυσλειτουργία του ήπατος και των νεφρών. Μία νέα μορφή επικαλυπτόμενων δισκίων με λεπτό υμένιο, καθιστά πιο εύκολη τη χρήση του, καθώς δε χρειάζεται διάλυση σε εναιώρημα.

Συνήθως στην κλινική πράξη, η αποτελεσματικότητα είναι μεγαλύτερη με το συνδυασμό των χηλικών παραγόντων (Fibach and Rachmilewitz, 2017).

Η εκτίμηση των επιπέδων φερριτίνης στον ορό είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την αξιολόγηση της υπερφόρτωσης σιδήρου στη θαλασσαιμία, καθώς είναι αρκετά ακριβής και μη επεμβατική. Όταν τα επίπεδα της φερριτίνης φτάνουν τα 1000 ng/l (περίπου ύστερα από 10-12 μονάδες αίματος), κρίνεται αναγκαία η έναρξη θεραπείας αποσιδήρωσης.

### **Σπληνεκτομή**

Η μη αποδοτική ερυθροποίηση, που χαρακτηρίζει τα θαλασσαιμικά σύνδρομα, οδηγεί στην αύξηση, μέσω της υπερπλασίας του ερυθροποιητικού μυελού, εξωμυελικών μαζών ερυθροποίησης, αλλά και ενεργοποίηση εμβρυϊκών αιμοποιητικών εστιών, όπως ο σπλήνας με αποτέλεσμα τη διόγκωση του οργάνου. Ο αυξημένος όγκος του σπληνός συνεπάγεται και

μεγαλύτερη έκταση του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος (ΔΕΣ), μεγαλύτερη καταστροφή των ήδη επιβαρυσμένων ερυθροκυττάρων, αλλά και των λευκών και των αιμοπεταλίων. Ο συνδυασμός της διόγκωσης και της αυξημένης καταστροφής των έμμορφων συστατικών του αίματος καλείται υπερσπληνισμός, που αντιμετωπίζεται με σπληνεκτομή. Σήμερα με τις συστηματικές μεταγγίσεις και την καταπίεση της μη αποδοτικής ερυθροποίησης, η ανάγκη για σπληνεκτομή έχει πλέον περιοριστεί σε παραμελημένες περιπτώσεις. Καθώς οι τιμές των αιμοπεταλίων, των ερυθρών και λευκών αιμοσφαιρίων αυξάνονται μετά τη σπληνεκτομή, οι ασθενείς εκτίθενται σε κίνδυνο για θρομβωτικά επεισόδια, γι' αυτό πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η ανάγκη αντιπηκτικής θεραπείας, όπως η χαμηλή δόση ασπιρίνης (Carpellini *et al.*, 2005).

### **Μεταμόσχευση Αρχέγονων Αιμοποιητικών Κυττάρων (ΑΑΚ)**

Η μεταμόσχευση ΑΑΚ από συμβατό συγγενικό δότη αποτελεί μία εναλλακτική θεραπευτική επιλογή για τα παιδιά με β-θαλασσαιμία και είναι η μόνη που μπορεί να επιφέρει την ίαση. Ωστόσο, αυτή η επιλογή περιορίζεται λόγω της περιορισμένης διαθεσιμότητας των κατάλληλων δοτών και λόγω των κινδύνων που σχετίζονται με τη διαδικασία μεταμόσχευσης (Lucarelli *et al.*, 2012).

### **Γονιδιακή Θεραπεία**

Η γονιδιακή θεραπεία έγκειται στη μεταφορά της φυσιολογικού γονιδίου σφαιρίνης, μέσω ιικών φορέων, σε αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα του ασθενούς, αποσκοπώντας στην ισόβια παραγωγή φυσιολογικών ερυθρών αιμοσφαιρίων. Καθώς στοχεύει στη γενετική διόρθωση αυτόλογων CD34<sup>+</sup> αιμοποιητικών κυττάρων, απαλλάσσει από την ανάγκη ανεύρεσης της συμβατού δότη, καθώς και από της ανοσολογικές επιπλοκές της αλλογενούς μεταμόσχευσης. Αν και εξακολουθούν να υπάρχουν ανησυχίες όσον αφορά στην ασφάλεια των τρεχουσών προσεγγίσεων γονιδιακής τροποποίησης, στην ειδικότητα των νουκλεασών και στην ικανότητα του διαγονιδίου να περιοριστεί στα κύτταρα-στόχους, τα μέχρι στιγμής δεδομένα από την κλινική έρευνα, φαίνεται ότι φέρνουν ενθαρρυντικές εξελίξεις για της ασθενείς, καθώς πρόκειται για μία θεραπευτική προσέγγιση με προοπτική την οριστική ίαση των αιμοσφαιρινοπαθειών (Arumugam and Malik, 2010; Thompson *et al.*, 2018).



## 6. Ηπατική Νόσος

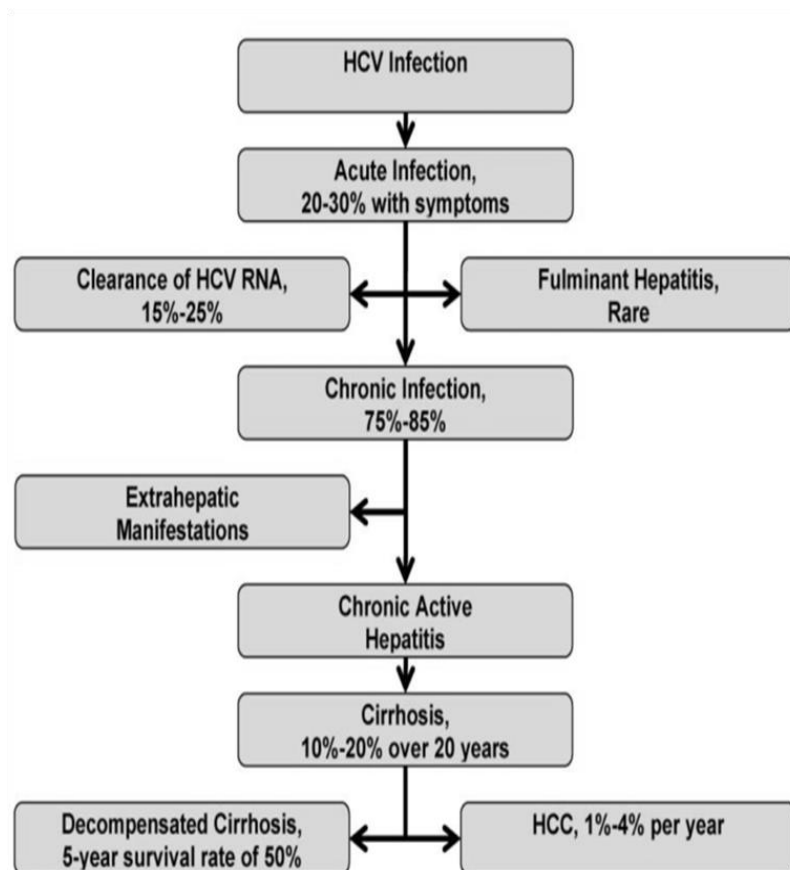
Οι ασθενείς με β-θαλασσαιμία αναπτύσσουν συχνά χρόνια ηπατική νόσο. Οι κύριες αιτίες της ηπατικής βλάβης της θαλασσαιμικούς ασθενείς είναι η **λοίμωξη με τον ιό της ηπατίτιδας C (Hepatitis C Virus–HCV)**, η οποία μπορεί να προκληθεί από τη μετάγγιση ή η **ηπατική υπερφόρτωση σιδήρου** (Prati *et al.*, 2004).

Το κύριο κλινικό χαρακτηριστικό της ηπατικής βλάβης είναι η ίνωση. Η ανάπτυξη της ίνωσης είναι μια σταδιακή διαδικασία, ξεκινώντας από την ινώδη διεύρυνση των πυλαίων διαστημάτων, ακολουθούμενη από μια πιο εκτεταμένη ίνωση στο ηπατικό παρέγχυμα, όπου μπορεί να προκύψει γεφυροποιός ίνωση με σχηματισμό όζου και τελικά κίρρωση, η οποία ενέχει μεγάλο κίνδυνο ανάπτυξης ηπατοκυτταρικού καρκίνου (Hepatocellular Carcinoma–HCC)(Pinzani, Romanelli and Magli, 2001). Όταν υπάρχει υποψία κίρρωσης του ήπατος, εκτός από της συνήθεις βιοχημικούς δείκτες (ALT, AST και γGT), τα επίπεδα του υαλουρονικού οξέος μπορούν να βοηθήσουν στη διάγνωση. Ωστόσο, η βιοψία του ήπατος αποτελεί τη βασική μέθοδο για την ασφαλή διάγνωση (Leroy, 2008).

### Λοίμωξη με τον ιό της Ηπατίτιδας C

Οι ασθενείς με μείζονα θαλασσαιμία διατρέχουν μεγάλο κίνδυνο ανάπτυξης ηπατικής νόσου, λόγω πιθανής λοίμωξης με τον ιό της ηπατίτιδας C, η οποία μπορεί να προκληθεί από τις μεταγγίσεις (Soliman *et al.*, 2014). Κατά τη δεκαετία του '90, η μόλυνση με τον ιό της ηπατίτιδας C μέσω των μεταγγίσεων μειώθηκε δραματικά, λόγω ειδικών δοκιμασιών για την ανίχνευση αντισωμάτων κατά του ιού της ηπατίτιδας C στο μεταγγιζόμενο αίμα (Vrieland *et al.*, 1995).

Το φάσμα των κλινικών εκδηλώσεων της HCV λοίμωξης ποικίλλει από την οξεία λοίμωξη, η οποία είναι δύσκολο να διαγνωστεί, καθώς το 70%-80% των μολυσμένων ατόμων είναι ασυμπτωματικά, στη χρόνια λοίμωξη, την οποία ακολουθεί μία σειρά επιπλοκών, γι αυτό και η κλινική προσέγγιση και διαχείριση της νόσου σε κάθε περίπτωση είναι διαφορετική. Το 75%-85% των ατόμων που έχουν μολυνθεί από τον ιό αναπτύσσουν χρόνια λοίμωξη και διατρέχουν κίνδυνο για προχωρημένη ίνωση του ήπατος, εξωηπατικές επιπλοκές, συμπεριλαμβανομένων νεφρικών, δερματολογικών, αιματολογικών και ρευματολογικών διαταραχών, κίρρωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC)(El-Serag *et al.*, 2002). Υπολογίζεται ότι το 10%-20% των χρόνιων λοιμώξεων από HCV προχωρούν σε ηπατική νόσο τελικού σταδίου μέσα σε μία ή δύο δεκαετίες (Seeff, 2002). Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα μπορεί να αναπτυχθεί σε ποσοστό 1-5% των ατόμων που έχουν μολυνθεί με HCV, ιδιαίτερα μετά την ανάπτυξη κίρρωσης, με μία αύξηση κατά 1-4% ετησίως για τα επόμενα χρόνια (Serfaty *et al.*, 1998; Hu and Tong, 1999; Degos *et al.*, 2000).



Εικόνα 4. Η φυσική ιστορία της ΗCV λοίμωξης (Chen and Morgan, 2006)

Η θεραπεία αναφοράς για τη χρόνια ηπατίτιδα C ήταν για πολλές δεκαετίες ο συνδυασμός πεγκυλιωμένης ιντερφερόνης (Peginterferon Alfa-2a) και ριμπαβιρίνης (Ribavirin-RBV), για 24 εβδομάδες για τους γονοτύπους 2 και 3 ή 48 εβδομάδες για τους γονοτύπους 1, 4, 5 και 6, ο οποίος οδηγεί σε παρατεταμένη κάθαρση του ιού της ηπατίτιδας C (HCV) σε ένα ποσοστό που κυμαίνεται από 33%-42% στον γονότυπο 1 έως και 90% στους γονοτύπους 2 και 3 (Parfieniuk, Jaroszewicz and Flisiak, 2007). Εκτός από την περιορισμένη αποτελεσματικότητα αυτού του θεραπευτικού σχήματος, το IFN σχετίζεται με νευροψυχιατρικές και καρδιαγγειακές επιπλοκές, κυτταροπενίες και αντιδράσεις στο σημείο της έγχυσης, και ο RBV προκαλεί αιμολυτική αναιμία και αντενδείκνται αυστηρά κατά την εγκυμοσύνη, ενώ στους ασθενείς με θαλασσαιμία οδηγεί σε σοβαρή αύξηση των αναγκών σε αίμα (Enomoto *et al.*, 2004).

Ο κύκλος ζωής του ιού της ηπατίτιδας C έχει διεκρινιστεί σε μεγάλο βαθμό λεπτομερώς και αυτό οδήγησε στην ανάπτυξη νέων στοχευμένων θεραπευτικών σχημάτων, που μετέφεραν το πρότυπο θεραπείας από την ευρεία διαμόρφωση της ανοσοαπόκρισης του ασθενούς στη στόχευση συγκεκριμένων ενζύμων στον κύκλο ζωής της ηπατίτιδας C.

Ο HCV είναι ένας RNA ιός, το γονιδίωμα του οποίου αποτελείται από ένα μεγάλο ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF-Open Reading Frame), πλαισιωμένο από 5' και 3'

αμετάφραστες περιοχές (UTRs-UntranslatedRegions). Και οι δύο αμετάφραστες περιοχές είναι συντηρημένες και έχουν τον έλεγχο της ιογενούς μετάφρασης και αναπαραγωγής. Το 5'-μη μεταφραζόμενο άκρο του RNA (5'-UTR) δεν έχει καλύπτρα-cap, όπως τα ευκαρυωτικά mRNAs, αλλά έχει μια ομάδα υψηλά οργανωμένων δομών RNA που ονομάζεται IRES (Internal Ribosome Entry Site). Κατά την HCV IRES εξαρτώμενη μετάφραση του ORF, η πρόσδεση του ριβοσώματος του ξενιστή πραγματοποιείται σε εσωτερική περιοχή του RNA του ιού και παράγεται μια ενιαία πρόδρομη πολυπρωτεΐνη που μέσω μετα-μεταφραστικής τροποποίησης από κυτταρικές και ιικές πρωτεάσες, οδηγεί στην ωρίμανση 10 πρωτεϊνών: τρεις από αυτές είναι δομικές πρωτεΐνες και οι υπόλοιπες επτά είναι μη δομικές πρωτεΐνες. Τα φάρμακα που είναι διαθέσιμα για τη θεραπεία της λοίμωξης HCV στοχεύουν τρεις μη δομικές πρωτεΐνες: την **πρωτεάση NS3 (και τον συμπαράγοντά της, NS4A)**, ο ρόλος της οποίας είναι καθοριστικός για την αντιγραφή του, την **NS5B RNA-εξαρτώμενη πολυμεράση** και την **NS5A**, μίας πολυ-λειτουργικής πρωτεΐνης που αποτελεί σημαντικό συστατικό μέρος του συμπλέγματος αντιγραφής του HCV (Reynolds *et al.*, 1996; Fusco and Chung, 2012).

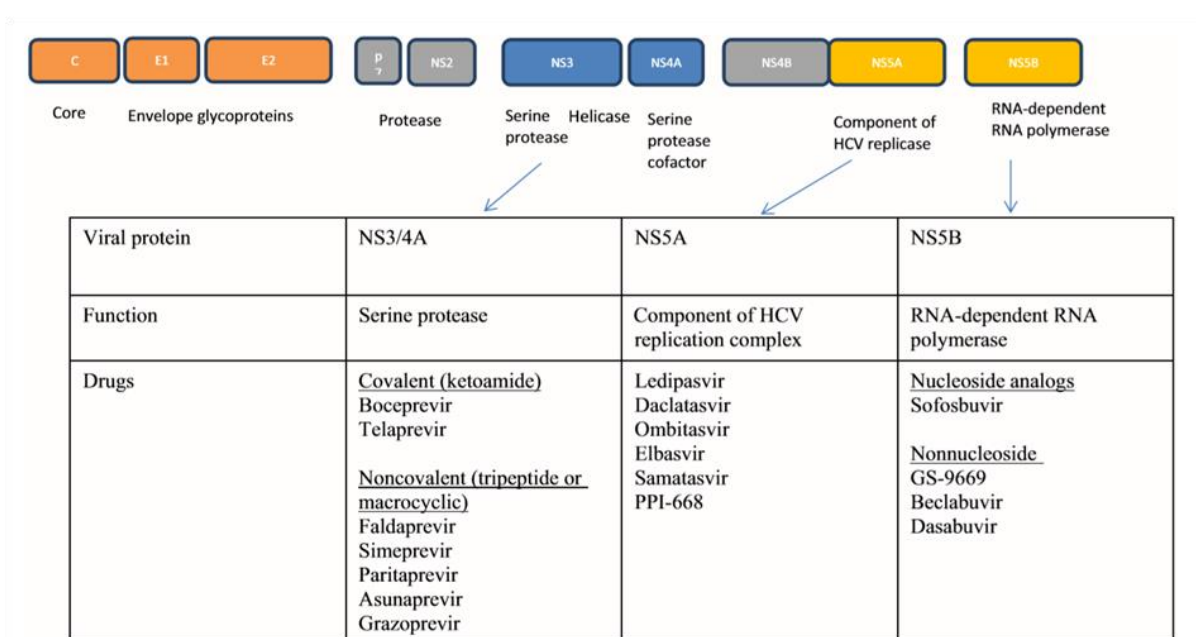
Επί του παρόντος, χάρη στα αντιϊκά άμεσης δράσης (DAA-Direct-Acting Antiviral), η λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας C είναι θεραπεύσιμη και ο στόχος της θεραπείας είναι η επίτευξη παρατεταμένης ιολογικής απόκρισης (SVR-Sustained Virological Response), που θεωρείται η απουσία HCV RNA στο πλάσμα 12-24 εβδομάδες μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας (Ghany *et al.*, 2009).

Τα πρώτα δύο από του στόματος φάρμακα άμεσης δράσης (DAA), η τελαπρεβίρη (telaprevir), ένας αναστολέας της πρωτεάσης της σερίνης (NS3•4A) του ιού της ηπατίτιδας C και ημποσεπρεβίρη (boceprevir), ένας αναστολέας της NS3 πρωτεάσης, που στοχεύουν στην παρεμπόδιση της αντιγραφής του ιού στα επιμολυνθέντα με HCV κύτταρα-ξενιστές, εγκρίθηκαν το 2011 και μπόρεσαν να βελτιώσουν το SVR στις 12 εβδομάδες (SVR12) σε ασθενείς με λοίμωξη HCV γονότυπου 1 από κάτω <50% - 75% σε ασθενείς που δεν είχαν λάβει θεραπεία. Ωστόσο, τα φάρμακα αυτά σχετίζονται με πολλές παρενέργειες και συγχορήγηση IFN και RBV (Jacobson *et al.*, 2011; Poordad *et al.*, 2011). Έπειτα, από το 2004 πραγματοποιήθηκαν κλινικές δοκιμές για νέες αντιϊκές θεραπείες, οι οποίες είχαν ελπιδοφόρα αποτελέσματα λόγω της επίτευξης παρατεταμένης ιολογικής απόκρισης και έτσι σήμερα, υπάρχουν διαθέσιμα αρκετά αντιϊκά άμεσης δράσης (DAA's), τα οποία αναφέρονται παρακάτω:

- **Sovaldi**, του οποίου η δραστική ουσία, η σοφοσμπουβίρη (sofosbuvir) αναστέλλει τη δράση ενός ενζύμου του ιού, της NS5B RNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης, το οποίο είναι απαραίτητο για τον πολλαπλασιασμό του.
- **Harvoni**, ένας συνδυασμός της σοφοσμπουβίρης (sofosbuvir) με την λεντιπασβίρη (ledipasvir), που αποτελεί έναν αναστολέα της πρωτεΐνης NS5A.

- **Viekirax**, ένας συνδυασμός παριταπρεβίρης (paritaprevir) με ριτοναβίρη(ritonavir) και ομπιτασβίρη (ombitasvir). Η ομπιτασβίρη αναστέλλει τη δράση της πρωτεΐνης NS5A, ενώ η παριταπρεβίρη αναστέλλει τη δράση της πρωτεΐνης NS3/4A, αμφότερες απαραίτητες για τον πολλαπλασιασμό του ιού.
- **Exviera**, η δραστική ουσία του οποίου, ντασαμπουβίρη (dasabuvir), αναστέλλει την NS5B RNA-εξαρτώμενη πολυμεράση.
- **Epclusa**, ένας άλλος συνδυασμός της σοφοσμπουβίρης (sofosbuvir) με τη βελπατασβίρη(velpatasvir), έναν αναστολέα της NS5A πρωτεΐνης.
- **Zepatier**, ένας συνδυασμός γραζοπρεβίρης (grazoprevir), η οποία αναστέλλει τη δράση της NS3/4A πρωτεάσης, με την ελμπασβίρη (elbasvir), αναστολέα της NS5A πρωτεΐνης του ιού.
- **Maviret**, ένας συνδυασμός γκλεκαπρεβίρης (glecaprevir), που αναστέλλει τη δράση της πρωτεάσης NS3/4A και πιμπρεντασβίρης (pibrentasvir), ενός παν-γονοτυπικού αναστολέα της NS5A του HCV, η οποία είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του ιϊκού RNA και τη συγκρότηση του ιού.
- **Vosevi**, συνδυασμός σοφοσμπουβίρης (sofosbuvir), βελπατασβίρης (velpatasvir) που αποτελεί αναστολέα της δράσης της πρωτεΐνης NS5A και βοξίλαπρεβίρης (voxilaprevir), που αναστέλλει τη δράση της πρωτεάσης NS3/4A.

Σε μερικούς συνδυασμούς εξακολουθεί να προστίθεται και η ριμπαβιρίνη (ribavirin).



Εικόνα 5. Τα 10 πρωτεϊνικά συστατικά της HCV πολυπρωτεΐνης και οι αντίστοιχοι αντίικοί παράγοντες άμεσης δράσης (Gutierrez, Lawitz and Poordad, 2015)

Η θεραπεία για την Ηπατίτιδα C περιλαμβάνει συνδυασμό φαρμάκων και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως από το γονότυπο της Ηπατίτιδας C, το ιϊκό φορτίο, το στάδιο της λοίμωξης (οξεία HCV λοίμωξη και χρόνια HCV λοίμωξη), τις προηγούμενες θεραπείες, την αντοχή στα φάρμακα και στις παρενέργειές τους και την κατάσταση του ήπατος και το βαθμό της ηπατικής βλάβης (Kowdley *et al.*, 2013; Ferenci *et al.*, 2014; Lawitz *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2020).

Η αποτελεσματικότητα των θεραπευτικών σχημάτων με αντιϊκά φάρμακα είναι παρόμοια σε ασθενείς με HCV και HIV συλλοίμωξη, όπως και σε ασθενείς με μόνο HCV λοίμωξη. Ιδιαίτερη προσοχή σε αυτή την ομάδα ασθενών απαιτούν οι πιθανές φαρμακευτικές αλληλεπιδράσεις με τα αντιρετροϊκά φάρμακα (Chung *et al.*, 2004).

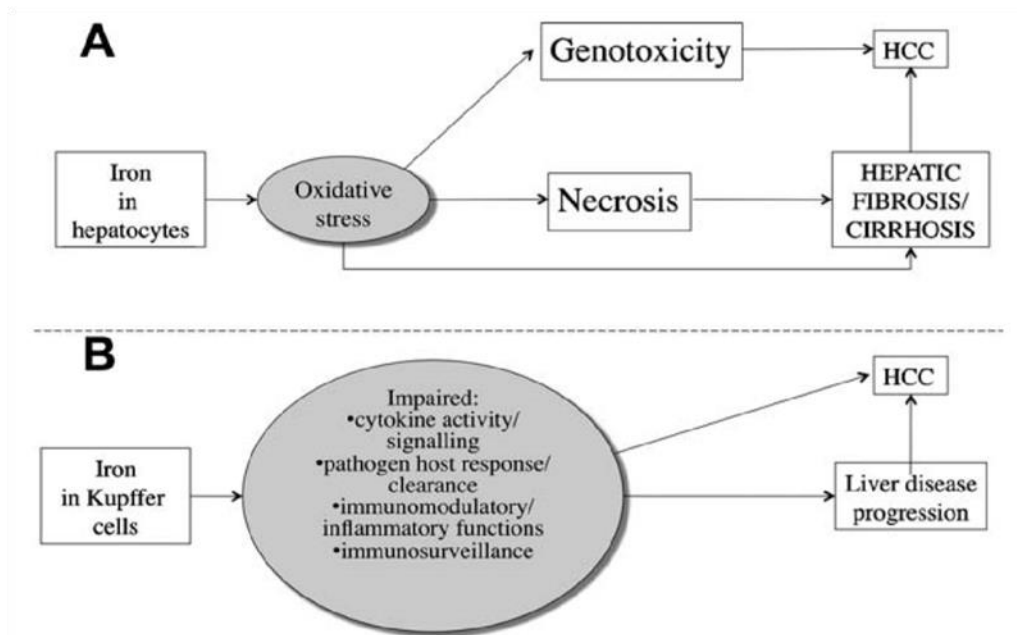
### **Ηπατική υπερφόρτωση σιδήρου**

Στους ασθενείς με β-θαλασσαιμία που χρειάζονται τακτικές μεταγγίσεις, παρατηρείται υπερφόρτωση σιδήρου, κυρίως ως αποτέλεσμα της συσσώρευσης σιδήρου από τις μεταγγίσεις, και σε μικρότερο βαθμό, λόγω αυξημένης εντερικής απορρόφησης. Αντίθετα, στους μη μεταγγισιοεξαρτώμενους ασθενείς με β-θαλασσαιμία, παρατηρείται υπερφόρτωση σιδήρου εξαιτίας της αυξημένης εντερικής απορρόφησης του σιδήρου λόγω της αναποτελεσματικής ερυθροποίησης και καταστολής της εψιδίνης (Gardenghi *et al.*, 2007). Σε κάθε περίπτωση, σε συνθήκες περίσσειας σιδήρου στον οργανισμό, ο «ελεύθερος» και «μη-συνδεδεμένος με τρανσφερίνη» σίδηρος καταλύει την παραγωγή ελευθέρων ριζών, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την υπεροξειδωση των λιπιδίων και την επαγόμενη ηπατοτοξικότητα.

Στις χρόνιες ηπατικές παθήσεις, αποθέματα σιδήρου μπορεί να βρίσκονται στα ηπατοκύτταρα, στα κύτταρα Kupffer ή και στα δύο. Η ικανότητα του σιδήρου να καταλύει τη δημιουργία εξαιρετικά δραστικών ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) κάνει τα ηπατοκύτταρα ευαίσθητα στο οξειδωτικό στρες, μία επιβλαβή διαδικασία που είναι σημαντικός παράγοντας πρόκλησης καταστροφών στις δομές των κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των λιπιδίων των μεμβρανών, των πρωτεϊνών και του DNA. Η τροποποίηση του γενετικού υλικού εξαιτίας της οξειδωτικής βλάβης αποτελεί το πρώτο βήμα στην καρκινογένεση (Hileman *et al.*, 2004). Καθώς ο σίδηρος συνεχίζει να συσσωρεύεται, παρατηρείται μια προοδευτικά επιδεινούμενη απόπτωση ή και νέκρωση των ηπατοκυττάρων, διήθηση των ηπατικών λοβίων από φλεγμονώδη κύτταρα και ίνωση, η οποία μπορεί να εξελιχθεί έως το τελικό στάδιο της ηπατικής νόσου, που είναι η κίρρωση και ο ηπατοκυτταρικός καρκίνος. (Guicciardi *et al.*, 2013).

Ο σίδηρος που απελευθερώνεται από τα νεκρωμένα ηπατικά κύτταρα παραλαμβάνεται από τα φαγοκυτταρικά κύτταρα Kupffer. Η υπερβολική εναπόθεση σιδήρου στα κύτταρα αυτά μπορεί να επηρεάσει την ανοσορρυθμιστική και φλεγμονώδη δράση τους, την άμυνα κατά των παθογόνων και ιογενών λοιμώξεων, την ανοσιακή επιτήρηση ή την απόκριση σε ανοσορρυθμιστικά φάρμακα. Οι παραγόμενες ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και το οξειδωτικό

stress που προκαλούν, οδηγούν σε υπεροξειδωση λιπιδίων, με αποτέλεσμα την επαγωγή κυτταροκινών (TNF-a, TGF-b, K-8), προάγοντας την ινογένεση και την ηπατοκυτταρική νέκρωση (Sibille, Kondo and Aisen, 1988; Stal *et al.*, 1995; Pietrangelo, 2009).



Εικόνα 6.

Επιδράσεις της υπερφόρτωσης σίδηρου στα ηπατοκύτταρα(6A) ή στα κύτταρα Kupffer(6B) στη χρόνια εξέλιξη της ηπατικής νόσου και στην ανάπτυξη HCC(Pietrangelo,2009).

Η πρόληψη και η έγκαιρη διάγνωση του Ηπατοκυτταρικού καρκίνου είναι πιο αποτελεσματικές από την προσπάθεια θεραπείας του. Γι'αυτό το λόγο,όλοι οι ασθενείς, θα πρέπει να υποβάλλονται,σε τακτά διαστήματα,σε έλεγχο με μαγνητική τομογραφία ήπατος (MRI),υπερηχογράφημα ήπατος και μέτρηση των επιπέδων της άλφα-φετοπρωτεΐνης(AFP) στον ορό, έχοντας υπόψιν ότι τα φυσιολογικά επίπεδά της δεν αποκλείουν τη διάγνωση(Manghisi *et al.*, 1998; Krinsky *et al.*, 2001; Colli *et al.*, 2019)

Η εξέλιξη της ηπατικής νόσου μπορεί να διαρκέσει χρόνια ή δεκαετίες.Η σταδιοποίηση της νόσου είναι επομένως πρωταρχικής κλινικής σημασίας για την προγνωστική αξιολόγηση σε κάθε ασθενή(Sebastiani and Alberti, 1995).

## 7. Μέθοδοι προσδιορισμού φορτίου σιδήρου (Fe)

Το φορτίο σιδήρου μπορεί να εκτιμηθεί μέσω της μέτρησης των επιπέδων φερριτίνης, σιδήρου και TIBC (TotalIronBoundCapacity). Καθώς, όμως, οι τιμές αυτές δεν είναι ειδικές, τα επίπεδα του ηπατικού σιδήρου, που αντανακλούν σε πολύ μεγάλο βαθμό τον συνολικό σίδηρο του οργανισμού, μπορούν να αξιολογηθούν με τη διενέργεια Βιοψίας ήπατος, Μαγνητικής Τομογραφίας (MRI) και μέσω της Συσκευής Υπεραγώγιμης Κβαντικής Συμβολής (SQUID) (Busca *et al.*, 2010). Η βιοψία ήπατος θεωρείται η “goldstandard” μέθοδος για την εκτίμηση του βαθμού της φλεγμονής, του σταδίου της ίνωσης και της συγκέντρωσης σιδήρου (LIC) στο ήπαρ. Μειονέκτημα της μεθόδου είναι ο επεμβατικός χαρακτήρας και η δυσκολία επαναληψιμότητας. Σήμερα η επικρατέστερη μέθοδος εκτίμησης του σιδήρου στα όργανα είναι το MRI ήπατος, καρδιάς ή και άλλων οργάνων, ενώ το SQUID δεν έχει πρακτική εφαρμογή.

Η εκτίμηση της ποσότητας του σιδήρου στο ήπαρ (LIC), όσο και ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του καρδιακού σιδήρου χρησιμοποιώντας την τεχνική T2\* μέσω της μαγνητικής τομογραφίας, δίνουν μία αξιόπιστη εκτίμηση για τα συνολικά αποθέματα του σιδήρου στον οργανισμό και ειδικότερα για κάθε όργανο χωριστά.

Καθορισμένα όρια LIC και καρδιακού T2\* έχουν συσχετιστεί με τη νοσηρότητα σε TDT και NTDT πάσχοντες. Πιο συγκεκριμένα, το T2\* μειώνεται όσο αυξάνεται η συγκέντρωση σιδήρου του μυοκαρδίου. Τιμή T2\* ίση με 10ms προβλέπει υψηλότερο κίνδυνο καρδιακής ανεπάρκειας και θνησιμότητας, ενώ οι τιμές μεταξύ 10-20ms σχετίζονται με μειωμένο κλάσμα εξώθησης της κάτω αριστερής κοιλίας (LVEF) και αρρυθμίες σε ασθενείς με TDT.

Στο ήπαρ, τιμή T2\* που αντιστοιχεί σε LIC ίση με 5mg/g dw σχετίζεται με αυξημένη νοσηρότητα στους μη μεταγγισιοεξαρτώμενους θαλασσαιμικούς ασθενείς, ενώ τιμή LIC ίση με 7mg/g dw υποδεικνύει αυξημένο κίνδυνο επιπλοκών που σχετίζονται με την υπερφόρτωση σιδήρου στους μεταγγισιοεξαρτώμενους ασθενείς. Τέλος, τιμή LIC ίση με 15mg/g dw είναι προγνωστική για προχωρημένη ίνωση του ήπατος, θνησιμότητα και αυξημένο κίνδυνο καρδιακής νόσου σε μεταγγισιοεξαρτώμενους ασθενείς (Taher and Saliba, 2017).

## B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1. ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας αναδρομικής μελέτης είναι η εκτίμηση της προγνωστικής αξίας των ιστολογικών ευρημάτων της βιοψίας ήπατος στη μακροχρόνια νοσηρότητα και θνητότητα των ασθενών με μεσογειακή αναιμία.

Οι **πρωταρχικοί στόχοι** είναι η εκτίμηση της επιβίωσης χωρίς ηπατική νοσηρότητα ανάλογα με το στάδιο της ηπατικής νόσου, βάσει των ιστολογικών ευρημάτων.

Οι **δευτερεύοντες στόχοι** είναι η συσχέτιση της ηπατικής ίνωσης και σιδήρωσης βάσει των ιστολογικών ευρημάτων με τους ορολογικούς δείκτες και τη λοίμωξη με τον ιό της ηπατίτιδας C και η προγνωστική αξία αυτών στην εξέλιξη της ηπατικής νόσου σε μη αντιρροπούμενη κίρρωση, εμφάνιση ηπατοκυτταρικού καρκίνου ή θάνατο από ηπατικά αίτια.

### 2. Υλικό και Μέθοδος

#### **Πληθυσμός Μελέτης**

Για τη διεξαγωγή αυτής της αναδρομικής μελέτης, επιλέχθηκαν από το αρχείο της Μονάδας Μεσογειακής Αναιμίας του Γενικού Νοσοκομείου Παίδων Αθηνών, «Η Αγία Σοφία», περιπτώσεις ασθενών με β-ΜΑ, που υποβλήθηκαν σε βιοψία ήπατος, τη χρονική περίοδο 1992-2005. Συλλογή δεδομένων πραγματοποιήθηκε για αυτόν τον πληθυσμό από τον Ιανουάριο του 1992 έως το Δεκέμβριο του 2020, καθώς ακολούθησε περίοδος παρακολούθησης για όλους τους ασθενείς.

Στο πρωτόκολλο μας, πληρούνταν όλα τα κριτήρια ένταξης και κανένα από τα κριτήρια αποκλεισμού, που αναφέρονται παρακάτω:

#### Κριτήρια Ένταξης

1. Εθελοντική γραπτή συναίνεση των ασθενών >18 ετών, είτε και των γονέων για τους ασθενείς <18 ετών
2. Διάγνωση β-ΜΑ
3. Μεταγγισιοεξαρτώμενη (TDT) και μη-μεταγγισιοεξαρτώμενη (NTDT) θαλασσαιμία
4. Ασθενείς που υποβλήθηκαν σε βιοψία ήπατος έως τις 31/12/2005 για οποιαδήποτε αιτία



## Κριτήρια Αποκλεισμού

1. Ασθενείς που αρνήθηκαν να δώσουν γραπτή συναίνεση για τη διαχείριση των προσωπικών τους στοιχείων
2. Διάγνωση άλλων θαλασσαιμικών συνδρόμων
3. Ενεργός νεοπλασματική νόσος μη ηπατικής αιτιολογίας την στιγμή της βιοψίας
4. Αδυναμία ακριβούς εκτίμησης του ιστολογικού δείγματος
5. Ασθενείς με ελλιπή μακροχρόνια παρακολούθηση

## Υλικό Μελέτης

Η εκτίμηση της ηπατικής ίνωσης και σιδήρωσης έγινε σε ιστολογικά παρασκευάσματα που εκτιμήθηκαν επαρκώς από το Παθολογοανατομικό Τμήμα του Νοσοκομείου ή του Πανεπιστημίου. Επαρκής εκτίμηση θεωρείται όταν στην ιστολογική έκθεση αναφέρεται ακριβώς το στάδιο της ηπατικής ίνωσης και σιδήρωσης, αντίστοιχα. Συλλέχθηκαν κλινικοεργαστηριακά δεδομένα, που ήταν διαθέσιμα από το αρχείο του Τμήματος και αφορούσαν στις εξής παραμέτρους: ηλικία, φερριτίνη και ιστορικό λοίμωξης για τον ιό της ηπατίτιδας C. Για την εκτίμηση της ιστολογικής κατάστασης του ασθενούς, πραγματοποιήθηκε η ανίχνευση σημασμένων αντισωμάτων έναντι του ιού της ηπατίτιδας C (anti-HCV), με τη μέθοδο ELISA και η ανίχνευση HCV-RNA με την τεχνική της αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR), που αποτελεί παραλλαγή της συμβατικής μεθόδου PCR, με όριο ανίχνευσης > 100 αντίγραφα. Για την εκτίμηση της πορείας της νόσου συλλέχθηκαν στοιχεία για ηπατικά συμβάματα, που ορίστηκε ως η εμφάνιση ενός από τα κάτωθι:

- Ηπατοκυτταρικός καρκίνος
- θάνατος από ηπατικά αίτια
- κίρρωση του ήπατος κατά την τελευταία εκτίμηση. Η διάγνωση της κίρρωσης μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω αιματολογικών εξετάσεων, απεικονιστικών τεχνικών (υπερηχοτομογραφία, αξονική και μαγνητική τομογραφία ήπατος, ελαστογραφία) και βιοψίας. Στη μελέτη μας, η παρουσία κίρρωσης προσδιορίστηκε κυρίως μέσω της ελαστογραφίας ήπατος (FIBROSCAN), σε τιμές > 12,5 kPa, με ή χωρίς διαταραχές των βιοχημικών λειτουργικών δεικτών.

## *Grading Score*

Όσον αφορά στην παρατήρηση των επιχρισμάτων σε οπτικό μικροσκόπιο, η αξιολόγηση για την ίνωση κυμαινόταν από 0 – 6 και πραγματοποιήθηκε με το σύστημα σταδιοποίησης κατά Ishak (εικόνα 7). Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων, ο βαθμός της ίνωσης κατηγοριοποιήθηκε σε δύο ομάδες: βαθμός 0-2 ισοδυναμούσε με ήπια ίνωση και βαθμός 3-6 με προχωρημένη ίνωση του ήπατος.

Ishak Grade	Score
<i>Ishak Stage</i>	
No fibrosis	0
Fibrous expansion of some portal areas, with or without short fibrous septa	1
Fibrous expansion of most portal areas, with or without short fibrous septa	2
Fibrous expansion of most portal areas with occasional portal to portal bridging	3
Fibrous expansion of portal areas with marked bridging (portal to portal as well as portal to central)	4
Marked bridging (portal–portal and/or portal–central) with occasional nodules (incomplete cirrhosis)	5
Cirrhosis, probable or definite	6

Εικόνα 7. Σταδιοποίηση της ηπατικής νόσου κατά Ishak(Ishak*et al.*, 1995).

Η αξιολόγηση του βαθμού της σιδήρωσης πραγματοποιήθηκε με ένα σύστημα βαθμολόγησης που κυμαινόταν από 0 - 4 και αναφέρεται παρακάτω:

- ❖ Βαθμός 0: κόκκοι σιδήρου απουσιάζουν ή μόλις διακρίνονται σε πεδίο υψηλής ισχύος (μεγέθυνση × 400).
- ❖ Βαθμός 1: κόκκοι που επιβεβαιώνονται εύκολα σε μεγέθυνση × 400 ή μόλις διακρίνονται σε μεγέθυνση × 250
- ❖ Βαθμός 2: κόκκοι που παρατηρούνται σε μεγέθυνση × 100
- ❖ Βαθμός 3: κόκκοι που παρατηρούνται σε μεγέθυνση × 25
- ❖ Βαθμός 4: μάζες ορατές με χαμηλή ισχύ (μεγέθυνση × 10) ή με γυμνό μάτι(Limet *et al.*, 2010).

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων, η σιδήρωση κατηγοριοποιήθηκε σε δύο ομάδες: βαθμός 0-2 ισοδυναμούσε με χαμηλή ηπατική σιδήρωση και βαθμός 3-4 με αυξημένη σιδήρωση του ήπατος.

## Στατιστική Ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε RStudio. 3.6.3.

Περιγραφική ανάλυση πραγματοποιήθηκε για τον προσδιορισμό όλων των μεταβλητών, συχνότητες για τις κατηγορικές μεταβλητές και Μέση  $\pm$  Τυπ. απόκλιση ή Διάμεσος (25<sup>ο</sup> - 75<sup>ο</sup> εκατοστημόριο) για τις συνεχείς μεταβλητές που ακολουθούν ή όχι την κανονική κατανομή, αντίστοιχα.

Για τον έλεγχο της διαφοράς της φερριτίνης ανάλογα με τις κατηγορίες της σιδήρωσης, χρησιμοποιήθηκε το Mann-Whitney U τεστ. Πρόκειται για τον μη παραμετρικό έλεγχο της ισότητας δύο διαμέσων τιμών μεταξύ ανεξάρτητων μεταβλητών, εκ των οποίων μία τουλάχιστον μεταβλητή δεν ακολουθεί κανονική κατανομή.

Τα ποσοστά επιβίωσης υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Kaplan-Meier.

Ο Kaplan-Meier είναι ο ευρέως χρησιμοποιούμενος εκτιμητής της συνάρτησης επιβίωσης ανά χρονικό διάστημα που συμβαίνει τουλάχιστον ένα γεγονός. Πρέπει να σημειωθεί πως εδώ στα δεδομένα μας υπάρχουν και λογοκριμένες εγγραφές, δηλ. δεν εμφανίζουν το υπό εξέταση γεγονός. Ο μέσος χρόνος εμφάνισης του γεγονότος είναι δύσκολο να υπολογισθεί και γι' αυτό με αυτή την διαδικασία υπολογίζεται ο διάμεσος χρόνος (median) εμφάνισης του γεγονότος. Αυτό εκφράζει σε ποια χρονική στιγμή εμφάνισε το γεγονός το 50% των ασθενών (πχ αν μελετάται ο θάνατος, σε ποια χρονική στιγμή έχει πεθάνει το 50% των ασθενών, ή αν πχ μελετάται η εμφάνιση κάποιου συμβάματος, σε ποια χρονική στιγμή εμφανίζεται στο 50% των ασθενών).

Η σύγκριση καμπυλών επιβίωσης αποτελεί ένα σημαντικό μέρος της διεξαγωγής αρχικών συμπερασμάτων, καθώς δίνει μια πρώτη εικόνα της διαφοράς της επιβίωσης ή της εμφάνισης γεγονότος σε δύο ομάδες ασθενών. Στη μέθοδο αυτή, η μηδενική υπόθεση αναφέρει πως οι καμπύλες επιβίωσης είναι ίσες και στις δύο υπό μελέτη ομάδες, έναντι της εναλλακτικής υπόθεσης ότι οι δύο καμπύλες διαφέρουν. Σκοπός μας λοιπόν, είναι να απορρίψουμε τη μηδενική υπόθεση για να συμπεράνουμε πως οι δύο καμπύλες διαφέρουν.

Η δοκιμασία Cox, προκειμένου να γίνει διάκριση από το σύνολο των υπό μελέτη παραμέτρων, εκείνων που συνιστούν ανεξάρτητους προγνωστικούς παράγοντες για την εμφάνιση ηπατικής νόσου. Το μοντέλο Cox είναι ένα γραμμικό μοντέλο για το λογάριθμο του λόγου κινδύνου (HazardRatio). Το μοντέλο του Cox έχει επικρατήσει στην μέθοδο της ανάλυσης επιβίωσης καθώς:

- a) Δίνει ευέλικτη επιλογή στις ανεξάρτητες μεταβλητές
- b) «Ταιριάζει» για την περιγραφή των περισσότερων δεδομένων
- c) Ο αλγόριθμός υποστηρίζεται από τα περισσότερα στατιστικά προγράμματα

Από τα παραπάνω, λοιπόν, γίνεται αντιληπτό πως ο κίνδυνος (hazard) διαφοροποιείται σε κάθε χρονική στιγμή. Ο λόγος όμως των κινδύνων παραμένει σταθερός. Έτσι, εισάγουμε τον

λόγο των κινδύνων (HazardRatio-HR) που με την πάροδο του χρόνου παραμένει σταθερό. Χρειάζεται προσοχή, όμως, στην εφαρμογή της παραπάνω διαδικασίας, καθώς το μοντέλο υποθέτει αναλογικότητα των κινδύνων των ομάδων σύγκρισης.

Οι στατιστικοί μέθοδοι για τον έλεγχο της διαφοράς των καμπυλών επιβίωσης, ανάλογα με την αναλογικότητα των κινδύνων και το είδος της μεταβλητής. Πιο συγκεκριμένα, για τις μεταβλητές που δεν απορρίπτουν την υπόθεση της αναλογικότητας, χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο αναλογικών κινδύνων Cox με τη χρήση Likelihood ratio test (LR). Για τις μεταβλητές που απέρριπταν την αναλογικότητα των κινδύνων, χρησιμοποιήθηκε το Peto&Peto modification of Gehan's Wilcoxon test.

Η αναλογικότητα των κινδύνων ελέγχθηκε μέσω του γραφήματος του log Proportional of Hazard για τις κατηγορικές μεταβλητές και τα Schoenfeld residuals για τις ποσοτικές μεταβλητές.

Στην παρούσα μελέτη, ο εκτιμητής Kaplan-Meier χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της επιβίωσης χωρίς νοσηρότητα (DFS). Η Time-To-Event (TTE) ανάλυση πραγματοποιήθηκε από την ημερομηνία: (1) γέννησης ή (2) βιοψίας, έως την ημερομηνία κάποιου συμβάματος (κίρρωση του ήπατος, ΗΚΚ ή θάνατος από ηπατικά αίτια) ή την ημερομηνία της τελευταίας παρακολούθησης για τα περιστατικά που δεν εμφάνισαν κάποιο συμβάν.

### **3. Αποτελέσματα**

Από το σύνολο των 92 ασθενών, για τους οποίους διαθέταμε την ιστολογική αξιολόγηση των

δειγμάτων από τη βιοψία ήπατος, οι 5 ασθενείς αποκλείστηκαν από τη μελέτη, καθώς δεν πληρούσαν τα κριτήρια ένταξης και αποκλεισμού. Πιο συγκεκριμένα:

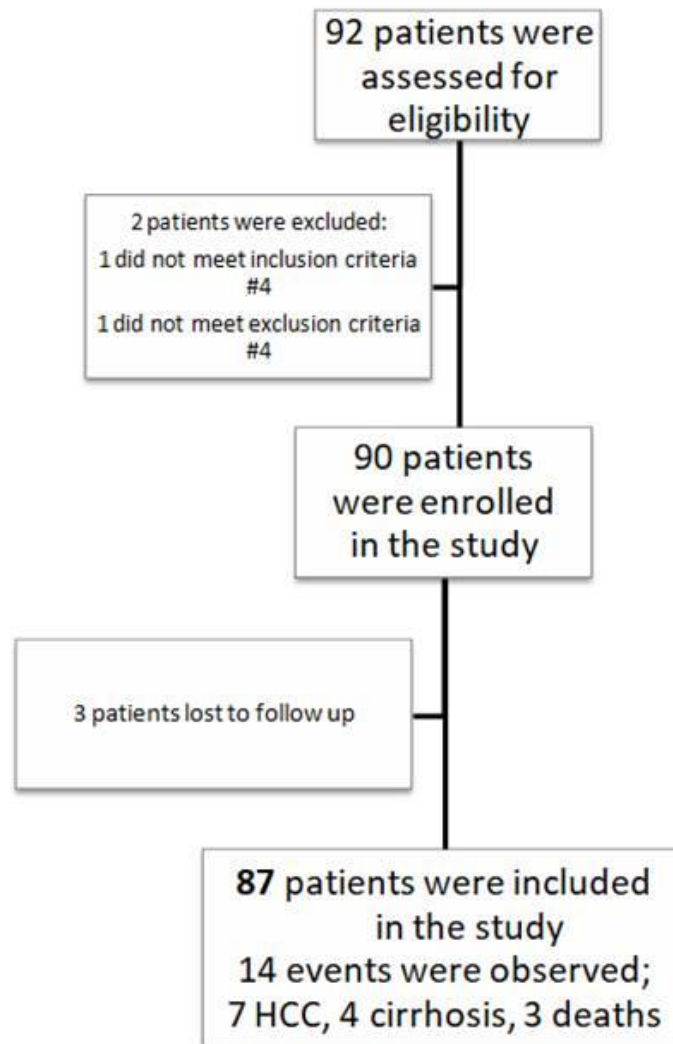
- υπήρξε αδυναμία πλήρους εκτίμησης ιστολογικού δείγματος (1 ασθενής),
- η ηπατική βιοψία δεν πραγματοποιήθηκε εντός του χρονικού διαστήματος 1992-2005 που όριζε η μελέτη μας (1 ασθενής).
- Ανεπαρκής παρακολούθηση (3 ασθενείς)

Έτσι, η τελική perprotocol ανάλυση πραγματοποιήθηκε μόνο για όσους ασθενείς συμμορφώθηκαν με το πρωτόκολλο, δηλαδή για το σύνολο των 87 ασθενών.

Κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης, παρατηρήθηκαν 14 συμβάματα:

- 7 περιπτώσεις ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (HCC),
- 4 περιπτώσεις κίρρωσης ήπατος
- 3 θάνατοι από ηπατικά αίτια.

Στο **Διάγραμμα ροής (FlowChart)** που ακολουθεί, συνοψίζονται διαγραμματικά τα παραπάνω:



- ❖ Στον πίνακα 1 παρατίθενται τα χαρακτηριστικά της κοόρτης, συμπεριλαμβανομένου του φύλου, της ηλικίας, της διάγνωσης, του ιστορικού της ηπατίτιδας C, της τιμής της φερριτίνης ορού, του σταδίου της σιδήρωσης και της ίνωσης, όπως αξιολογήθηκαν

από την ηπατική βιοψία, η εμφάνιση ή μη κάποιου ηπατικού συμβάματος και τέλος, η περίοδος παρακολούθησης των ασθενών.

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά κοόρτης

Μεταβλητές	N (%)
<b>Φύλο</b>	<b>87 (100.0)</b>
Άνδρας	54 (62.1)
Γυναίκα	33 (37.9)
<b>Διάγνωση</b>	<b>87 (100.0)</b>
TDT	79 (90.8)
NTDT	8 (9.2)
	<b>Mean±SD</b>
<b>Ηλικία</b>	21.8±6.1
<b>Ηπατίτιδα C</b>	<b>87 (100.0)</b>
Όχι	39(44.8)
Ναι	48 (55.2)
<b>Ηπατικά συμβάματα</b>	<b>87(100.0)</b>
Όχι	73(83.9)
Ναι	14(16.1)
ΗΚΚ	7(50.0)
Κίρρωση	4(28.6)
<b>Θάνατος από ηπατικά αίτια</b>	3(21.4)
	<b>Median (IQR; 25-75)</b>
<b>Περίοδος παρακολούθησης</b>	19.4 (IQR; 14.3-27.9)

Για το σύνολο των 87 ασθενών, η μέση ηλικία±τυπ.απόκλιση κατά την οποία υποβλήθηκαν σε βιοψία ήπατος ήταν 21.8 ± 6.1 χρόνια και η διάμεσος διάρκεια παρακολούθησης ήταν τα 19.4 (IQR;14.3-27.9) χρόνια.

Από το σύνολο του πληθυσμού της μελέτης, 54 (62.1%) ασθενείς ήταν άνδρες και 33(37.9%) ήταν γυναίκες.

Μεταγγισιοεξαρτώμενη β-θαλασσαιμία (Transfusion Dependent Thalassemia-TDT) είχαν 79 (90.8%) ασθενείς, ενώ οι υπόλοιποι 8 (9.2%)είχαν μη μεταγγισιοεξαρτώμενη β-θαλασσαιμία

(Non-Transfusion Dependent Thalassemia-NTDT).

Η πλειοψηφία των ασθενών (48 (55.2%)) είχε ιστορικό λοίμωξης με τον ιό της ηπατίτιδας C. Ηπατικά συμβάματα εμφανίσθηκαν σε 14 (16.1%) ασθενείς. Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ) σε 7 (50.0%) ασθενείς, κίρρωση σε 4 (28.6%) και θάνατος από ηπατικά αίτια παρατηρήθηκε σε 3 (21.4%) ασθενείς. Δύο ασθενείς απεβίωσαν λόγω ηπατικής ανεπάρκειας και ένας ασθενής, λόγω βαριάς αιμοσιδήρωσης και καρδιο-ηπατικής δυσλειτουργίας(Πίνακας 1) .

- ❖ Στη συνέχεια, παρατίθενται τα χαρακτηριστικά της κοόρτης κατά τη χρονική στιγμή της βιοψίας.

Πίνακας 2. Χαρακτηριστικά ασθενών τη χρονική στιγμή της βιοψίας

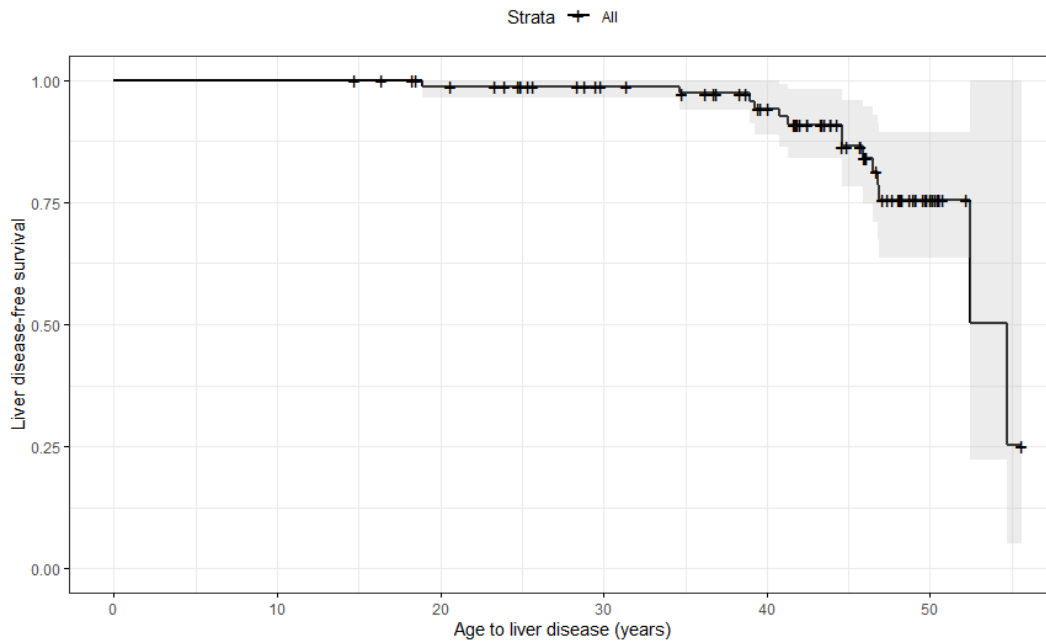
Μεταβλητές	N(%)
<b>Σιδήρωση(σταδιοποίηση 0-4)</b>	<b>87 (100.0)</b>
<b>0-2</b>	34 (39.1)
<b>3-4</b>	50 (57.5)
<b>Ελλείπουσες τιμές</b>	3 (3.4)
<b>Ίνωση(σταδιοποίηση 0-6)</b>	<b>87 (100.0)</b>
<b>0-2</b>	22 (25.3)
<b>3-6</b>	62 (71.3)
<b>Ελλείπουσες τιμές</b>	3 (3.4)
	<b>Median (IQR; 25-75)</b>
<b>Φερριτίνη (μg/L)</b>	2824 (1413.5 – 4417)

Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 2, σε 50 (57.5%) ασθενείς βρέθηκε υψηλή ηπατική σιδήρωση (βαθμός 3-4), σε αντίθεση με 34 (39.1%) ασθενείς οι οποίοι είχαν χαμηλή ηπατική σιδήρωση (βαθμός 0-2), ενώ για 3 ασθενείς δεν καταγράφηκε το αποτέλεσμα. Ακόμα, 62 (71.3%) ασθενείς είχαν προχωρημένη ίνωση (βαθμός 3-6), 22 (25.3%) ασθενείς είχαν ήπιου βαθμού ηπατική ίνωση (βαθμός 0-2), ενώ σε 3 ασθενείς δεν καταγράφηκε το αποτέλεσμα. Τέλος, η διάμεση τιμή της φερριτίνης κατά τη χρονική στιγμή της βιοψία ήταν 2824 (μg/L) (IQR; 1413.5 – 4417) (Πίνακας 2).

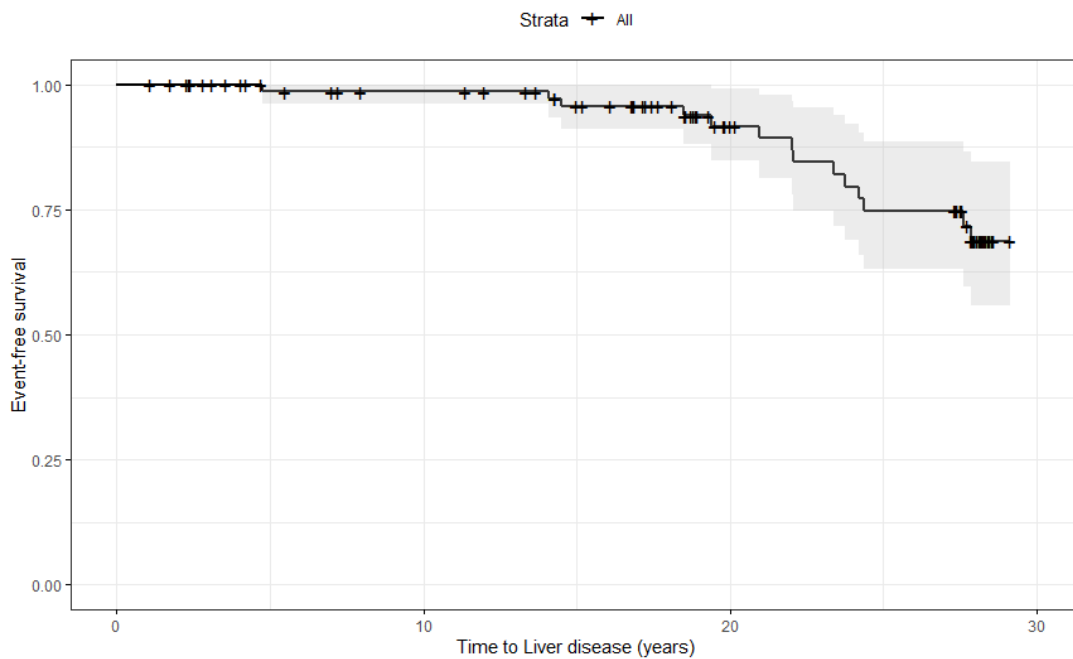
- ❖ Ακολουθούν οι καμπύλες Kaplan-Meier για την εκτίμηση της επιβίωσης χωρίς

νοσηρότητα, η οποία στη συγκεκριμένη μελέτη ορίζεται ως η παρουσία κάποιου ηπατικού συμβάματος. Ως χρονική στιγμή 0 στο γράφημα 1 θεωρήθηκε η ημερομηνία γέννησης, ενώ στο γράφημα 2 η ημερομηνία της βιοψίας.

Γράφημα 1. Kaplan - Meier εκτιμητής για την εμφάνιση του ηπατικού συμβάματος από την γέννηση



Γράφημα 2. Kaplan - Meier εκτιμητής για την εμφάνιση του ηπατικού συμβάματος από την ημερομηνία της βιοψίας



Στην ηλικία των 50 ετών η EFS ήταν 75% (Γράφημα 1), ενώ το 25% του συνόλου των ασθενών παρουσίασε ηπατική νόσο 24.4 χρόνια μετά την βιοψία (Γράφημα 2).



## Διερεύνηση των παραγόντων κινδύνου για την εμφάνιση ηπατικής νόσου

- ❖ Το μοντέλο των αναλογικών κινδύνων Cox, χρησιμοποιώντας το likelihood ratio πραγματοποιήθηκε για τη συσχέτιση της **σιδήρωσης από τη στιγμή της βιοψίας** με την εμφάνιση ηπατικής νόσου

Από τη συγκεκριμένη ανάλυση βρέθηκε πως υψηλά επίπεδα σιδήρωσης αυξάνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης ηπατικής ασθένειας, συγκριτικά με χαμηλά επίπεδα σιδήρωσης, Hazard Ratio (HR) 3.00 (95% CI: 1.01-9.00,  $p=0.05$ ). Πιο συγκεκριμένα, ο κίνδυνος εμφάνισης ηπατικής νόσου αυξάνεται κατά 3 φορές σε ασθενείς με υψηλά επίπεδα σιδήρωσης συγκριτικά με τους ασθενείς με χαμηλή ηπατική σιδήρωση.

Σταθμίζοντας ως προς την ηλικία, το adjusted Hazard Ratio (aHR) ισούται με 2.9 (95% CI: 0.8 - 9.1,  $p=0.07$ ), συμπεραίνοντας πως η συσχέτιση της σιδήρωσης με την εμφάνιση ηπατικής νόσου, γίνεται οριακά στατιστικά σημαντική στο όριο του 5%, όταν λαμβάνουμε υπόψιν την ηλικία.

- ❖ Το μοντέλο των αναλογικών κινδύνων Cox, χρησιμοποιώντας το likelihood ratio πραγματοποιήθηκε για τη συσχέτιση της **φερριτίνης από τη στιγμή της βιοψίας** με την εμφάνιση ηπατικής νόσου

Από τη συγκεκριμένη ανάλυση βρέθηκε το Hazard Ratio (HR) ισούται με 1.00 (95% CI 1.00-1.001,  $p=0.003$ ), συμπεραίνοντας πως για κάθε 1  $\mu\text{g/L}$  αύξηση της φερριτίνης ορού, ο κίνδυνος εμφάνισης ηπατικής νόσου αυξάνεται κατά 1 φορά.

Σταθμίζοντας ως προς την ηλικία, το adjusted Hazard Ratio (aHR) ισούται με 1.02 (95% CI: 1.00 - 1.03,  $p=0.03$ ). Για καλύτερη κλινική ερμηνεία του αποτελέσματος, για κάθε αύξηση κατά 50  $\mu\text{g/L}$  της φερριτίνης ορού, ο κίνδυνος εμφάνισης ηπατικής νόσου αυξάνεται κατά 1.02 (95% CI: 1.00 - 1.03,  $p=0.03$ ) φορές, σταθμίζοντας ως προς την ηλικία.

Πίνακας 3. Αποτελέσματα μονοπαραγοντικής ανάλυσης του μοντέλου κινδύνου Cox

Μεταβλητές	Hazard Ratio	95% Διάστημα Εμπιστοσύνης	p-value*
<b>Σιδήρωση (σταδιοποίηση 0-4)</b>			
0-2			
3-4	3.00	1.01 - 9.00	0.05
<b>**Φερριτίνη (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	1.00	1.00 - 1.001	0.003

\*likelihood ratio

\*\*ερμηνεία για αύξηση ανά 50 $\mu\text{g/L}$

Πίνακας 4.Αποτελέσματα πολυπαραγοντικής ανάλυσης του μοντέλου κινδύνου Cox (στάθμιση ως προς την ηλικία)

Μεταβλητές	Adjusted Hazard Ratio (aHR)	95% Διάστημα Εμπιστοσύνης	p-value
			0.0007*
<b>Σιδήρωση (σταδιοποίηση 0-4)</b>			
<b>0-2</b>			
<b>3-4</b>	2.9	0.8 - 9.1	0.07
			<0.001*
<b>**Φερριτίνη (μg/L)</b>	1.02	1.00-1.03	0.03

\*likelihood ratio

\*\*ερμηνεία για αύξηση ανά 50μg/L

- ❖ Το μοντέλο των αναλογικών κινδύνων Cox, χρησιμοποιώντας το likelihood ratio πραγματοποιήθηκε για τη συσχέτιση της **φερριτίνης από την ημερομηνία γέννησης** με την εμφάνιση ηπατικής νόσου.

Από τη συγκεκριμένη ανάλυση βρέθηκε το Hazard Ratio (HR) να ισούται με 1.00 (95% CI 1.00-1.001, p=0.07), συμπεραίνοντας πως για κάθε 1 μg/L αύξηση της φερριτίνης ορού, ο κίνδυνος εμφάνισης ηπατικής νόσου αυξάνεται κατά 1 φορά.

Σταθμίζοντας ως προς την ηλικία βιοψίας, το adjusted Hazard Ratio (aHR) ισούται με 1.02 (95% CI:1.00 - 1.05, p=0.003). Για καλύτερη κλινική ερμηνεία του αποτελέσματος, για κάθε αύξηση κατά 50 μg/L της φερριτίνης ορού, ο κίνδυνος εμφάνισης ηπατικής νόσου αυξάνεται κατά 1.02 (95% CI: 1.00 – 1.05, p=0.003) φορές, σταθμίζοντας ως προς την ηλικία βιοψίας.

- ❖ Το μοντέλο των αναλογικών κινδύνων Cox χρησιμοποιήθηκε και για τη συσχέτιση του **φύλου** με την εμφάνιση ηπατικής νόσου, με χρονική στιγμή 0 τη στιγμή της βιοψίας.

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικό εύρημα, με το Hazard Ratio (HR) να είναι 0.55 (95% CI 0.19-1.6), p=0.3. Ομοίως, σταθμίζοντας ως προς την ηλικία, το Hazard Ratio (HR) ισούται με 0.65 (95% CI 0.23-1.9), p=0.4.

- ❖ Το μοντέλο των αναλογικών κινδύνων Cox χρησιμοποιήθηκε και για τη συσχέτιση του **φύλου** με την εμφάνιση ηπατικής νόσου, με χρονική στιγμή 0 την ημερομηνία γέννησης.

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικό εύρημα, με το Hazard Ratio (HR) να είναι 0.64 (95% CI 0.22-1.86),  $p=0.4$ . Ομοίως, σταθμίζοντας ως προς την ηλικία βιοψίας, το Adjusted Hazard Ratio (aHR) ισούται με 0.56 (95% CI 0.19-1.64),  $p=0.3$ .

- ❖ Το Peto&Peto modification of Gehan's Wilcoxon test πραγματοποιήθηκε για τη συσχέτιση της **διάγνωσης**, του βαθμού της **ίνωσης** και της **ηπατίτιδας C** με την εμφάνιση της ηπατικής νόσου, με χρονική στιγμή 0 τη χρονική στιγμή της βιοψίας.

Από τη συγκεκριμένη ανάλυση, βρέθηκε μη στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ της εμφάνισης ηπατικής νόσου και της διάγνωσης, του βαθμού της ίνωσης και της Ηπατίτιδας C και,  $p=0.6$ ,  $p=0.2$  και  $p=0.3$ , αντίστοιχα.

- ❖ Το Peto&Peto modification of Gehan's Wilcoxon test πραγματοποιήθηκε για τη συσχέτιση της **διάγνωσης**, της **σιδήρωσης**, της **ίνωσης** και της **ηπατίτιδας C** με την εμφάνιση της ηπατικής νόσου, με χρονική στιγμή 0 την ημερομηνία γέννησης.

Από τη συγκεκριμένη ανάλυση, βρέθηκε μη στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ της διάγνωσης, της σιδήρωσης, της ίνωσης και της ηπατίτιδας C με την εμφάνιση της ηπατικής νόσου,  $p=0.4$ ,  $p=0.4$ ,  $p=0.3$  και  $p=0.9$ , αντίστοιχα.

- ❖ Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τόσο η σταδιοποίηση της σιδήρωσης και της ίνωσης, όπως αξιολογήθηκε από τα ιστολογικά παρασκευάσματα, όσο και τα χαρακτηριστικά των ασθενών κατά τη χρονική στιγμή της βιοψίας ανάλογα με την εμφάνιση ή μη ηπατικής νόσου.

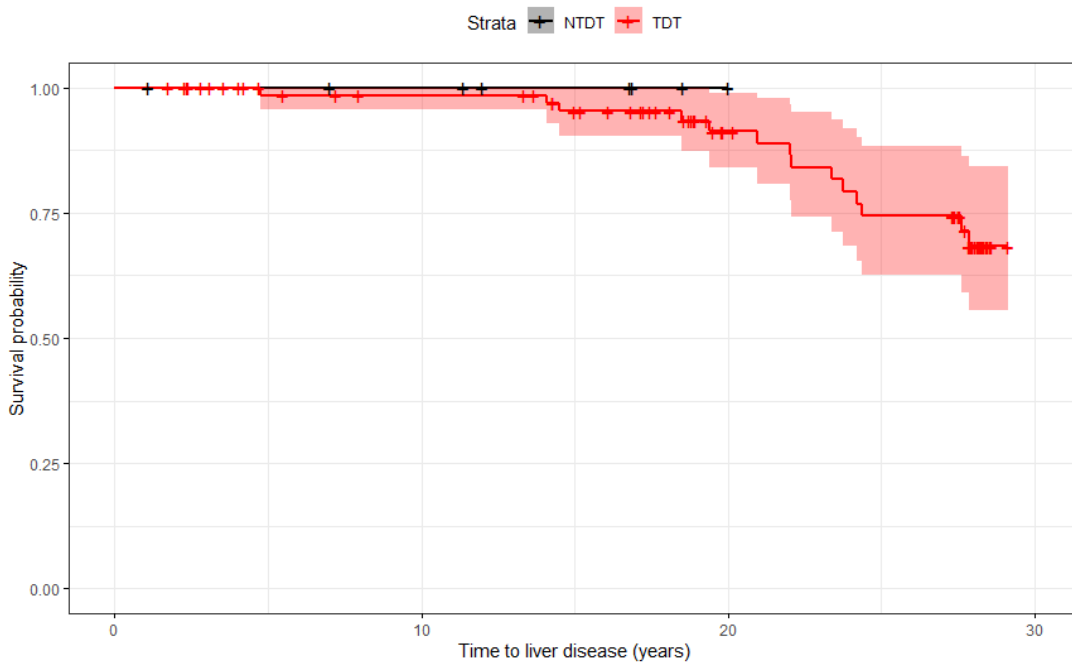
Πίνακας 3. Χαρακτηριστικά ασθενών ανάλογα με την εμφάνιση ή μη ηπατικής νόσου

Μεταβλητές	Ηπατική νόσος	
	Ναι (N (%))	Όχι (N (%))
<b>Σιδήρωση(σταδιοποίηση 0-4)</b>	<b>14 (100.0)</b>	<b>73 (100.0)</b>
<b>0-2</b>	6 (42.9)	28 (38.4)
<b>3-4</b>	8 (57.1)	42 (57.5)
<b>Ελλείπουσες τιμές</b>	0 (0.0)	3 (4.1)
<b>Ίνωση(σταδιοποίηση 0-6)</b>	<b>14 (100.0)</b>	<b>73 (100.0)</b>
<b>0-2</b>	1 (7.1)	21 (28.8)
<b>3-6</b>	13 (92.9)	47 (67.1)
<b>Ελλείπουσες τιμές</b>	0 (0.0)	3(4.1)
<b>Ηπατίτιδα C</b>	<b>14 (100.0)</b>	<b>73 (100.0)</b>
<b>Ναι</b>	11 (78.6)	37 (50.7)
<b>Όχι</b>	3 (21.4)	36 (49.3)
	<b>Median (IQR; 25-75)</b>	
<b>Φερριτίνη(μg/L)</b>	3395 (2407 – 4900)	2690 ( 1378 – 3833)

Καταγράφηκαν 14 συμβάματα κατά τη διάρκεια της μελέτης. Στο μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών αυτών, παρατηρήθηκε παρουσία λοίμωξης με τον ιό της ηπατίτιδας C, αυξημένη ηπατική σιδήρωση και προχωρημένη ίνωση. Πιο συγκεκριμένα, από το σύνολο των 14 ασθενών, οι 8 (57.1%) είχαν αυξημένη ηπατική σιδήρωση έναντι των 6 (42.9%) που είχαν χαμηλά επίπεδα σιδήρωσης και σε 13 (92.9%) ασθενείς παρατηρήθηκε προχωρημένη ίνωση, έναντι του 1 ασθενούς που είχε ήπια ίνωση. Ιστορικό λοίμωξης με τον ιό της ηπατίτιδας C παρουσίασαν 11 (78.6%) ασθενείς έναντι στους 3 (21.4%). Τέλος, στους ασθενείς με παρουσία ηπατικής νόσου, η διάμεση τιμή της φερριτίνης βρέθηκε υψηλότερη (3395), συγκριτικά με τους ασθενείς που δεν εμφάνισαν ηπατική νόσο (2690).

- ❖ Χρησιμοποιήθηκε ο εκτιμητής Kaplan-Meier για την αναπαράσταση της εμφάνισης ηπατικού συμβάματος από την ημερομηνία της βιοψίας
  - a) Ανάλογα με τη διάγνωση (ασθενείς με Transfusion-Dependent (TDT) και Non-Transfusion Dependent Thalassemia (NTDT)) (Γράφημα 3).
  - b) Ανάλογα με το φύλο (Γράφημα 4)
  - c) Ανάλογα με την παρουσία ή όχι ιστορικού λοίμωξης με τον ιό της ηπατίτιδας C (Γράφημα 5)
  - d) Ανάλογα με τη σταδιοποίηση της ηπατικής σιδήρωσης (Γράφημα 6)
  - e) Ανάλογα με τη σταδιοποίηση της ίνωσης του ήπατος (Γράφημα 7)

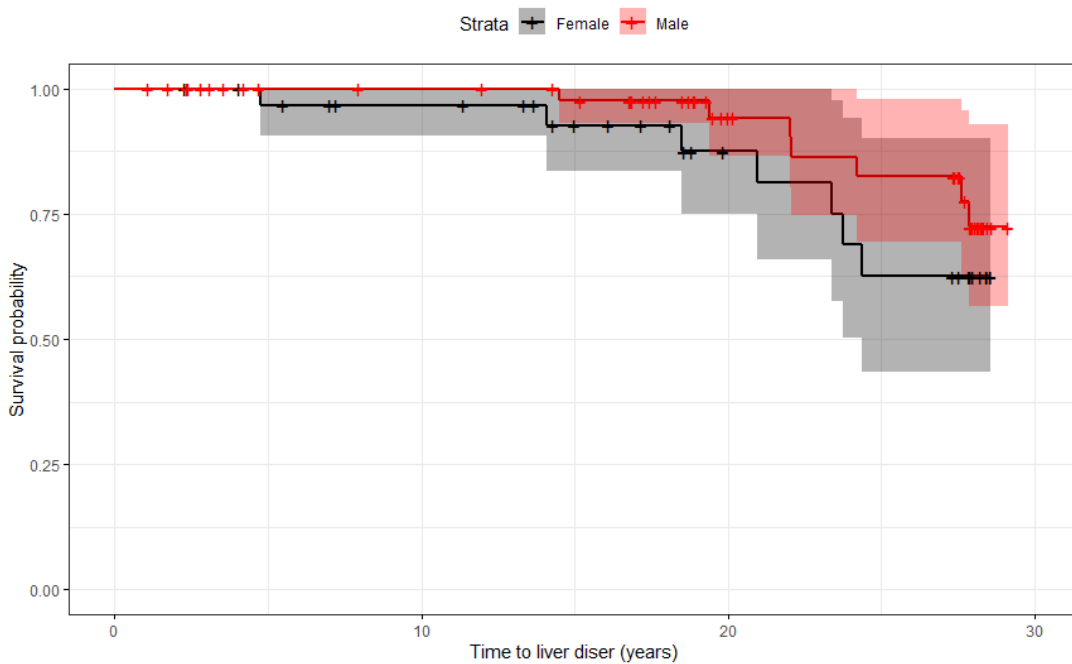
Γράφημα 3. Kaplan - Meier εκτιμητής για την εμφάνιση του ηπατικού συμβάματος από την ημερομηνία της βιοψίας σε ασθενείς μεταγγισιοεξαρτώμενη και μη μεταγγισιοεξαρτώμενη θαλασσαιμία.



Από το γράφημα, παρατηρούμε πως όλοι οι ασθενείς που εμφάνισαν ηπατική νόσο, είναι ασθενείς με μεταγγισιοεξαρτώμενη β-θαλασσαιμία, μη στατιστικά σημαντικό εύρημα στο όριο του 5%.

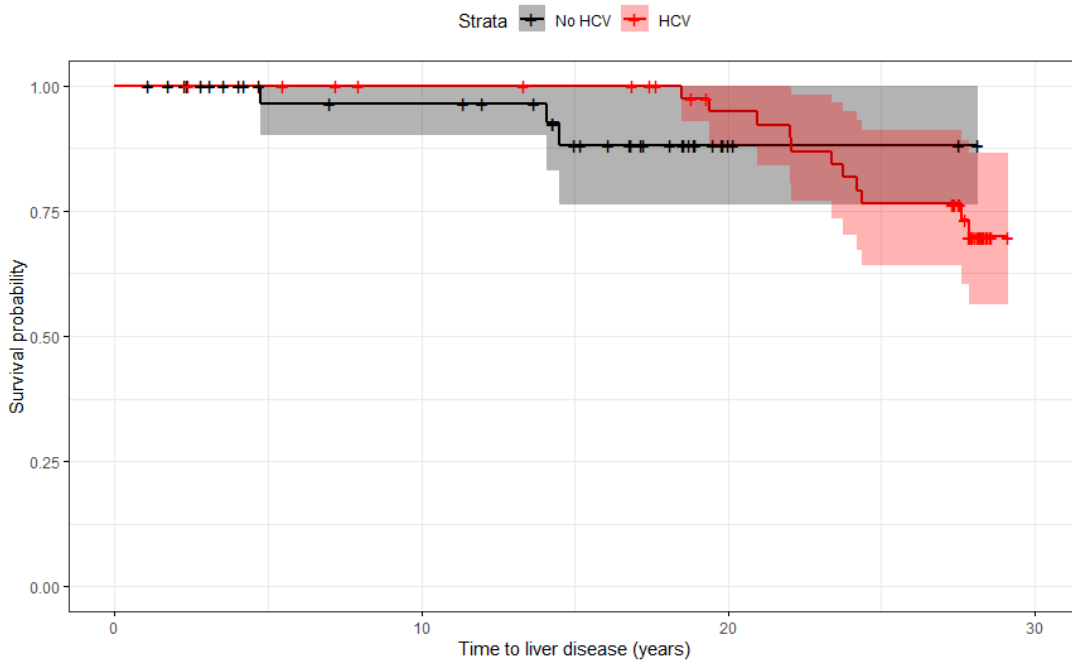
Γράφημα 4. Kaplan - Meier εκτιμητής για την εμφάνιση του ηπατικού συμβάματος από την

### ημερομηνία της βιοψίας ανά φύλο



Από την ανάλυση αυτή, παρατηρήθηκε πως οι γυναίκες εμφανίζουν νωρίτερα ηπατική νόσο συγκριτικά με τους άντρες, όμως, όπως παρατηρήθηκε από το μοντέλο του Cox, η διαφορά δεν είναι στατιστικά σημαντική στο όριο του 5%.

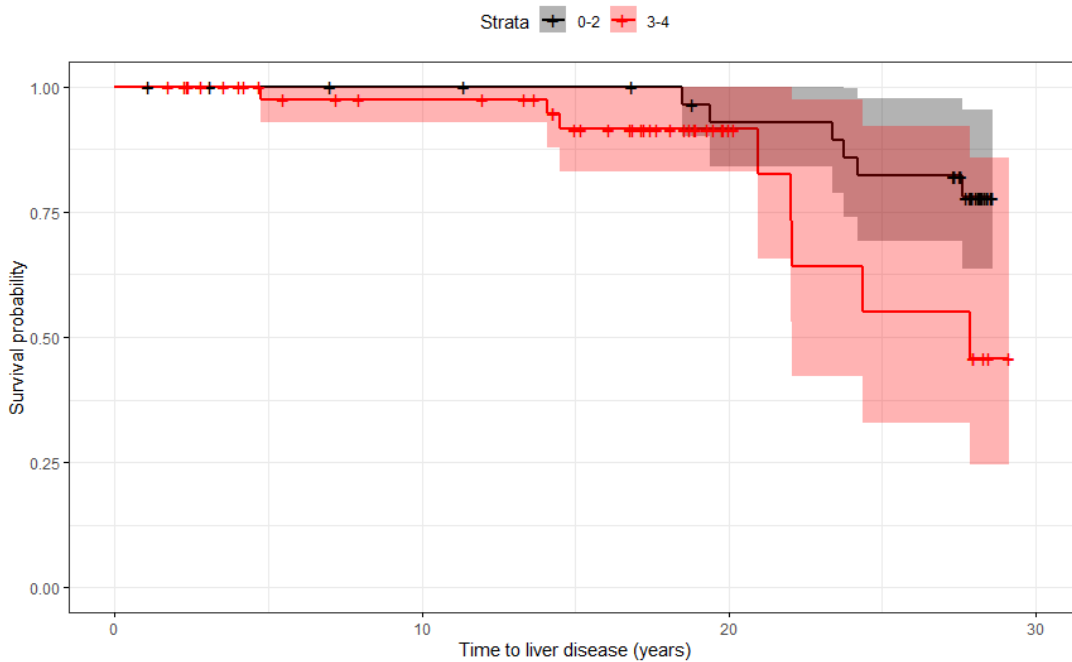
Γράφημα 5. Kaplan - Meier εκτιμητής για την εμφάνιση του ηπατικού συμβάματος από την ημερομηνία της βιοψίας ανάλογα την παρουσία ή όχι ιστορικού λοίμωξης με τον ιό της ηπατίτιδας C



Οι περισσότεροι από τους ασθενείς που εμφάνισαν ηπατική νόσο, είχαν ιστορικό λοίμωξης με τον ιό της ηπατίτιδας C, όμως, όπως παρατηρήθηκε από το Peto&Peto modification of Wilcoxon test, το εύρημα δε βρέθηκε στατιστικά σημαντικό στο όριο του 5%.

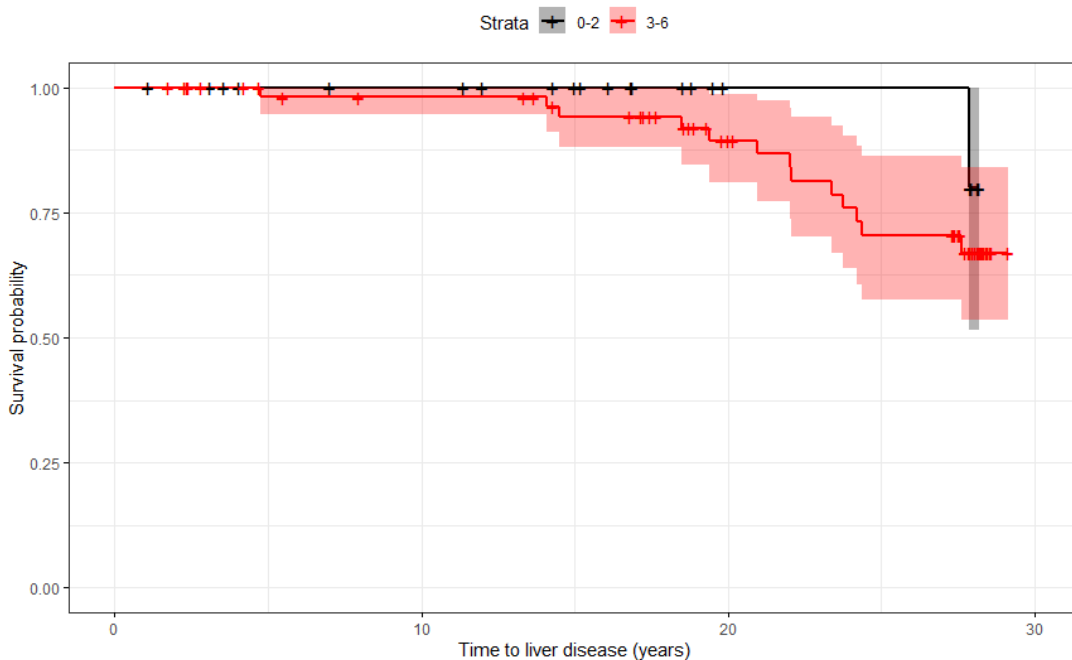
Γράφημα 6. Kaplan - Meier εκτιμητής για την εμφάνιση του ηπατικού συμβάματος από την

ημερομηνία της βιοψίας ανάλογα με το βαθμό της σιδήρωσης



Παρατηρήθηκε πως οι περισσότεροι ασθενείς που εμφάνισαν ηπατική νόσο, είχαν αυξημένα επίπεδα σιδήρωσης.

Γράφημα 7. Kaplan - Meier εκτιμητής για την εμφάνιση του ηπατικού συμβάματος από την ημερομηνία της βιοψίας ανάλογα με το βαθμό της ίνωσης



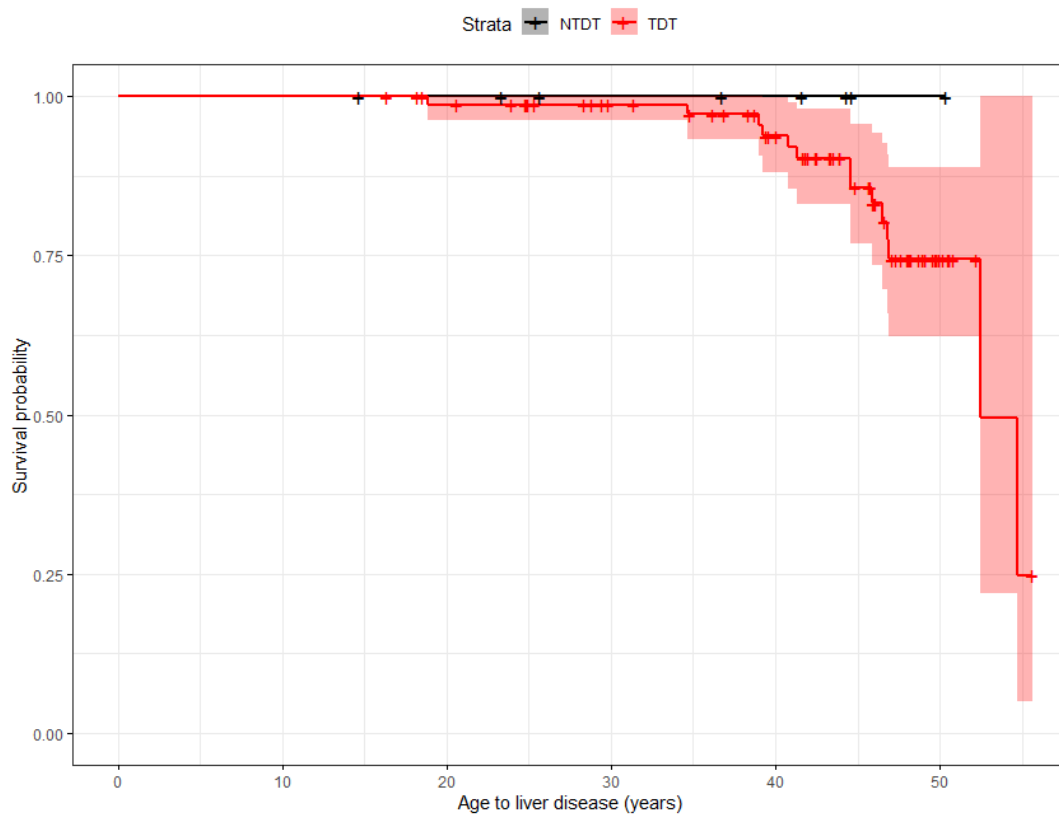
Όμοια με τη σιδήρωση, οι περισσότεροι ασθενείς που παρουσίασαν ηπατική νόσο, είχαν προχωρημένη ίνωση του ήπατος, μη στατιστικά σημαντικό εύρημα στο όριο του 5%.

❖ Χρησιμοποιήθηκε ο εκτιμητής Kaplan-Meier για την αναπαράσταση της εμφάνισης

ηπατικού συμβάματος από την ημερομηνία γέννησης

- a) Ανάλογα με τη διάγνωση (ασθενείς με Transfusion-Dependent (TDT) και Non-Transfusion Dependent Thalassemia (NTDT)) (Γράφημα 8).
- b) Ανάλογα με το φύλο (Γράφημα 9)
- c) Ανάλογα με την παρουσία ή όχι ιστορικού λοίμωξης με τον ιό της ηπατίτιδας C (Γράφημα 10)
- d) Ανάλογα με τη σταδιοποίηση της ηπατικής σιδήρωσης (Γράφημα 11)
- e) Ανάλογα με τη σταδιοποίηση της ίνωσης του ήπατος (Γράφημα 12)

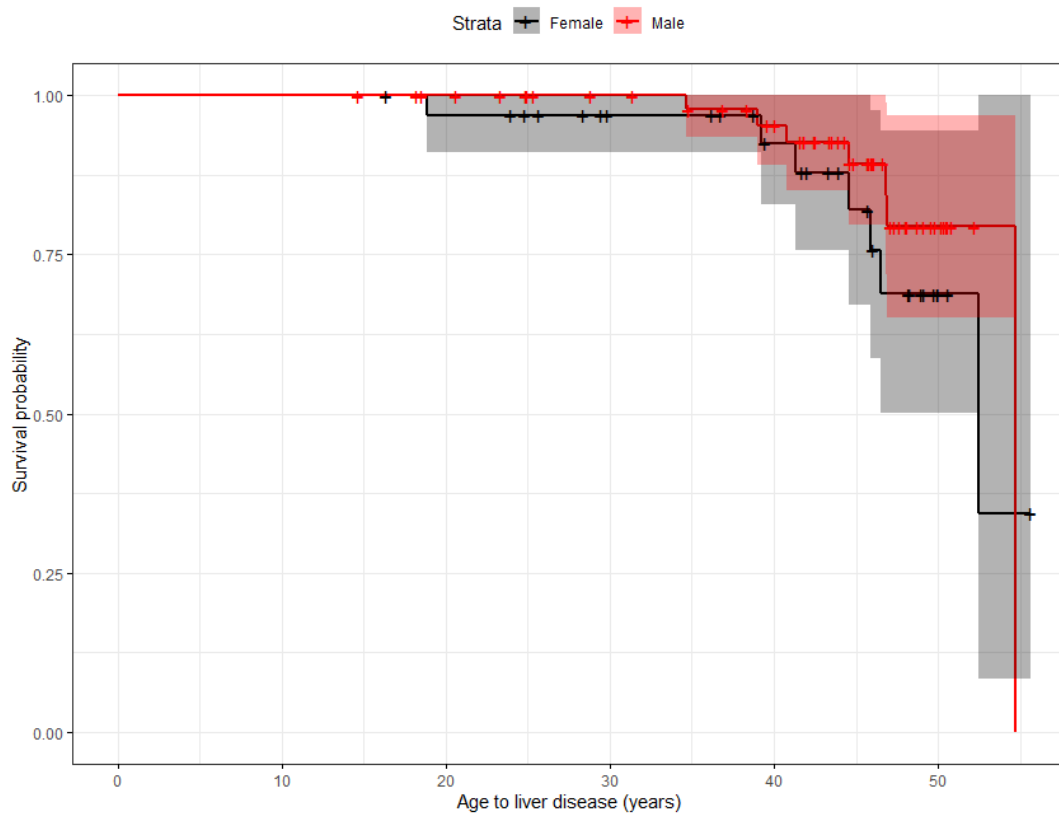
Γράφημα 8. Kaplan - Meier εκτιμητής για την εμφάνιση του ηπατικού συμβάματος από την ημερομηνία της γέννησης σε ασθενείς μεταγγισιοεξαρτώμενη και μη μεταγγισιοεξαρτώμενη θαλασσαιμία.



Από το γράφημα, παρατηρούμε πως όλοι οι ασθενείς που εμφάνισαν ηπατική νόσο, είναι ασθενείς με μεταγγισιοεξαρτώμενη β-θαλασσαιμία, μη στατιστικά σημαντικό εύρημα στο όριο του 5%.

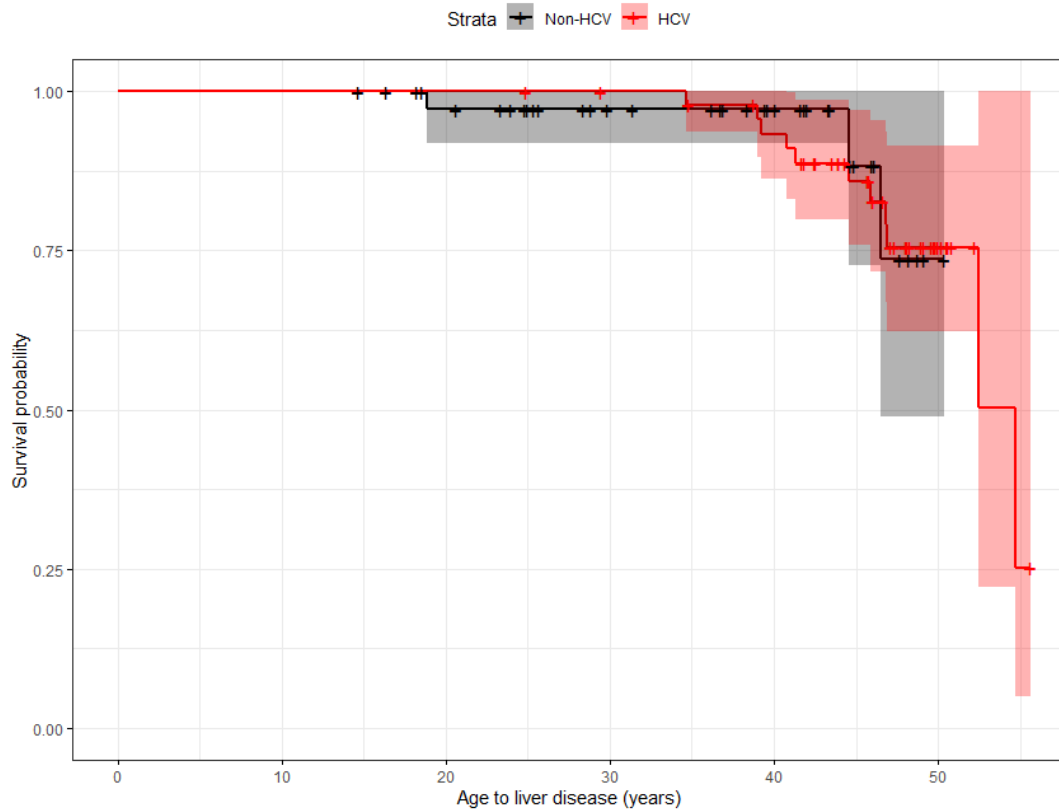


Γράφημα 9. Kaplan - Meier εκτιμητής για την εμφάνιση του ηπατικού συμβάματος από την ημερομηνία γέννησης ανά φύλο



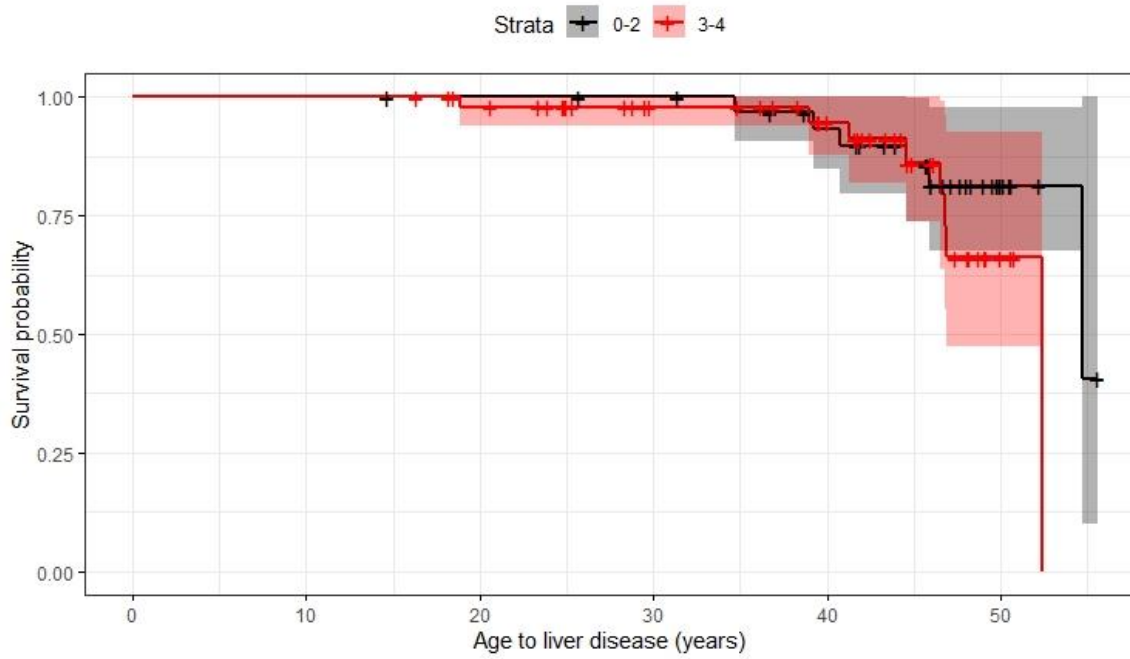
Από την ανάλυση αυτή, παρατηρήθηκε πως οι γυναίκες εμφανίζουν νωρίτερα ηπατική νόσο συγκριτικά με τους άντρες, όμως, όπως παρατηρήθηκε από το μοντέλο του Cox, η διαφορά δεν είναι στατιστικά σημαντική στο όριο του 5%.

Γράφημα 10. Kaplan - Meier εκτιμητής για την εμφάνιση του ηπατικού συμβάματος από την ημερομηνία γέννησης ανάλογα την παρουσία ή όχι ιστορικού λοίμωξης με τον ιό της ηπατίτιδας C



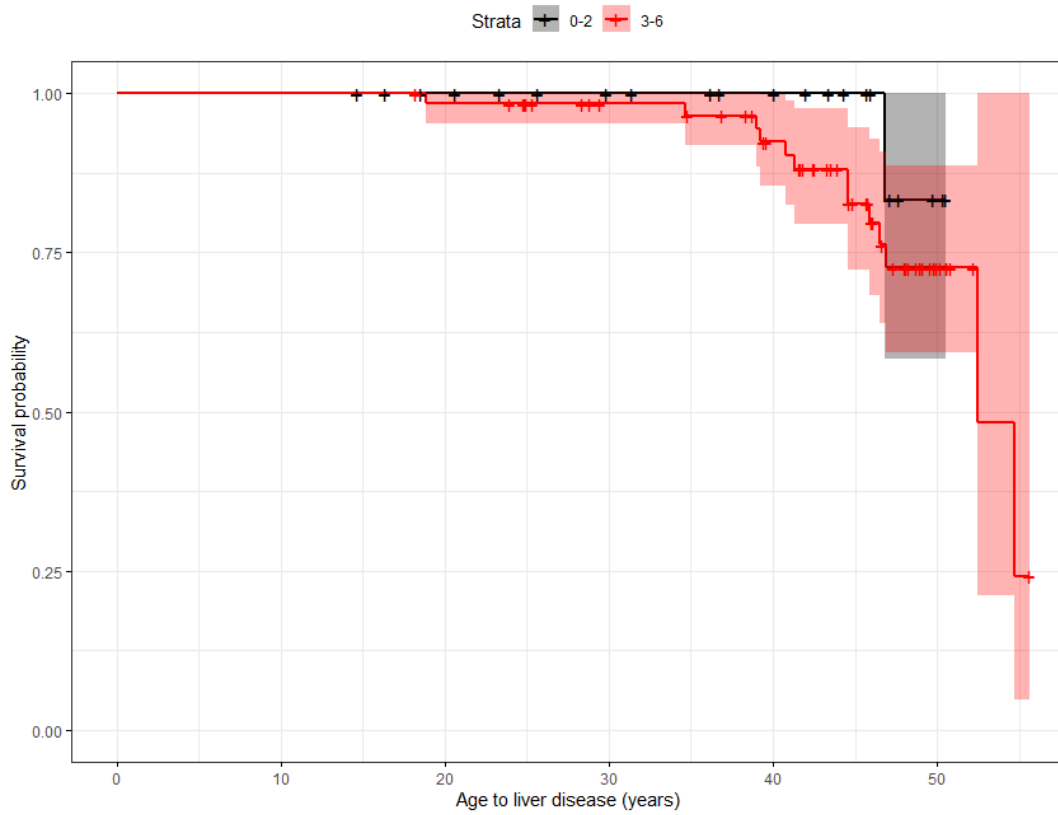
Οι περισσότεροι από τους ασθενείς που εμφάνισαν ηπατική νόσο, είχαν ιστορικό λοίμωξης με τον ιό της ηπατίτιδας C, όμως, όπως παρατηρήθηκε από το Peto&Peto modification of Wilcoxon test, το εύρημα δε βρέθηκε στατιστικά σημαντικό στο όριο του 5%.

Γράφημα 11. Kaplan - Meier εκτιμητής για την εμφάνιση του ηπατικού συμβάματος από την ημερομηνία γέννησης ανάλογα με το βαθμό της σιδήρωσης



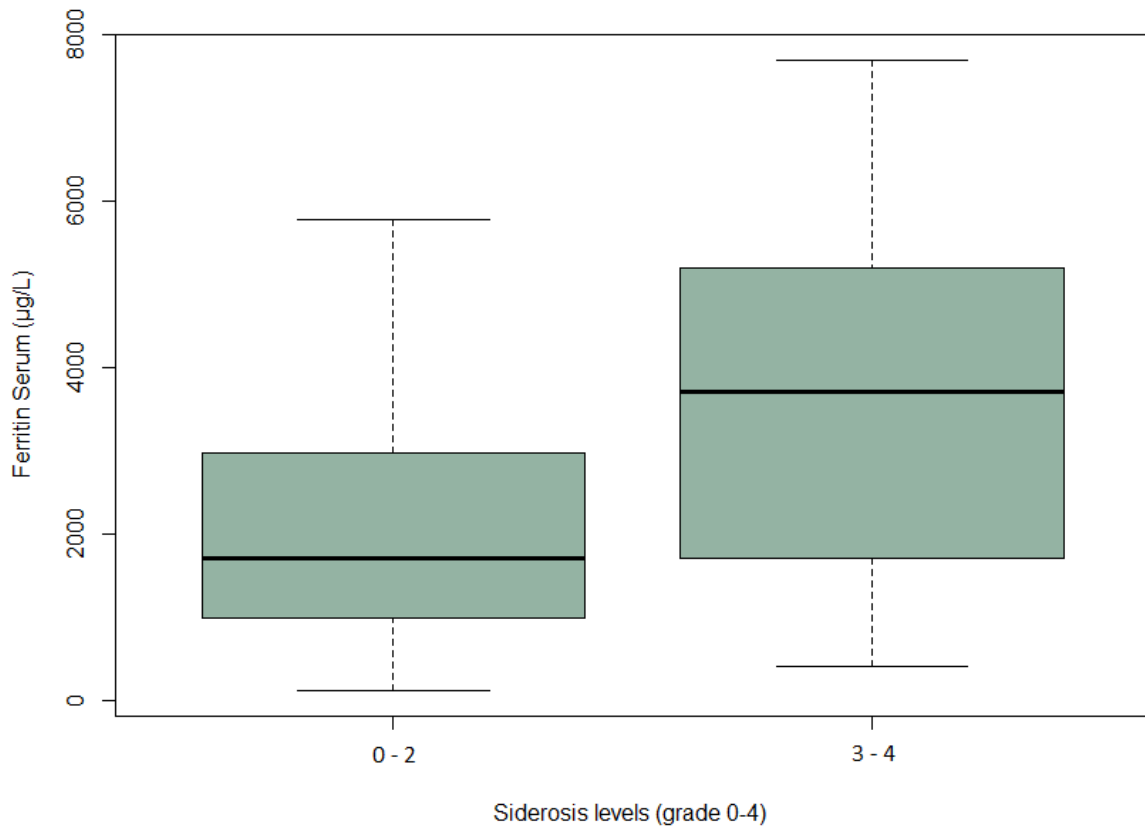
Παρατηρήθηκε πως οι περισσότεροι ασθενείς που εμφάνισαν ηπατική νόσο, είχαν αυξημένα επίπεδα σιδήρωσης, μη στατιστικά σημαντικό εύρημα στο όριο του 5%.

Γράφημα 12. Kaplan - Meier εκτιμητής για την εμφάνιση του ηπατικού συμβάματος από την ημερομηνία γέννησης ανάλογα με το βαθμό της ίνωσης



Όμοια με τη σιδήρωση, οι περισσότεροι ασθενείς που παρουσίασαν ηπατική νόσο, είχαν προχωρημένη ίνωση του ήπατος, μη στατιστικά σημαντικό εύρημα στο όριο του 5%.

- ❖ Τέλος, πραγματοποιήθηκε το Mann-Whitney U test για τον έλεγχο της συσχέτισης του φορτίου της σιδήρωσης με τη φερριτίνη (Γράφημα 13).



Από την παραπάνω ανάλυση βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επιπέδων σιδήρωσης με τη φερριτίνη κατά την βιοψία (1712 (IQR;1000-2985) vs. 3715 (IQR;1721-5197.5), ( $p=0.0003$ ).

#### 4. Συζήτηση–Συμπεράσματα

Η ηπατική νόσος εξακολουθεί να αποτελεί μία από τις συχνότερες αιτίες θανάτου των θαλασσαιμικών ασθενών. Παρά τον αποτελεσματικό προσυμπτωματικό έλεγχο (screening) για τη λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας C, αλλά και τις διαθέσιμες αποτελεσματικές θεραπείες αποσιδήρωσης, οι δύο αυτοί παράγοντες συμβάλλουν στην ανάπτυξη ηπατικής νόσου, η οποία δύνανται να εξελιχθεί σε κίρρωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Για να επιτευχθεί η μειωμένη συχνότητα εμφάνισης αυτών των επιπλοκών και να βελτιωθεί η επιβίωση των θαλασσαιμικών ασθενών, κρίνεται απαραίτητος ο αποτελεσματικός έλεγχος αυτών των παραγόντων κινδύνου και η έγκαιρη διάγνωση και διαχείρισή τους. Για τη διάγνωση και την αξιολόγηση του βαθμού της ηπατικής βλάβης, η βιοψία του ήπατος αποτελεί την πιο αξιόπιστη μέθοδο (Moukhadder *et al.*, 2017; Taher and Saliba, 2017).

Στην παρούσα μελέτη, αξιολογήθηκε η προγνωστική αξία των ιστολογικών ευρημάτων της βιοψίας ήπατος στη μακροχρόνια νοσηρότητα και θνητότητα των ασθενών με μεσογειακή αναιμία από ηπατικά αίτια.

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση επιβίωσης του πληθυσμού της μελέτης, επιβεβαίωσαν την εμφάνιση ηπατικής νόσου μετά την 4<sup>η</sup> δεκαετία της ζωής (Marsella and Ricchi, 2019). Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το φύλο, γεγονός που αντικρούει την επικρατούσα άποψη για τη μεγαλύτερη συχνότητα ανάπτυξης ηπατοκυτταρικού καρκίνου στους άντρες απ' ότι στις γυναίκες (De Sanctis *et al.*, 2020). Η ίδια μελέτη των De Sanctis *et al.* υποστηρίζει πως οι ασθενείς με μη μεταγγισιοεξαρτώμενη β-θαλασσαιμία φαίνεται να έχουν μία πιο βραδεία εξέλιξη της ηπατικής νόσου, ενώ ένας μεγάλος αριθμός μελετών, ισχυρίζεται πως ο πληθυσμός αυτός διατρέχει μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης ηπατοκυτταρικού καρκίνου. Αυτό το οφείλουν στο ενδεχόμενο να μη λαμβάνει την αντίστοιχη με τους μεταγγισιοεξαρτώμενους ασθενείς, εντατική παρακολούθηση ή/και θεραπεία χηλίωσης σιδήρου, με αποτέλεσμα ο σίδηρος που συσσωρεύεται να έχει βλαπτική δράση στα όργανα (Borgna-Pignatti *et al.*, 2004; Restivo Pantalone *et al.*, 2010). Οι παραπάνω απόψεις δε συμφωνούν με τα αποτελέσματα της παρούσας αναδρομικής μελέτης, στην οποία όλοι οι ασθενείς που εμφάνισαν ηπατική νόσο είχαν μεταγγισιοεξαρτώμενη β-θαλασσαιμία, ωστόσο, το εύρημα αυτό ίσως να οφείλεται στο μη αντιπροσωπευτικό δείγμα των μη μεταγγισιοεξαρτώμενων ασθενών στον πληθυσμό μας.

Στατιστικά σημαντική βρέθηκε η διαφορά της φερριτίνης ανά τις κατηγορίες της σιδήρωσης. Πιο συγκεκριμένα, αυξημένα επίπεδα ηπατικής σιδήρωσης σχετίστηκαν με αυξημένα επίπεδα της φερριτίνης του ορού, εύρημα που συμφωνεί με άλλες μελέτες, οι οποίες υποστηρίζουν πως η τιμή της φερριτίνης μπορεί να είναι ενδεικτική των συνολικών αποθεμάτων του οργανισμού σε σίδηρο (Taher and Saliba, 2017).

Όπως έχει αποδειχθεί σε άλλες μελέτες, έτσι και από τη δική μας ανάλυση φάνηκε η υπερφόρτωση του οργανισμού με σίδηρο να αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση ηπατικής νόσου (Sorrentino *et al.*, 2009; Kew, 2014). Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται να αυξάνεται κατά τρεις φορές ο κίνδυνος εμφάνισης ηπατικού συμβάματος σε ασθενείς με υψηλή σιδήρωση, συγκριτικά με όσους ασθενείς διατηρούσαν τα επίπεδα ηπατικού σιδήρου χαμηλά. Ακόμα, παρατηρήθηκε πως για κάθε αύξηση κατά 50  $\mu\text{g/L}$  της φερριτίνης ορού, ο κίνδυνος εμφάνισης ηπατικής νόσου αυξάνεται κατά 1.02 φορές, λαμβάνοντας υπόψιν την ηλικία, υποδηλώνοντας πως υπάρχει σημαντική ανάλογη σχέση με την αυξημένη τιμή της φερριτίνης του ορού και την πιθανότητα εμφάνισης ηπατικής νόσου. Επιπροσθέτως, όπως υποστηρίζεται και από τον Moukhadder *et al.*, τακτική αξιολόγηση για την εξέλιξη της ηπατικής νόσου, κρίνεται αναγκαία και στους ασθενείς με υψηλά επίπεδα σιδήρου, χωρίς γνωστή χρόνια ιογενή ηπατίτιδα, και ως εκ τούτου υποδηλώνει έντονα το ρόλο της υπερφόρτωσης σιδήρου σε αυτούς τους ασθενείς ως ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εξέλιξη της ηπατικής νόσου σε κίρρωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (Moukhadder *et al.*, 2018).

Μη στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα παρατηρήθηκε για τη συσχέτιση του βαθμού ηπατικής ίνωσης και την ανάπτυξη ηπατικού συμβάματος, κάτι το οποίο έρχεται σε αντιπαράθεση με άλλες μελέτες που υποστηρίζουν πως προχωρημένη ίνωση του ήπατος αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εξέλιξη της ηπατικής νόσου (Zampino *et al.*, 2015). Όμοια με το βαθμό της ηπατικής ίνωσης, ούτε η ύπαρξη ιστορικού λοίμωξης με τον ιό της ηπατίτιδας C ανέδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την εμφάνιση ηπατικής νόσου, γεγονός που δε συμφωνεί με τη βιβλιογραφία, η οποία υποστηρίζει πως η λοίμωξη με τον ιό της ηπατίτιδας C, παρουσία ή απουσία κίρρωσης, αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκίνου (Baumert *et al.*, 2017; Axley *et al.*, 2018; Ioannou *et al.*, 2019). Ωστόσο, παρά τα αποτελέσματα που έδωσε η μεμονωμένη συσχέτιση της λοίμωξης με τον ιό της ηπατίτιδας C με την ανάπτυξη ηπατικής νόσου, από τις καμπύλες επιβίωσης παρατηρήθηκε πως οι περισσότεροι ασθενείς που παρουσίασαν ηπατική νόσο, είχαν προχωρημένη ίνωση του ήπατος και ιστορικό λοίμωξης με τον ιό της ηπατίτιδας C.

Συμπερασματικά, λοιπόν, με βάση τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης αναδρομικής μελέτης, βασικό παράγοντα κινδύνου για το βαθμό της ηπατικής βλάβης και την εξέλιξη της ηπατικής νόσου, αποτελεί η υπερφόρτωση του οργανισμού με σίδηρο. Μεμονωμένα, η λοίμωξη με τον ιό της ηπατίτιδας C δεν φαίνεται να διαδραματίζει τον πρωτεύοντα ρόλο, ωστόσο φαίνεται να αποτελεί επιβαρυντικό παράγοντα σε συνδυασμό με την προχωρημένη ίνωση και την αυξημένη σιδήρωση των ασθενών, παρουσία ηπατικής νόσου. Από την άλλη, ο βαθμός ηπατικής ίνωσης σε νεαρή ηλικία δε φαίνεται να σχετίζεται με μεταγενέστερη εμφάνιση ηπατικής νόσου, φαινόμενο, που ενδεχομένως να οφείλεται σε σταθεροποίηση ή/και αναστροφή της ίνωσης που επιτυγχάνεται με τις τρέχουσες θεραπείες χηλίωσης σιδήρου.

Κάποια από τα ευρήματα αυτής της μελέτης δε συμφωνούν με τα μέχρι σήμερα βιβλιογραφικά δεδομένα, γεγονός που εξηγείται ενδεχομένως, από: 1) το μη αντιπροσωπευτικό δείγμα, δεδομένου ότι ο αριθμός των περιπτώσεων είναι περιορισμένος και 2) τα χαρακτηριστικά του πληθυσμού, και κυρίως η νεαρή ηλικία τη στιγμή της βιοψίας.

Θα πρέπει, όμως, να τονιστεί και η αξία της συγκεκριμένης μελέτης, καθώς υπήρξε ένα μεγάλο διάστημα παρακολούθησης γύρω στα 15 έτη, για όλους τους ασθενείς.

Αν και σε κάποιες μελέτες επιβεβαιώνεται η προγνωστική αξία της ηπατικής βιοψίας, σε κάποιες άλλες αμφισβητείται, με αποτέλεσμα να κρίνεται αναγκαία η περαιτέρω έρευνα(Castéra*et al.*, 2005; Tannapfel, DienesandLohse, 2012). Η βιοψία του ήπατος, αν και αδιαμφισβήτητα αποτελεί την πιο αξιόπιστη μέθοδο εκτίμησης της ηπατικής βλάβης, στη θαλασσαιμία τείνει να αντικατασταθεί από άλλες, μη επεμβατικές μεθόδους, όπως μαγνητική τομογραφία ήπατος, βιοδείκτες, κλπ(Halfon*et al.*, 2005; Mangia*et al.*, 2020). Η μελέτη μας υποστηρίζει αυτή τη θεραπευτική πρακτική και επιπλέον υπογραμμίζει το ρόλο της συνεπούς και συστηματικής αποσιδήρωσης στην πρόληψη ηπατικών συμβαμάτων.



## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Arumugam, P. and Malik, P. (2010) 'Genetic therapy for beta-thalassemia: from the bench to the bedside.', *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 2010, pp. 445–450. doi: 10.1182/asheducation-2010.1.445.
- Axley, P. *et al.* (2018) 'Hepatitis C virus and hepatocellular carcinoma: A narrative review', *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, 6(1), pp. 79–84. doi: 10.14218/JCTH.2017.00067.
- Aydinok, Y. *et al.* (2015) 'Prevalence and distribution of iron overload in patients with transfusion-dependent anemias differs across geographic regions: Results from the CORDELIA study', *European Journal of Haematology*, 95(3), pp. 244–253. doi: 10.1111/ejh.12487.
- Baumert, T. F. *et al.* (2017) 'Hepatitis C-related hepatocellular carcinoma in the era of new generation antivirals', *BMC Medicine*, 15(1), pp. 1–10. doi: 10.1186/s12916-017-0815-7.
- Bernini, L.F. and C.L. Hartevelt (1998) 'Alpha-thalassaemia' *Baillieres Clin Haematol*, 11(1), pp.53-90.
- Bhattacharya, N. (2017) 'Detection Of Abnormal Haemoglobin Variants By HPLC Method', 4(4).
- Borgna-Pignatti, C. *et al.* (2004) 'Hepatocellular carcinoma in the thalassaemia syndromes', *British Journal of Haematology*, 124(1), pp. 114–117. doi: 10.1046/j.1365-2141.2003.04732.x.
- Borgna-Pignatti, C. *et al.* (2014) 'Hepatocellular carcinoma in thalassaemia: An update of the Italian Registry', *British Journal of Haematology*, 167(1), pp. 121–126. doi: 10.1111/bjh.13009.
- Borgna-Pignatti, C. and Gamberini, M. R. (2011) 'Complications of thalassemia major and their treatment', *Expert Review of Hematology*, 4(3), pp. 353–366. doi: 10.1586/ehm.11.29.
- Busca, A. *et al.* (2010) 'Iron Overload in Patients Receiving Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Quantification of Iron Burden by a Superconducting Quantum Interference Device (SQUID) and Therapeutic Effectiveness of Phlebotomy', *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 16(1), pp. 115–122. doi: 10.1016/j.bbmt.2009.09.011.
- Cappellini, M. D. *et al.* (2005) 'Coagulation and splenectomy: An overview', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1054, pp. 317–324. doi: 10.1196/annals.1345.039.

- Cappellini, M. D. *et al.* (2020) ‘A Phase 3 Trial of Luspatercept in Patients with Transfusion-Dependent  $\beta$ -Thalassemia’, *New England Journal of Medicine*, 382(13), pp. 1219–1231. doi: 10.1056/nejmoa1910182.
- Castéra, L. *et al.* (2005) ‘Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C’, *Gastroenterology*, 128(2), pp. 343–350. doi: 10.1053/j.gastro.2004.11.018.
- Chen, S. L. and Morgan, T. R. (2006) ‘The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection’, *International Journal of Medical Sciences*, 3(2), pp. 47–52. doi: 10.7150/ijms.3.47.
- Cohen, A. R. (2006) ‘New advances in iron chelation therapy.’, *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, pp. 42–47. doi: 10.1182/asheducation-2006.1.42.
- Colli, A. *et al.* (2019) ‘Abdominal ultrasound and alpha-fetoprotein for the diagnosis of hepatocellular carcinoma’, *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2019(6). doi: 10.1002/14651858.CD013346.
- Daniele Prati, Marco Maggioni, Silvano Milani, Mario Cerino, Paolo Cianciulli, Guido Coggi, Gian Luca Forni, Carmelo Magnano, Anna Meo, Roberto Gramignoli, Paolo Rebutta, Gemino Fiorelli, Maria Domenica Cappellini, CooleyCare Cooperative Group (2004) ‘Clinical and histological characterization of liver disease in patients with transfusion-dependent beta-thalassemia. A multicenter study of 117 cases’ *Haematologica*, 89(10), pp.1179-86.
- Degos, F. *et al.* (2000) ‘Hepatitis C virus related cirrhosis: Time to occurrence of hepatocellular carcinoma and death’, *Gut*, 47(1), pp. 131–136. doi: 10.1136/gut.47.1.131.
- Dussiot, M. *et al.* (2014) ‘An activin receptor IIA ligand trap corrects ineffective erythropoiesis in  $\beta$ -thalassemia’, *Nature Medicine*, 20(4), pp. 398–407. doi: 10.1038/nm.3468.
- El-Serag, H. B. *et al.* (2002) ‘Extrahepatic manifestations of hepatitis C among United States male veterans’, *Hepatology*, 36(6), pp. 1439–1445. doi: 10.1053/jhep.2002.37191.
- Enomoto, M. *et al.* (2004) ‘Effects of ribavirin combined with interferon- $\alpha$ 2b on viral kinetics during first 12 weeks of treatment in patients with hepatitis C virus genotype 1 and high baseline viral loads’, *Journal of Viral Hepatitis*, 11(5), pp. 448–454. doi: 10.1111/j.1365-2893.2004.00524.x.
- Ferenci, P. *et al.* (2014) ‘ABT-450/r–Ombitasvir and Dasabuvir with or without Ribavirin for

HCV', *New England Journal of Medicine*, 370(21), pp. 1983–1992. doi: 10.1056/nejmoa1402338.

Fibach, E. and Rachmilewitz, E. A. (2017) 'Pathophysiology and treatment of patients with beta-thalassemia - an update', *F1000Research*, 6. doi: 10.12688/f1000research.12688.1.

Fusco, D. N. and Chung, R. T. (2012) 'Novel therapies for hepatitis C: Insights from the structure of the virus', *Annual Review of Medicine*, 63, pp. 373–387. doi: 10.1146/annurev-med-042010-085715.

Gardenghi, S. *et al.* (2007) 'Ineffective erythropoiesis in  $\beta$ -thalassemia is characterized by increased iron absorption mediated by down-regulation of hepcidin and up-regulation of ferroportin', *Blood*, 109(11), pp. 5027–5035. doi: 10.1182/blood-2006-09-048868.

Gardenghi, S. *et al.* (2010) 'Hepcidin as a therapeutic tool to limit iron overload and improve anemia in  $\beta$ -thalassemic mice', *Journal of Clinical Investigation*, 120(12), pp. 4466–4477. doi: 10.1172/JCI41717.

Ghany, M. G. *et al.* (2009) 'Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: An update', *Hepatology*, 49(4), pp. 1335–1374. doi: 10.1002/hep.22759.

Guicciardi, M. E. *et al.* (2013) 'Apoptosis and necrosis in the liver', *Comprehensive Physiology*, 3(2), pp. 977–1010. doi: 10.1002/cphy.c120020.

Gutierrez, J. A., Lawitz, E. J. and Poordad, F. (2015) 'Interferon-free, direct-acting antiviral therapy for chronic hepatitis C', *Journal of Viral Hepatitis*, 22(11), pp. 861–870. doi: 10.1111/jvh.12422.

Halfon, P. *et al.* (2005) 'Accuracy of hyaluronic acid level for predicting liver fibrosis stages in patients with hepatitis C virus', *Comparative Hepatology*, 4, pp. 1–7. doi: 10.1186/1476-5926-4-6.

Hershko, C. *et al.* (1978) 'Non-Specific Serum Iron in Thalassaemia: an Abnormal Serum Iron Fraction of Potential Toxicity', *British Journal of Haematology*, 40(2), pp. 255–263. doi: 10.1111/j.1365-2141.1978.tb03662.x.

Higgs, D. R., Engel, J. D. and Stamatoyannopoulos, G. (2012) 'Thalassaemia', *The Lancet*, 379(9813), pp. 373–383. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60283-3.

Hileman, E. O. *et al.* (2004) 'Intrinsic oxidative stress in cancer cells: A biochemical basis for therapeutic selectivity', *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 53(3), pp. 209–219. doi: 10.1007/s00280-003-0726-5.

Hu, K. Q. and Tong, M. J. (1999) 'The long-term outcomes of patients with compensated hepatitis C virus- related cirrhosis and history of parenteral exposure in the United States',

*Hepatology*, 29(4), pp. 1311–1316. doi: 10.1002/hep.510290424.

Ioannou, G. N. *et al.* (2019) ‘Increased Risk for Hepatocellular Carcinoma Persists Up to 10 Years After HCV Eradication in Patients With Baseline Cirrhosis or High FIB-4 Scores’, *Gastroenterology*, 157(5), pp. 1264-1278.e4. doi: 10.1053/j.gastro.2019.07.033.

Ishak, K. *et al.* (1995) ‘Histological grading and staging of chronic hepatitis’, *Journal of Hepatology*, 22(6), pp. 696–699. doi: 10.1016/0168-8278(95)80226-6.

Jacobson, I. M. *et al.* (2011) ‘Telaprevir for Previously Untreated Chronic Hepatitis C Virus Infection’, *New England Journal of Medicine*, 364(25), pp. 2405–2416. doi: 10.1056/nejmoa1012912.

Kew, M. C. (2014) ‘Hepatic iron overload and hepatocellular carcinoma’, *Liver Cancer*, 3(1), pp. 31–40. doi: 10.1159/000343856.

Kowdley, K. V. *et al.* (2013) ‘Sofosbuvir with pegylated interferon alfa-2a and ribavirin for treatment-naive patients with hepatitis C genotype-1 infection (ATOMIC): An open-label, randomised, multicentre phase 2 trial’, *The Lancet*, 381(9883), pp. 2100–2107. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60247-0.

Krinsky, G. A. *et al.* (2001) ‘Hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules in patients with cirrhosis: Prospective diagnosis with MR imaging and explantation correlation’, *Radiology*, 219(2), pp. 445–454. doi: 10.1148/radiology.219.2.r01ma40445.

Ladis, V. *et al.* (2005) ‘Longitudinal study of survival and causes of death in patients with thalassemia major in Greece’, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1054, pp. 445–450. doi: 10.1196/annals.1345.067.

Ladis, V. *et al.* (2011) ‘Survival in a large cohort of Greek patients with transfusion-dependent beta thalassaemia and mortality ratios compared to the general population’, *European Journal of Haematology*, 86(4), pp. 332–338. doi: 10.1111/j.1600-0609.2011.01582.x.

Lawitz, E. *et al.* (2014) ‘Sofosbuvir and ledipasvir fixed-dose combination with and without ribavirin in treatment-naive and previously treated patients with genotype 1 hepatitis C virus infection (LONESTAR): An open-label, randomised, phase 2 trial’, *The Lancet*, 383(9916), pp. 515–523. doi: 10.1016/S0140-6736(13)62121-2.

Leroy, V. (2008) ‘Other non-invasive markers of liver fibrosis’, *Gastroenterologie Clinique et Biologique*, 32(6 SUPPL. 1), pp. 52–57. doi: 10.1016/S0399-8320(08)73993-9.

Li, Q., *et al.*, (2002) ‘Locus control regions’ *Blood*, 100(9), pp.3077-86.

Lim, R. P. *et al.* (2010) ‘Quantification of hepatic iron deposition in patients with liver

disease: Comparison of chemical shift imaging with single-echo T2\*-weighted imaging', *American Journal of Roentgenology*, 194(5), pp. 1288–1295. doi: 10.2214/AJR.09.3036.

Liu, C. H. *et al.* (2020) 'Sofosbuvir/velpatasvir/voxilaprevir plus ribavirin for chronic hepatitis C patients with direct acting antiviral failures: Implications for viral elimination in Taiwan', *Journal of the Formosan Medical Association*, 119(12), pp. 1871–1875. doi: 10.1016/j.jfma.2020.06.013.

Lucarelli, G. *et al.* (2012) 'Hematopoietic stem cell transplantation in thalassemia and sickle cell anemia', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(5). doi: 10.1101/cshperspect.a011825.

Manghisi, G. *et al.* (1998) 'A new prognostic system for hepatocellular carcinoma: A retrospective study of 435 patients', *Hepatology*, 28(3), pp. 751–755. doi: 10.1002/hep.510280322.

Mangia, A. *et al.* (2020) 'Hepatocellular carcinoma in adult thalassemia patients: An expert opinion based on current evidence', *BMC Gastroenterology*, 20(1), pp. 1–14. doi: 10.1186/s12876-020-01391-z.

Maria-Domenica Cappellini, Alan Cohen, Androulla Eleftheriou, Antonio Piga, John Porter, Ali Taher (2008) 'Guidelines for the Clinical Management of Thalassaemia'. Maria Domenica Cappellini, Alan Cohen, John Porter, Ali Taher, and Vip Viprakasit (2014) 'Guidelines for the Management of Transfusion Dependent Thalassaemia (TDT), 3rd edition'.

Maria Sposi, N. (2020) 'Oxidative Stress and Iron Overload in  $\beta$ -Thalassemia: An Overview', *Beta Thalassemia*. doi: 10.5772/intechopen.90492.

Marsella, M. and Ricchi, P. (2019) 'Thalassemia and hepatocellular carcinoma: Links and risks', *Journal of Blood Medicine*, 10, pp. 323–334. doi: 10.2147/JBM.S186362.

McGann, P. T., Nero, A. C. and Ware, R. E. (2017) 'Clinical features of  $\beta$ -thalassemia and sickle cell disease', *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1013, pp. 1–26. doi: 10.1007/978-1-4939-7299-9\_1.

Mehta, P. R. *et al.* (2015) 'Diverse phenotypes and transfusion requirements due to interaction of  $\beta$ -thalassemias with triplicated  $\alpha$ -globin genes', *Annals of Hematology*, 94(12), pp. 1953–1958. doi: 10.1007/s00277-015-2479-8.

Mettananda, S. *et al.* (2017) 'Editing an  $\alpha$ -globin enhancer in primary human hematopoietic stem cells as a treatment for  $\beta$ -Thalassemia', *Nature Communications*, 8(1). doi:

10.1038/s41467-017-00479-7.

Modell, B. (1977) 'Total management of thalassaemia major', *Archives of Disease in Childhood*, 52(6), pp. 489–500. doi: 10.1136/adc.52.6.489.

Modell, B. and Darlison, M. (2008) 'Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators', *Bulletin of the World Health Organization*, 86(6), pp. 480–487. doi: 10.2471/BLT.06.036673.

Moukhadder, H. M. *et al.* (2017) 'Hepatocellular carcinoma as an emerging morbidity in the thalassemia syndromes: A comprehensive review', *Cancer*, 123(5), pp. 751–758. doi: 10.1002/cncr.30462.

Moukhadder, H. M. *et al.* (2018) 'Hepatocellular Carcinoma in a  $\beta$ -Thalassemia Intermedia Patient: Yet Another Case in the Expanding Epidemic', *Hemoglobin*, 42(1), pp. 58–60. doi: 10.1080/03630269.2018.1434197.

Musallam, K. M. *et al.* (2013) 'Non-transfusion-dependent thalassemias', *Haematologica*, 98(6), pp. 833–844. doi: 10.3324/haematol.2012.066845.

Neufeld, E. F. *et al.* (1972) 'Gene therapy for human genetic disease?', *Science*, 178(4061), pp. 648–649. doi: 10.1126/science.178.4061.648.

Nicole Jacobi, Lena Herich (2016) 'Measurement of liver iron concentration by superconducting quantum interference device biomagnetic liver susceptometry validates serum ferritin as prognostic parameter for allogeneic stem cell transplantation' *Eur J Haematol*, 97(4), pp. 36-41, doi: 10.1111/ejh.12734.

Nienhuis, A. W. and Nathan, D. G. (2012) 'Pathophysiology and Clinical Manifestations of the  $\beta$ -Thalassemias', pp. 1–13.

Parfieniuk, A., Jaroszewicz, J. and Flisiak, R. (2007) 'Specifically targeted antiviral therapy for hepatitis C virus', *World Journal of Gastroenterology*, 13(43), pp. 5673–5681. doi: 10.3748/wjg.v13.i43.5673.

Pietrangelo, A. (2009) 'Iron in NASH, chronic liver diseases and HCC: How much iron is too much?', *Journal of Hepatology*, 50(2), pp. 249–251. doi: 10.1016/j.jhep.2008.11.011.

Pinzani, M., Romanelli, R. G. and Magli, S. (2001) 'Progression of fibrosis in chronic liver diseases: Time to tally the score', *Journal of Hepatology*, 34(5), pp. 764–767. doi: 10.1016/S0168-8278(01)00055-1.

Poordad, F. *et al.* (2011) 'Boceprevir for Untreated Chronic HCV Genotype 1 Infection', *New England Journal of Medicine*, 364(13), pp. 1195–1206. doi: 10.1056/nejmoa1010494.

Raymond T. Chung, M.D., Janet Andersen, Sc.D., Paul Volberding, M.D., Gregory K.

Robbins, M.D., Tun Liu, M.S., Kenneth E. Sherman, M.D., Ph.D., Marion G. Peters, M.D., Margaret J. Koziel, M.D., Atul K. Bhan, M.D., Beverly Alston, M.D., Dodi Colquhoun, B.S, for the A. C. T. G. A. S. T. (2004) 'Peginterferon alfa-2a Plus ribavirin versus interferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C in HIV-Co-infected persons', *Infectious Diseases in Clinical Practice*, 12(6), pp. 367–368. doi: 10.1097/01.idc.0000144911.19687.56.

Restivo Pantalone, G. *et al.* (2010) 'Hepatocellular carcinoma in patients with thalassaemia syndromes: Clinical characteristics and outcome in a long term single centre experience', *British Journal of Haematology*, 150(2), pp. 245–247. doi: 10.1111/j.1365-2141.2010.08180.x.

Reynolds, J. E. *et al.* (1996) 'Internal initiation of translation of hepatitis V virus RNA: The ribosome entry site is at the authentic initiation codon', *Rna*, pp. 867–878.

De Sanctis, V. *et al.* (2020) 'A concise review on the frequency, major risk factors and surveillance of hepatocellular carcinoma (HCC) in  $\beta$ -thalassemias: Past, present and future perspectives and the ICET - A experience', *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 11(1), pp. 1–16. doi: 10.4084/MJHID.2020.006.

Schrier, S. L. (1994) 'Thalassemia: Pathophysiology of red cell changes', *Annual Review of Medicine*, 45(1), pp. 211–218. doi: 10.1146/annurev.med.45.1.211.

Sebastiani, G. and Alberti, A. (1995) 'Non invasive fibrosis biomarkers reduce but not substitute the need for liver biopsy', *Gastroenterology*, 108(4), p. A251. doi: 10.1016/0016-5085(95)23665-1.

Seeff, L. B. (2002) 'Natural history of chronic hepatitis C', *Hepatology*, 36(5 I), pp. 35–46. doi: 10.1053/jhep.2002.36806.

Serfaty, L. *et al.* (1998) 'Determinants of outcome of compensated hepatitis C virus-related cirrhosis', *Hepatology*, 27(5), pp. 1435–1440. doi: 10.1002/hep.510270535.

Sibille, J. -C, Kondo, H. and Aisen, P. (1988) 'Interactions between isolated hepatocytes and kupffer cells in iron metabolism: A possible role for ferritin as an iron carrier protein', *Hepatology*, 8(2), pp. 296–301. doi: 10.1002/hep.1840080218.

Soliman, A. T. *et al.* (2014) 'Longitudinal study on liver functions in patients with thalassemia major before and after deferasirox (DFX) therapy', *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 6(1). doi: 10.4084/MJHID.2014.025.

Sorrentino, P. *et al.* (2009) 'Liver iron excess in patients with hepatocellular carcinoma developed on non-alcoholic steato-hepatitis', *Journal of Hepatology*, 50(2), pp. 351–357. doi: 10.1016/j.jhep.2008.09.011.

- tal, P. *et al.* (1995) 'Kupffer cell iron overload induces intercellular adhesion molecule-1 expression on hepatocytes in genetic hemochromatosis', *Hepatology*, 21(5), pp. 1308–1316. doi: 10.1016/0270-9139(95)90052-7.
- Taher, A. T. and Saliba, A. N. (2017) 'Iron overload in thalassemia: different organs at different rates', pp. 265–271.
- Taher, A. T., Weatherall, D. J. and Cappellini, M. D. (2018) 'Thalassaemia', *The Lancet*, 391(10116), pp. 155–167. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31822-6.
- Tannapfel, A., Dienes, H. P. and Lohse, A. W. (2012) 'The Indications for Liver Biopsy', *Deutsches Arzteblatt International*, 109(27–28), pp. 477–483. doi: 10.3238/arztebl.2012.0477.
- Thompson, A. A. *et al.* (2018) 'Gene Therapy in Patients with Transfusion-Dependent  $\beta$ -Thalassemia', *New England Journal of Medicine*, 378(16), pp. 1479–1493. doi: 10.1056/nejmoa1705342.
- Traeger-Synodinos, J. *et al.* (2015) 'EMQN Best Practice Guidelines for molecular and haematology methods for carrier identification and prenatal diagnosis of the haemoglobinopathies', *European Journal of Human Genetics*, 23(4), pp. 426–437. doi: 10.1038/ejhg.2014.131.
- Vrieling, H. *et al.* (1995) 'Transmission of Hepatitis C Virus by Anti-HCV-Negative Blood Transfusion: Case Report', *Vox Sanguinis*, 68(1), pp. 55–56. doi: 10.1111/j.1423-0410.1995.tb02546.x.
- Weatherall, D. J. (2010) 'Thalassemia as a global health problem: Recent progress toward its control in the developing countries', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1202, pp. 17–23. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05546.x.
- Weatherall, D. J. and Clegg, J. B. (2001) 'Inherited haemoglobin disorders: An increasing global health problem', *Bulletin of the World Health Organization*, 79(8), pp. 704–712. doi: 10.1590/S0042-96862001000800005.
- Zampino, R. *et al.* (2015) 'Hepatocellular carcinoma in chronic HBV-HCV co-infection is correlated to fibrosis and disease duration', *Annals of Hepatology*, 14(1), pp. 75–82. doi: 10.1016/s1665-2681(19)30803-8.