

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**Α΄ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΧΡΟΥΣΟΣ**



**Μελέτη της αιμοσιδήρωσης σε  
μη-μεταγγιζόμενους ασθενείς  
με μεσογειακά σύνδρομα.  
Τρόποι θεραπείας και συσχέτιση με κλινικό  
φαινότυπο και άλλους επιβαρυντικούς  
παράγοντες.**

**ΔΑΜΙΑΝΟΣ Γ. ΜΕΝΕΓΑΣ**

ΠΑΙΔΙΑΤΡΟΣ

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΑΘΗΝΑ 2013**

Ημερομηνία Αιτήσεως: 22/6/1998

Ημερομηνία ορισμού 3 μελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 6/10/1998

Ημερομηνία ορισμού-κατάθεσης θέματος: 17/12/1999

Ημερομηνία κατάθεσης διδακτορικής διατριβής: 1/2/2013

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής: Θεοδόσιος Ν. Πελεγρίνης

Μέλη επταμελούς μελούς Εξεταστικής Επιτροπής:

- **Καπάμης Χρήστος**, Ομότιμος Καθηγητής Παιδιατρικής, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών, μέλος τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής
- **Καπάμης Αντώνης**, Αναπληρωτής Καθηγητής Παιδιατρικής Αιματολογίας-Ογκολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών, μέλος τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής .
- **Μεταξωτού-Μαυρομμάτη Άννα**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παιδιατρικής, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών, μέλος τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής.
- **Καναβάκης Εμμανουήλ**, Καθηγητής Γενετικής, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών, μέλος εξεταστικής επιτροπής.
- **Ζουμάκης Εμμανουήλ**, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιοχημίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών, μέλος εξεταστικής επιτροπής.
- **Παπακωνσταντίνου Ολυμπία**, Επίκουρη Καθηγήτρια Ακτινολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών, μέλος εξεταστικής επιτροπής.
- **Παπανικολάου Γεώργιος**, Λέκτορας Βιολογίας του Ανθρώπου – Μοριακής Γενετικής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο Αθηνών, μέλος εξεταστικής επιτροπής.

Βαθμός: ΑΡΙΣΤΑ

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής υπό του Ιατρικού Τμήματος του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει την αποδοχή των γνωμών του συγγραφέως.

Νόμος 5343/1932, άρθρο 202, §2

ΕΘΝΙΚΟΝ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΑΘΗΝΩΝ



ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

## ΕΚ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΥ ΟΡΚΟΥ

### ΚΕΙΜΕΝΟ

« ΟΜΝΥΜΙ ΤΟΝ ΘΕΟΝ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ. ΗΓΗΣΕΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ. ΔΙΑΠΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗΝ ΕΙΡΞΕΙΝ. ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΤΙΜΟΝ. ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ. ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ. ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΙΩ, ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ. Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ, Η ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΚΑΛΕΕΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ, ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΕΟΝΤΙ ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΩΝ, ΤΑΥΤΗΝ ΤΗΝ ΕΠΑΓΓΕΛΙΑΝ ΕΠΙΤΕΛΟΥΝΤΙ ΕΙΗ ΜΟΙ ΤΟΝ ΘΕΟΝ ΑΡΩΓΟΝ ΚΤΗΣΑΣΘΑΙ ΕΝ ΤΩ ΒΙΩ ».

ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ



## ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΣ ΟΡΚΟΣ

### ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ

« ΟΡΚΙΖΟΜΑΙ ΣΤΟ ΘΕΟ ΟΤΙ ΘΑ ΕΚΠΑΗΡΩΣΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΜΟΥ ΑΥΤΟ ΚΑΙ ΤΟ ΣΥΜΒΟΛΑΙΟ ΑΥΤΟ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΗ ΔΥΝΑΜΗ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ ΜΟΥ ΟΤΙ ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΕΚΕΙΝΟΝ ΠΟΥ ΜΟΥ ΔΙΔΑΞΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΑΥΤΗ ΙΣΟΝ ΜΕ ΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ . ΟΤΙ ΘΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΩ ΤΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΔΙΑΙΤΑ ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΩΦΕΛΕΙΑ ΤΩΝ ΑΡΡΩΣΤΩΝ, ΟΣΟ ΕΞΑΡΤΑΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗ ΔΥΝΑΜΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ ΜΟΥ, ΚΑΙ ( ΥΠΟΣΧΟΜΑΙ ΟΤΙ ) ΘΑ ΤΟΥΣ ΠΡΟΦΥΛΑΞΩ ΑΠΟ ΚΑΘΕ ΒΛΑΒΗ ΚΑΙ ΑΔΙΚΙΑ.

ΔΕΝ ΘΑ ΧΟΡΗΣΩ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟ ΦΑΡΜΑΚΟ ΣΕ ΚΑΝΕΝΑ, ΟΣΟ ΚΑΙ ΑΝ ΠΑΡΑΚΛΗΘΩ, ΟΥΤΕ ΘΑ ΥΠΟΔΕΙΩ ΤΕΤΟΙΑ ΣΥΜΒΟΥΛΗ. ΕΠΙΣΗΣ ΔΕΝ ΘΑ ΔΩΣΩ ΣΕ ΓΥΝΑΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΟ ΕΚΤΡΩΤΙΚΟ, ΑΓΝΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΗ ΘΑ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΤΗ ΖΩΗ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΜΟΥ. ΣΕ ΟΣΑ ΣΠΙΤΙΑ ΠΡΟΣΚΑΛΟΥΜΑΙ, ΘΑ ΜΠΑΙΝΩ ΓΙΑ ΤΟ ΚΑΛΟ ΤΩΝ ΑΡΡΩΣΤΩΝ, ΚΡΑΤΩΝΤΑΣ ΤΟΝ ΕΑΥΤΟ ΜΟΥ ΜΑΚΡΙΑ ΑΠΟ ΚΑΘΕ ΘΕΜΗΜΑΤΙΚΗ ΑΔΙΚΙΑ Η ΑΛΛΗ ΔΙΑΦΘΟΡΑ ΚΑΙ ΠΡΟ ΠΑΝΤΩΝ ΜΑΚΡΙΑ ΑΠΟ ΚΑΘΕ ΑΦΡΟΔΙΣΙΑΚΗ ΠΡΑΞΗ .

ΟΣΑ ΔΕ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΘΑ ΔΩ Η ΘΑ ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΠΕΡΑ ΑΠΟ ΤΙΣ ΑΣΧΟΛΙΕΣ ΜΟΥ ΣΤΗΝ ΚΑΘΗΜΕΡΙΝΗ ΖΩΗ, ΟΣΑ ΔΕΝ ΠΡΕΠΕΙ ΠΟΤΕ ΝΑ ΚΟΙΝΟΛΟΓΟΥΝΤΑΙ ΣΤΟΥΣ ΞΕΘ, ΘΑ ΤΑ ΑΠΟΣΙΩΠΩ, ΥΠΟΛΟΓΙΖΟΝΤΑΣ ΟΤΙ ΑΥΤΑ ΕΙΝΑΙ ΙΕΡΑ ΜΥΣΤΙΚΑ. ΟΣΟ ΛΟΙΠΟΝ ΘΑ ΤΗΡΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΜΟΥ ΑΥΤΟ, ΚΑΙ ΔΕΝ ΘΑ ΤΟΝ ΠΑΡΑΒΙΑΖΩ ΕΙΘΕ ΝΑ ΠΕΤΥΧΑΙΝΩ ΣΤΗ ΖΩΗ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΜΟΥ, ΕΧΟΝΤΑΣ ΚΑΛΟ ΟΝΟΜΑ ΠΑΝΤΟΤΕ ΑΝΑΜΕΣΑ ΣΤΟΥΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ ΕΑΝ ΟΜΩΣ ΤΟΝ ΠΑΡΑΒΩ ΚΑΙ ΓΙΝΩ ΕΠΙΟΡΚΟΣ, ΝΑ ΠΑΘΩ ΤΑ ΑΝΤΙΘΕΤΑ.

ΔΙΔΟΝΤΑΣ ΑΥΤΟ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΕΥΧΟΜΑΙ ΝΑ ΕΧΩ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ ΤΟΥ ΘΕΟΥ ΣΤΗ ΖΩΗ ΜΟΥ ».

ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ

## **ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ**

Όνομα: Δαμιανός  
Επώνυμο: Μένεγας  
Τόπος Γέννησης: Αθήνα  
Έτος Γέννησης: 1966  
Διεύθυνση: Κοτζιάδων 2-4,  
18537, Πειραιάς  
Τηλέφωνο: 210-4538581  
Fax: 210-9592088

### **ΣΠΟΥΔΕΣ**

1984 - 1990 : Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Πατρών.

1996 - 2000 : Ειδικότητα Παιδιατρικής στην Α΄ Πανεπιστημιακή Κλινική του Νοσοκομείου Παιδών "Αγία Σοφία"

### **ΤΙΤΛΟΙ ΣΠΟΥΔΩΝ**

Πτυχίο Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Πατρών  
(αριθμός 723/ 19-07-1991).

Άδεια ασκήσεως του ιατρικού επαγγέλματος  
(με αριθμ πρωτ 17755/ 26-08- 1991 από τη Νομαρχία Αθηνών).

Τίτλος ειδικότητας Παιδιατρικής  
(με την αριθμό 14667/ 10-10-2000 απόφαση της Νομαρχίας Αθηνών).

### **ΠΡΟΥΠΗΡΕΣΙΑ**

1991 – 1992: Υπηρεσία Υπαίθρου στο Π.Ι Κερκίνης του Νομού Σερρών.

1993 – 1994: Εκπλήρωση Στρατιωτικής θητείας ως ιατρός στο 31<sup>ο</sup> Σύνταγμα Πεζικού και στο Τάγμα Γ.Ε.Σ.

1995 – 1996: Research Fellow στην έδρα Φυσιολογίας του University of Pennsylvania (Philadelphia, USA).

Μετεκπαίδευση στην κλινική περιγεννητικής καρδιολογίας του Pennsylvania Hospital (Philadelphia, USA).

Ερευνητική απασχόληση στο εργαστήριο της παιδιατρικής κλινικής του νοσοκομείου του Thomas Jefferson University (Philadelphia, USA) σε θέματα νεογνολογίας.

1996 – 2000: Άσκηση για την απόκτηση ειδικότητας Παιδιατρικής στην Α' Παιδιατρική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών στο Νοσοκομείο Παίδων "Η Αγία Σοφία". Κατά τη διάρκεια της εκπαίδευσής στη γενική παιδιατρική, στη Μονάδα Μεσογειακής Αναιμίας, στο Κέντρο Ειδικών Θεραπειών (τμήμα ογκολογίας), στα εξωτερικά ιατρεία, στο τμήμα προώρων και προβληματικών νεογνών (επίδοση πολύ καλή).

10/2000 – 7/2004 : Άμισθος επιστημονικός συνεργάτης Α' Παιδιατρικής Κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών στο τμήμα αιμολυτικών αναιμιών του Χωρεμείου Ερευνητικού Εργαστηρίου.

10/2000 - σήμερα: Ελεύθερο επάγγελμα.

3/2001 – 8/2008: Παιδίατρος του Ινστιτούτου Υγείας του Παιδιού στη Διεύθυνση Αναπτυξιακής και Κοινωνικής Παιδιατρικής στο Κέντρο Υγείας του Παιδιού στην Καισαριανή.

3/2001 - 7/2002: Ενεργός συμμετοχή στο πρόγραμμα εφημεριών των εξωτερικών ιατρείων του Νοσ. Παίδων "Η Αγία Σοφία".

8/2002 – 9/2009: Επιμελητής Ευρωκλινικής Παίδων.

10/2009 – 6/2010: Παιδίατρος Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.) στο Τμήμα Επιδημιολογικής Επιτήρησης και στο Γραφείο νοσημάτων που προλαμβάνονται με εμβολιασμό.

7/2010 – 12/2012: Medical Advisor παιδιατρικών εμβολίων και παιδικής διατροφής στην φαρμακευτική εταιρεία Pfizer.

1/2012 – 4/2013: Medical Advisor παιδιατρικών εμβολίων, παιδικής διατροφής και αιμορροφιλίας στην φαρμακευτική εταιρεία Pfizer

5/2013 – σήμερα: Medical Advisor παιδιατρικών εμβολίων, παιδικής διατροφής και αιμορροφιλίας στην φαρμακευτική εταιρεία Pfizer

## **ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ**

- Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Αθηνών με θέμα "Μελέτη της αιμοσιδήρωσης σε μη-μεταγγιζόμενους ασθενείς με μεσογειακά σύνδρομα. Τρόποι θεραπείας και συσχέτιση με κλινικό φαινότυπο και άλλους επιβαρυντικούς παράγοντες."
- Υπότροφος της Ελληνικής Παιδιατρικής Εταιρείας για το έτος 2001-2002 με θέμα "Αναπτυξιακή και Κοινωνική Παιδιατρική" στο Ινστιτούτο Υγείας του Παιδιού.
- Συντονιστής της πανελλαδικής μελέτης "Μελέτη εμβολιαστικής κάλυψης και φυματινικής διαμόλυνσης στην Ελλάδα 2005-2006."
- Μέλος της ομάδας εργασίας του προγράμματος VENICE (Vaccine European New Integrated Collaboration Effort) για την Ελλάδα, υπεύθυνος του Working Package 5 (Preparedness and management for adverse effect occurrence).

## **ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ**

1. Μελέτη των απόψεων των παιδιάτρων στην Ελλάδα σχετικά με το ατομικό βιβλιάριο υγείας.  
Ινστιτούτο Υγείας του Παιδιού, Διεύθυνση Κοινωνικής Παιδιατρικής, Α.4.5.  
Υπεύθυνοι: Αντωνιάδου-Κουμάτου Ι, **Μένεγας Δ.**
2. Ηλικιακή κατανομή βασικών αναπτυξιακών δεξιοτήτων παιδιών ηλικίας 0-2 ετών σε Ελληνικό πληθυσμό.  
Ινστιτούτο Υγείας του Παιδιού, Διεύθυνση Κοινωνικής Παιδιατρικής, Α.4.7.  
Υπεύθυνοι: Αντωνιάδου-Κουμάτου Ι, **Μένεγας Δ.**  
Συνεργάτες : Σαραφίδου Ε.
3. Μελέτη εμβολιαστικής κάλυψης και φυματινικής διαμόλυνσης στην Ελλάδα, 2005-2006.  
Ινστιτούτο Υγείας του Παιδιού, Διεύθυνση Κοινωνικής Παιδιατρικής, Α.34.  
Υπεύθυνοι: Αντωνιάδου-Κουμάτου Ι, **Μένεγας Δ**, Οικονομάκος Δ, Ηλιοδρομίτη Ζ.  
Συνεργαζόμενοι Φορείς:  
α) Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας (Ε.Σ.Δ.Υ.), Τομέας υγείας του παιδιού  
β) Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.) Τμήμα  
Επιδημιολογικής Επιτήρησης και Παρέμβασης  
γ) Ινστιτούτο Υγείας του Παιδιού (Ι.Υ.Π.), Δ/νση κοινωνικής παιδιατρικής  
δ) Υπουργείο Υγείας και Κοινωνικής Αλληλεγγύης (Υ.Υ.Κ.Α.), Δ/νση Δημόσιας Υγιεινής



4. Vaccine European New Integrated Collaboration Effort (VENICE)  
Ινστιτούτο Υγείας του Παιδιού, Διεύθυνση Κοινωνικής Παιδιατρικής, Α.36.  
Υπεύθυνοι: Αντωνιάδου-Κουμάτου Ι, **Μένεγας Δ.**  
Συνεργαζόμενοι Φορείς:  
α) Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας (Ε.Σ.Δ.Υ.), Τομέας υγείας του παιδιού  
β) Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.) Τμήμα  
επιδημιολογικής επιτήρησης και παρέμβασης  
γ) Ινστιτούτο Υγείας του Παιδιού (Ι.Υ.Π.), Δ/νση κοινωνικής παιδιατρικής  
δ) Υπουργείο Υγείας και Κοινωνικής Αλληλεγγύης (Υ.Υ.Κ.Α.), Δ/νση Δημόσιας  
Υγιεινής

### **ΆΛΛΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ**

- Τακτικό μέλος της Ελληνικής Παιδιατρικής Εταιρείας.
- Μέλος του General Medical Council (Full registration 19/9/1994).
- Μέλος της Ελληνικής Εταιρείας Παιδιατρικής Αιματολογίας -Ογκολογίας.
- Μέλος της Ελληνικής Ακαδημίας Παιδιατρικής.
- Μέλος της European Society of Pediatric Infectious Diseases (ESPID)

### **ΤΙΜΗΤΙΚΕΣ ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ-ΒΡΑΒΕΙΑ**

#### **Β' Χωρέμιο Έπαθλο 2009**

Απονεμήθηκε από την Ελληνική Παιδιατρική Εταιρεία κατά το 47<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο στα Χανιά, 19-21 Ιουνίου 2009 , για την ερευνητική εργασία με τίτλο: " Συχνότητα και βαρύτητα επιπλοκών ενδιάμεσης β-μεσογειακής αναιμίας σε Έλληνες ασθενείς. Συσχέτιση με το γονότυπο".

### **ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ**

- Παρακολούθηση σεμιναρίου Advanced Pediatric Life Support από το Johns Hopkins Hospital and Pediatric Trauma Care υπό την αιγίδα της Α' Παιδιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών (Αθήνα 30 Νοεμβρίου, 1 & 2 Δεκεμβρίου 2001).
- Παρακολούθηση Ελληνικών και διεθνών συνεδρίων εκπαιδευτικού χαρακτήρα.

## ΕΚΔΟΣΕΙΣ

Αντωνιάδου-Κουμάτου Ι, **Μένεγας Δ**, Σαραφίδου Ε : Αναπτυξιακή αξιολόγηση παιδιών 0-2 χρόνων: Χρήση και στοιχεία κλίμακας αξιολόγησης παιδιών ηλικίας 0-2 χρόνων. Διεύθυνση Κοινωνικής και Αναπτυξιακής Παιδιατρικής, Ινστιτούτο Υγείας του Παιδιού, 2006.

## ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΓΙΑ ΠΑΙΔΙΑΤΡΟΥΣ

Αντωνιάδου-Κουμάτου Ι, **Μένεγας Δ** : Denver II (προσαρμογή στην Ελληνική γλώσσα). Πηγή: W. K. Frankenburg and J. B. Dodds.

## ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. **Menegas D**, Huhta JC, Weil-Chalker SR, Wood DC, Debbs RH. Management of sustained fetal tachycardia. *Pediatr. Res.* 1996; 39(4): 32A.
2. Antunes MJ, Koff J, **Menegas D**, Dembofsky C, Greenspan JS, Chander A. Meconium injury in altered lung elastic forces independent of surfactant function. *Pediatr. Res.* 1996; 39(4): 192A.
3. Dembofsky C, Antunes M, Cleary G, Koff J, **Menegas D**, Chander A (Spon. by Spitzer A). Superoxide dismutase and surfactant therapy in a rat model of meconium injury. *Pediatr. Res.* 1996; 39(4):331A.
4. Moschovi M, Psychou F, **Menegas D**, Nikolaidou P, Tzortzatu-Stathopoulou F. Hydroxyurea and Hodgkin's disease in a child with sickle cell anemia. *Pediatr. Res.* 1999; 45(5): 760A.
5. Γιαννάκη Μ, Λαμπαδαρίου Ε, Χατζηβασιλείου Μ, Γρύλλης Σ, **Μένεγας Δ**, Πάγκαλη Α. Δυο περιπτώσεις συγγενούς σύφιλης στο νοσοκομείο παιδών "Η Αγία Σοφία" το 1998. Εφαρμοσμένη Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διαγνωστική 2000; 5(1): 32-41.
6. Kattamis A, Ladis V, Metaxotou-Mavrommati A, **Menegas D**, Kattamis CH. Hydroxyurea therapy in patients with thalassemia intermedia. *TIF Magazine* 2002; 35: 9-13.
7. Moschovi M, Psychou F, **Menegas D**, Tsangaris G, Tzortzatu-Stathopoulou F, Nikolaidou P. Hodgkin's disease in a child with sickle cell disease treated with hydroxyurea. *Pediatr Hematol Oncol.* 2001 Sep; 18(6):371-6.

8. Papadaki MG, Kattamis AC, Papadaki IG, **Menegas DG**, Georgakopoulou TP, Mavrommati-Metaxotou A, Kattamis CA. Abdominal ultrasonographic findings in patients with sickle-cell anaemia and thalassaemia intermedia. *Pediatr Radiol*. 2003 Aug; 33(8):515-21. Epub 2003 Jun 12.
9. Moschovi M, **Menegas D**, Stefanaki K, Constantinidou CV, Tzortzatos-Stathopoulou F. Primary gastric Burkitt lymphoma in childhood: associated with *Helicobacter pylori*? *Med Pediatr Oncol*. 2003 Nov; 41(5):444-7.
10. Ξεκαλάκη Α, **Μένεγας Δ**, Ζολώτα Α, Ηλιοδρομίτη Ζ, Πρασούλη Α, Τζίνη Ε, Μαυρίκα Π, Δημοπούλου Α, Μάργαρη Α, Αντωνιάδου Ι. Πρότυπο πρόγραμμα αγωγής και προαγωγής υγείας σε αστική κοινότητα από φορέα πρωτοβάθμιας φροντίδας υγείας. *Paediatrica* 2008;71:469-474.
11. Myint TT, Madhava H, Balmer P, Christopoulou D, Attal S, **Menegas D**, Sprenger R, Bonnet E. The impact of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on invasive pneumococcal disease: a literature review. *Adv Ther*. 2013;30(2):127-51.

### **ΕΚΘΕΣΕΙΣ**

Παναγιωτόπουλος Τ, Γεωργακοπούλου Θ, Σταύρου Δ, Ντάνης Κ, Λάγγας Δ, Γεωργιάδου Λ, Βόβα Μ, Δεδούκου Ξ, Ηλιοδρομίτη Ζ, Κατερέλος Π, **Μένεγας Δ**, Μυλωνά Ε, Μυλωνά Φ, Οικονομάκος Δ, Γαβανά Μ, Γιαννακόπουλος Σ, Καβάκα Ν, Κούτης Α, Μπένος Α, Σπάλα Γ, Αντωνιάδου Ι. Εθνική μελέτη κατάστασης εμβολιασμού και συχνότητας φυματικής λοίμωξης στα παιδιά, 2006. ([http://www.nsph.gr/files/011\\_Ygeias\\_Paidiou/Ereunes/emvolia\\_tblimoxi\\_2006\\_ekthesi.pdf](http://www.nsph.gr/files/011_Ygeias_Paidiou/Ereunes/emvolia_tblimoxi_2006_ekthesi.pdf) )

### **ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

1. Moschovi M, Psychou F, **Menegas D**, Nikolaidou P, Tzortzatos-Stathopoulou F. Hydroxyurea and Hodgkin's disease in a child with sickle cell Anemia. XVth Meeting of the International Society of Haematology – African & European Division, Durban, South Africa 18-23 September 1999.
2. Ladis V, Theodoridis Ch, Georgakopoulou Th, Berdousi H, Agrafioti C, **Menegas D**, Kattamis C. The epidemiology of endocrine disorders in patients with thalassemia major and intermedia in Greece. 3<sup>rd</sup> International conference “Recent developments on the diagnosis and therapy of

endocrine and metabolic problems in thalassaemia". Athens 10-11 November 2000.

3. Papadaki MG, Kattamis AC, **Menegas DG**, Georgakopoulou TP, Mavrommati-Metaxotou A, Kattamis CA. Abdominal ultrasonographic findings in patients with sickle-cell anemia and thalassemia intermedia syndromes. 4<sup>th</sup> International Pediatric Radiology Meeting, Paris May 28-June 1, 2001.
4. **Menegas D**, Kattamis A, Georgakopoulou Th, Kanavakis E, Metaxotou-Mavrommati A, Kattamis Ch. Iron status in thalassemia intermedia. 8<sup>th</sup> International Conference on Thalassemia and the Hemoglobinopathies October 18-21, 2001, Athens, Greece.
5. Kattamis A, Ladis V, Metaxotou-Mavrommati A, **Menegas D**, Kattamis Ch. Hydroxyurea therapy in patients with thalassemia intermedia. 8<sup>th</sup> International Conference on Thalassemia and the Hemoglobinopathies. October 18-21, 2001, Athens, Greece.
6. Kattamis A, **Menegas D**, Palaiologos G, Palaiologou D. Iron load in patients with thalassemia intermedia. Symposium on current issues in iron overload in rare anemias. October 13-16, 2005, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany.
7. Danis K, Georgakopoulou T, Stavrou T, Dedoukou X, Iliodromiti Z, Kavaka N, Laggas D, **Menegas D**, Milona F, Oikonomakos D, Benos A, Spala G, Antoniadou I, Panagiotopoulos T. Vaccination coverage in minority groups in Greece: A cross-sectional study. 2<sup>nd</sup> European Scientific Conference on Applied Infectious Disease Epidemiology (ESCAIDE) Berlin, Germany, 19-21 November 2008.
8. **Menegas D**, Georgakopoulou T, Theodoridou K, Lourida A, Theodoridou M. Attitudes of parents towards the vaccination for pandemic flu in Athens area before its official application. 28<sup>th</sup> Annual meeting of the European Society for Pediatric Infectious Diseases (ESPID), Nice, France, 4-8 May 2010.
9. Georgakopoulou T, **Menegas D**, Lourida A, Theodoridou K, Konte V, Theodoridou M. Vaccination coverage and attitudes towards vaccination of health care personnel of a major pediatric hospital in Athens. 29<sup>th</sup> Annual meeting of the European Society for Pediatric Infectious Diseases (ESPID), The Hague, Netherlands, 7-11 June 2011.



10. Syriopoulou V, Syrogiannopoulos GA, Koutouzis E, Tsolia M, Daikos GL, Georgakopoulou T, Kavaliotis J, Tsilimigaki A, Roilides E, Siamopoulou-Mavridou A, Galanakis E, Michailidou E, Christaki M, Iosifides E, Stavrou S, Maraki S, Charissiadou A, Saranti-Papasaranti E, **Menegas D**, Grivea IN, Kafetzis D. Serotype distribution and antimicrobial susceptibilities of *S. pneumoniae* following introduction of pneumococcal conjugate vaccines in Greece. 29<sup>th</sup> Annual meeting of the European Society for Pediatric Infectious Diseases (ESPID), The Hague, Netherlands, 7-11 June 2011.
11. Syriopoulou V, **Menegas D**, Georgakopoulou T, Koutouzis E, Charissiadou A, Chrysaiki A, Pangalis A, Theodoridou M, Daikos GL. Pneumococcal disease in children: changing serotypes and antimicrobial resistance in a tertiary hospital in Greece (2002-2011). 8th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases (ISPPD), Iguacu Falls, Brazil, 12-15 March 2012. Poster 195.
12. Myint TTH, Madhava H, Balmer P, Christopoulou D, Attal S, **Menegas D**, Sprenger R, Bonnet E. The impact of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) on invasive pneumococcal disease (IPD): A literature review. 8th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases (ISPPD), Iguacu Falls, Brazil, 12-15 March 2012. Poster No 196.
13. Myint TTH, Madhava H, Balmer P, Christopoulou D, Attal S, **Menegas D**, Sprenger R, Bonnet E. The impact of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) on pneumonia and mortality: A literature review. 8th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases (ISPPD), Iguacu Falls, Brazil, 12-15 March 2012. Poster No 197.
14. Syriopoulou V, Syrogiannopoulos GA, Georgakopoulou T, Tsolia M, **Menegas D**, Koutouzis E, Galanakis E, Kavaliotis J, Tsilimigkaki A, Siamopoulou-Mavridou A, Maraki S, Michailidou E, Christaki M, Stavrou S, Charissiadou A, Roilides E, Daikos GI, Grivea IN, Kafetzis D. Serotype distribution and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* following introduction of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) in Greece. 30<sup>th</sup> Annual meeting of the European Society for Pediatric Infectious Diseases (ESPID), Thessaloniki, Greece, 8-12 May 2012.
15. Georgakopoulou T, **Menegas D**, Giannaki M, Petridou E, Lourida A, Orfanou E, Lagona E, Xaidara A, Michos A, Sihanidou T, Anagnostakou M, Korkas A, Manolaki N, Kassiou-Prountzou K, Syriopoulou V, Theodoridou M. Epidemiology of respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis in hospitalized

children in Greece, 2009-2011. 30<sup>th</sup> Annual meeting of the European Society for Pediatric Infectious Diseases (ESPID), Thessaloniki, Greece, 8-12 May 2012. Διαθέσιμο στο:

<http://www.epostersonline.com/espид2012/?q=node/4013>

16. Georgakopoulou T, **Menegas D**, Detsis M, Pervanidou D, Horefti E, Pogka V, Pipa E, Vernardaki A, Hadjichristodoulou C, Mentis A, Theodoridou M, Kremastinou J. A review of the measles outbreak in Greece for the years 2010-2011. 30<sup>th</sup> Annual meeting of the European Society for Pediatric Infectious Diseases (ESPID), Thessaloniki, Greece, 8-12 May 2012. Διαθέσιμο στο: <http://www.epostersonline.com/espид2012/?q=node/2594>
17. Georgakopoulou T, **Menegas D**, Tzanakaki G, Pipa E, Vernardaki A, Mavraganis P, Theodoridou M, Kremastinou J. Epidemiology of Bacterial Meningitis in Greece, in the Era of Conjugate Vaccines: A 7 years review 2005-2011. 52nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), San Fransisco, USA, 9-12 Sep 2012.
18. Syriopoulou V, Syrogiannopoulos GA, Koutouzis E, **Menegas D**, Tsolia M, Georgakopoulou T, Kavaliotis J, Galanakis E, Roilides E, Siamopoulou-Mavridou A, Chronopoulou G, Charissiadou A, Daikos GL, Grivea IN, Kafetzis D. Epidemiology and antimicrobial susceptibility of *S. pneumoniae* following introduction of pneumococcal conjugate vaccines in Greece. 6th European Scientific Conference on Applied Infectious Disease Epidemiology (ESCAIDE), Edinburgh, Scotland, UK, 24-26 October 2012.
19. Georgakopoulou T, Vernardaki A, Pipa E, Poufta S, Mavraganis P, **Menegas D**, Voulgari-Kokota A, Ponga V, Emmanouil M, Fountoukidou P, Constantinidis T, Chatziioannou I, Chatzidimitriou D, Constantinidis T, Daskalakis I, Malisiovas N, Mentis A, Hadjichristodoulou C, Kourea - Kremastinou J. Environmental surveillance of polioviruses in Greece as a supplementary tool in the AFP surveillance: A preliminary report. 6th European Scientific Conference on Applied Infectious Disease Epidemiology (ESCAIDE), Edinburgh, Scotland, UK, 24-26 October 2012.
20. Myint TTH, Madhava H, Balmer P, Christopoulou D, **Menegas D**, Sprenger R, Bonnet E. The impact of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) on pneumococcal meningitis: A literature review. Excellence in Paediatrics Congress (EIP), Madrid, Spain 28 November – 1 December 2012.
21. Georgakopoulou T, **Menegas D**, Vernardaki A, Petridou E, Spoulou V,

Giannaki M, Theodoridou M-A. Epidemiology of pertussis in a tertiary pediatric hospital in Athens, 2010-2012. 31st Annual meeting of the European Society for Pediatric Infectious Diseases (ESPID), Milano, Italy, 28 May -1 June 2013.

22. Syriopoulou V, Syrogiannopoulos GA, Koutouzis E, **Menegas D**, Georgakopoulou T, Galanakis E, Meridis T, Charissiadou A, Daikos GL, Grivea IN, Tsofia M. Serotype evolution and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* 2 years post introduction of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) in Greece. 31st Annual meeting of the European Society for Pediatric Infectious Diseases (ESPID), Milano, Italy, 28 May -1 June 2013.
23. Georgakopoulou T, Vernardaki A, **Menegas D**, Pipa E, Labropoulou S, Voulgari-Kokota A, Katsaounos P, Mavraganis P, Hadjichristodoulou C, Theodoridou M-A, Mentis A, Kourea-Kremastinou J. Ten years of certified "Polio free" status in Greece: 2002-2012. 31st Annual meeting of the European Society for Pediatric Infectious Diseases (ESPID), Milano, Italy, 28 May -1 June 2013.

#### **ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

1. Γεωργάκη-Αγγελάκη Ε, **Μένεγας Δ**, Καπόγιαννης Α, Χαροκόπος Ε. Το συνθετικό ανάλογο της αντιδιουρητικής ορμόνης [DDAVP] στην πρωτοπαθή νυχτερινή ενούρηση της παιδικής ηλικίας. 1998; 36ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Κύπρος (Δημοσιευμένο στον τόμο πρακτικών του συνεδρίου).
2. Αναγνωστόπουλος Γ, **Μένεγας Δ**, Γιαννούλια-Καραντανά Α. Βακτηριαμία από *S. Aureus* στην κοινότητα. 2000; 38ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Κως (Δημοσιευμένο στον τόμο πρακτικών του συνεδρίου).
3. Στέρπη Π, Καλογήρου Β, **Μένεγας Δ**, Παπαθανασίου-Κλώντζα Δ, Ξαϊδάρα Α. Πνευμονία : Σύγκριση δεδομένων της αρχής και του τέλους της δεκαετίας 1990. 2000; 38ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Κως (Δημοσιευμένο στον τόμο πρακτικών του συνεδρίου).
4. **Μένεγας Δ**, Σιαχανίδου Τ, Παπανδρέου Ε, Μάνδουλα Ε, Αναγνωστάκης Δ. Νεκρωτική εντεροκολίτιδα σε τελειόμηνα νεογνά. 2001; 11ο Πανελλήνιο Συνέδριο Περιγεννητικής Ιατρικής (Δημοσιευμένο στον τόμο πρακτικών του συνεδρίου).

5. **Μένεγας Δ**, Καττάμης Α, Γεωργακοπούλου Θ, Καναβάκης Ε, Μεταξωτού-Μαυρομμάτη Α, Καττάμης Χ. Αιμοσιδήρωση στην ενδιάμεση Μεσογειακή Αναιμία. 2001; 39ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Κρήτη (Δημοσιευμένο στον τόμο πρακτικών του συνεδρίου).
6. Παπαδάκη Μ, **Μένεγας Δ**, Καττάμης Α, Γεωργακοπούλου Θ, Μεταξωτού-Μαυρομμάτη Α, Καττάμης Χ. Υπερηχοτομογραφική διερεύνηση των συμπαγών οργάνων της άνω κοιλίας σε παιδιά με δρεπανοκυτταρική και ενδιάμεση μεσογειακή αναιμία. 2001; 39<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Κρήτη (Δημοσιευμένο στον τόμο πρακτικών του συνεδρίου).
7. Γεωργακοπούλου Θ, **Μένεγας Δ**, Καναβάκης Ε, Λαδής Β, Μεταξωτού-Μαυρομμάτη Α. Κλινικά ευρήματα σε ασθενείς με ενδιάμεση μεσογειακή αναιμία και συσχέτιση με το γονότυπο. 12<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Αθήνα 22-25 Νοεμβρίου 2001 Δημοσιευμένο στον τόμο πρακτικών του συνεδρίου, Αίμα 2001; 4 (Suppl. 5): 273.
8. **Μένεγας Δ**, Καττάμης Α, Γεωργακοπούλου Θ, Καναβάκης Ε, Μεταξωτού-Μαυρομμάτη Α, Καττάμης Χ. Αιμοσιδήρωση στην ενδιάμεση μεσογειακή αναιμία. 12<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Αθήνα 22-25 Νοεμβρίου 2001 (Δημοσιευμένο στον τόμο πρακτικών του συνεδρίου, Αίμα 2001; 4 (Suppl. 5): 258)
9. Καττάμης Α, Λαδής Β, **Μένεγας Δ**, Μεταξωτού-Μαυρομμάτη Α, Καναβάκης Ε, Καττάμης Χ. Θεραπεία με υδροξουρία σε ασθενείς με ενδιάμεση μεσογειακή αναιμία. 12<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Αθήνα 22-25 Νοεμβρίου 2001 (Δημοσιευμένο στον τόμο πρακτικών του συνεδρίου, Αίμα 2001; 4 (Suppl. 5): 268).
10. **Μένεγας Δ**, Παλαιολόγος Γ, Αποστολάκου Φ, Γεωργακοπούλου Θ, Λαζαροπούλου Χ, Μεταξωτού Α, Παπασωτηρίου Ι, Καττάμης Α. Παράγοντες εκτίμησης του φορτίου Fe και η συσχέτισή τους με κλινικές παραμέτρους σε ασθενείς με ενδιάμεση μεσογειακή αναιμία. 4<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Χημείας, Αθήνα 7-9 Νοεμβρίου 2002 (Δημοσιευμένο στον τόμο πρακτικών του συνεδρίου).
11. **Μένεγας Δ**, Οικονομάκος Δ, Σαλονικιώτη Α, Φιλιάκα Ζ, Γκόγκογλου Β, Αντωνιάδου Ι. Συγκριτική χρήση καμпуλών ανάπτυξης στην ερμηνεία του δείκτη μάζας σώματος. 2003, 41<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Ρόδος (Δημοσιευμένο στον τόμο πρακτικών του συνεδρίου).
12. **Μένεγας Δ**, Οικονομάκος Δ, Σαλονικιώτη Α, Κνιθάκη Α, Γκόγκογλου Β, Αντωνιάδου Ι. Αξιοπιστία μέτρησης βάρους και ύψους στον υπολογισμό του δείκτη μάζας σώματος. 2003, 41<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Ρόδος (Δημοσιευμένο στον τόμο πρακτικών του συνεδρίου).



13. Λιακοπούλου-Τσιτσιπή Θ, Αγραφιώτη Α, Ζησούλη Α, **Μένεγας Δ**, Κάσσου Χ, Αργυροπούλου Σ, Στεφανάκη Κ, Τσιβτανίδου-Κάκουρου Τ. Δερματικές βλάβες ως μονοσυστηματική εκδήλωση ιστοκυττάρωσης από κύτταρα Langerhans: περιγραφή περίπτωσης. 2003, 41<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Ρόδος (Δημοσιευμένο στον τόμο πρακτικών του συνεδρίου).
14. Λιακοπούλου-Τσιτσιπή Θ, Κάσσου Χ, Αγραφιώτη Α, **Μένεγας Δ**, Ζησούλη Α, Ντόκου Α, Καπόγιαννης Α. Οξεία νεφρική ανεπάρκεια σε νόσο Kawasaki: περιγραφή περίπτωσης. 2003, 41<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Ρόδος (Δημοσιευμένο στον τόμο πρακτικών του συνεδρίου).
15. Ατπλάκος Α, Ηλιοδρομίτη Ζ, **Μένεγας Δ**, Ξεκαλάκη Α, Οικονομάκος Δ, Αντωνιάδου Ι. Καταγραφή του είδους των πιεσομέτρων που χρησιμοποιούνται στη δευτεροβάθμια παιδιατρική πράξη και εκτίμηση της αξιοπιστίας τους. 2004, 42<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Κρήτη (Δημοσιευμένο στον τόμο πρακτικών του συνεδρίου).
16. **Μένεγας Δ**, Αντωνιάδου-Κουμάτου Ι. Μελέτη των απόψεων των παιδιάτρων στην Ελλάδα για το ατομικό βιβλιário υγείας. 2005, 43<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Κως (Δημοσιευμένο στον τόμο πρακτικών του συνεδρίου).
17. Λιακοπούλου-Τσιτσιπή Θ, Αγραφιώτη Α, Καραμπέτσος Ζ, Κάσσου Χ, Μπαρμπουνάκη Ι, Κουλούρη Μ, **Μένεγας Δ**, Καφρίτσα Π. Τετανία-μυοπάθεια ως πρώτη εκδήλωση κοιλιοκάκης. Περιγραφή περίπτωσης. 2005, 43<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Κως (Δημοσιευμένο στον τόμο πρακτικών του συνεδρίου).
18. Λιακοπούλου-Τσιτσιπή Θ, Μπαρμπουνάκη Ι, Κάσσου Χ, Καραμπέτσος Ζ, **Μένεγας Δ**, Κουλούρη Μ, Αγραφιώτη Α, Τσιβτανίδου-Κάκουρου Τ. Henoch-Schonlein πορφύρα και φουσσαλιδώδεις δερματικές βλάβες. Περιγραφή περίπτωσης. 2005, 43<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Κως (Δημοσιευμένο στον τόμο πρακτικών του συνεδρίου).
19. Λάγγας Δ, Γεωργακοπούλου Θ, Δεδούκου Ξ, Ηλιοδρομίτη Ζ, Καβάκα Ν, **Μένεγας Δ**, Μυλωνά Φ, Οικονομάκος Δ, Σταύρου Θ, Μπένος Α, Σπάλα Γ, Αντωνιάδου Ι, Παναγιωτόπουλος Π. Εθνική μελέτη εμβολιασμών 2006: Κάλυψη για αιμόφιλο ινφλουέντσας Β, ιό ηπατίτιδας Β και μηνιγγιτιδόκοκκο C. 2007, 45<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Σιθωνία Χαλκιδικής (Δημοσιευμένο στον τόμο πρακτικών του συνεδρίου).
20. Γεωργακοπούλου Θ, **Μένεγας Δ**, Δεδούκου Ξ, Ηλιοδρομίτη Ζ, Καβάκα Ν,

Λάγγας Δ, Μυλωνά Φ, Οικονομάκος Δ, Σταύρου Θ, Μπένος Α, Σπάλα Γ, Αντωνιάδου Ι, Παναγιωτόπουλος Π. Εθνική μελέτη εμβολιασμών 2006: Κάλυψη για ιλαρά-ερυθρά-παρωτίτιδα. 2007, 45<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Σιθωνία Χαλκιδικής (Δημοσιευμένο στον τόμο πρακτικών του συνεδρίου).

21. Σταύρου Θ, Γεωργακοπούλου Θ, Δεδούκου Ξ, Ηλιοδρομίτη Ζ, Καβάκα Ν, Λάγγας Δ, **Μένεγας Δ**, Μυλωνά Φ, Οικονομάκος Δ, Μπένος Α, Σπάλα Γ, Αντωνιάδου Ι, Παναγιωτόπουλος Π. Εθνική μελέτη εμβολιασμών 2006: Κάλυψη για πολιομυελίτιδα. 2007, 45<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Σιθωνία Χαλκιδικής (Δημοσιευμένο στον τόμο πρακτικών του συνεδρίου).
22. Γεωργακοπούλου Θ, Ντάνης Κ, **Μένεγας Δ**, Δεδούκου Ξ, Ηλιοδρομίτη Ζ, Καβάκα Ν, Λάγγας Δ, Μυλωνά Φ, Οικονομάκος Δ, Σταύρου Θ, Μπένος Α, Σπάλα Γ, Αντωνιάδου Ι, Παναγιωτόπουλος Π. Εθνική μελέτη εμβολιασμών, 2006: Εκτίμηση εμβολιαστικής κάλυψης εφήβων. 2008, 7<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Δημόσιας Υγείας και Υπηρεσιών Υγείας, Αθήνα (Δημοσιευμένο στον τόμο πρακτικών του συνεδρίου).
23. Ντάνης Κ, Γεωργακοπούλου Θ, Δεδούκου Ξ, Ηλιοδρομίτη Ζ, Καβάκα Ν, Λάγγας Δ, **Μένεγας Δ**, Μυλωνά Φ, Οικονομάκος Δ, Σταύρου Θ, Μπένος Α, Σπάλα Γ, Αντωνιάδου Ι, Παναγιωτόπουλος Π. Εμβολιαστική κάλυψη σε ειδικές ομάδες του πληθυσμού: Εθνική μελέτη εμβολιασμών, 2006. 2008, 7<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Δημόσιας Υγείας και Υπηρεσιών Υγείας, Αθήνα (Δημοσιευμένο στον τόμο πρακτικών του συνεδρίου).
24. Σταύρου Θ, Ντάνης Κ, Γεωργακοπούλου Θ, Δεδούκου Ξ, Ηλιοδρομίτη Ζ, Καβάκα Ν, Λάγγας Δ, **Μένεγας Δ**, Μυλωνά Φ, Οικονομάκος Δ, Μπένος Α, Σπάλα Γ, Αντωνιάδου Ι, Παναγιωτόπουλος Π. Εμβολιαστική κάλυψη σε ειδικές ομάδες του πληθυσμού: Εθνική μελέτη εμβολιασμών, 2006: Εκτίμηση εμβολιαστικής κάλυψης με το εμβόλιο κατά της ανεμοβλογιάς. 2008, 7<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Δημόσιας Υγείας και Υπηρεσιών Υγείας, Αθήνα (Δημοσιευμένο στον τόμο πρακτικών του συνεδρίου).
25. Λάγγας Δ, Ντάνης Κ, Γεωργακοπούλου Θ, Δεδούκου Ξ, Ηλιοδρομίτη Ζ, Καβάκα Ν, **Μένεγας Δ**, Μυλωνά Φ, Οικονομάκος Δ, Σταύρου Θ, Μπένος Α, Σπάλα Γ, Αντωνιάδου Ι, Παναγιωτόπουλος Π. Εθνική μελέτη εμβολιασμών, 2006: Κάλυψη κατά γεωγραφικό διαμέρισμα. 2008, 7<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Δημόσιας Υγείας και Υπηρεσιών Υγείας, Αθήνα (Δημοσιευμένο στον τόμο πρακτικών του συνεδρίου).

26. Περβανίδου Δ, Πολονύφη Ζ, Παλιούρα Ζ, Γιαννάκη-Ψινάκη Μ, Μεντής Α, Κίκης Γ, Πατρινός Σ, **Μένεγας Δ**, Μπονόβας Σ, Παναγιωτόπουλος Τ. Ο κοκκύτης στην Ελλάδα μέσα από το σύστημα υποχρεωτικής δήλωσης. 2010, 8<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Δημόσιας Υγείας & Υπηρεσιών Υγείας, Αθήνα (Δημοσιευμένο στον τόμο πρακτικών του συνεδρίου).
27. Βερναρδάκη Α, Πούφτα Σ, Περβανίδου Δ, **Μένεγας Δ**, Λαμπροπούλου Σ, Δέτσης Μ, Πίπα Ε, Μαυραγάνης Π, Μέντης Α, Γεωργακοπούλου Θ. Επιδημιολογική επιτήρηση πολιομυελίτιδας – οξείας χαλαρής παράλυσης στην Ελλάδα κατά το διάστημα 2006-2011. 9<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Δημόσιας Υγείας και Υπηρεσιών Υγείας, Αθήνα 26-28 Μαρτίου 2012 (Δημοσιευμένο στον τόμο πρακτικών του συνεδρίου).

### **ΆΛΛΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ**

- **Μένεγας Δ.** Περπατάω μόνο μου στο δρόμο. Μπορώ όμως; Παιδί, Υγεία και Ανατροφή. 2002, Μάρτιος-Μάιος 20; 54-58.
- **Μένεγας Δ.** Ουρολοιμώξεις στα παιδιά. Παιδί, Υγεία και Ανατροφή. 2004, Σεπτέμβριος-Νοέμβριος 30; 106-110.

### **ΕΙΣΗΓΗΣΕΙΣ**

- **Menegas D**, Wood DC. Echocardiographic Assessment of Fetal Arrhythmias. Perinatal Echocardiography Lecture Series, Pennsylvania Hospital, Department of Obstetrics and Gynecology, Section of Perinatal Cardiology, Philadelphia 1995.
- **Μένεγας Δ.** Βιβλιογραφική ενημέρωση με θέμα: "Ίλαρά. Νεότερα δεδομένα για την Ελλάδα και τον υπόλοιπο κόσμο", ΙΥΠ, 6 Ιανουαρίου 2003.
- **Μένεγας Δ.** Βιβλιογραφική ενημέρωση με θέμα: " Σιδηροπενική αναιμία. Διάγνωση Αντιμετώπιση", ΙΥΠ, 12 Ιουνίου 2002.
- **Μένεγας Δ.** Ομιλία με θέμα "Σύστηματα Επιδημιολογικής Επιτήρησης στην Ελλάδα", ΙΥΠ, 21 Απριλίου 2004.
- **Μένεγας Δ.** Βιβλιογραφική ενημέρωση με θέμα: "Διοξίνες και επιπτώσεις στην υγεία", ΙΥΠ, 7 Δεκεμβρίου 2005.
- **Μένεγας Δ.** Βιβλιογραφική ενημέρωση με θέμα: "Επταδύναμο Συζευγμένο Πνευμονιοκοκκικό εμβόλιο", ΙΥΠ, 22 Ιανουαρίου 2006.
- **Μένεγας Δ**, Γεωργακοπούλου Θ. Ομιλία στην ημερίδα που πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της ενημέρωσης για την Πανελλαδική μελέτη

της εμβολιαστικής κάλυψης. Θέμα: "Μελέτη Εμβολιαστικής Κάλυψης και Φυματινικής Διαμόλυνσης στην Ελλάδα, 2005-2006". Ιωάννινα, 8 Φεβρουαρίου 2006.

- **Menegas D.** Ομιλία με θέμα "Iron overload in thalassemia intermedia" στα πλαίσια του διεθνούς μετεκπαιδευτικού σεμιναρίου "Advanced Course on Thalassemia", Αθήνα, 14/9/2006.
- Ξεκαλάκη Α, **Μένεγας Δ.** Ομιλία με θέμα τις πρωτοβουλίες και τις δραστηριότητες του Κέντρου Υγείας του Παιδιού Καισαριανής σε Αιγυπτίους αξιωματούχους από τον τομέα Υγείας και Πρόνοιας του αντίστοιχου Υπουργείου Υγείας, Νοέμβριος 2006.
- **Μένεγας Δ.** Ομιλία στα πλαίσια εκπαιδευτικού σεμιναρίου με θέμα "Περιβάλλον και Υγεία: Σύγχρονα δεδομένα και προγράμματα αγωγής-προαγωγής υγείας στα σχολεία" που απευθυνόταν σε όλους τους εκπαιδευτικούς πρωτοβάθμιας και δευτεροβάθμιας εκπαίδευσης με τη συνεργασία του 4<sup>ου</sup> Γραφείου Δευτεροβάθμιας Εκπαίδευσης και του 6<sup>ου</sup> Γραφείου Πρωτοβάθμιας Εκπαίδευσης Αθηνών με θέμα: "Ανθεκτικοί Οργανικοί Ρυπαντές (POPs)", Καισαριανή, 16 Φεβρουαρίου 2007.
- **Μένεγας Δ.** Ομιλία με θέμα "Συστήματα επιτήρησης ανεπιθύμητων ενεργειών μετά από εμβολιασμό: η διεθνής πρακτική" στα πλαίσια του στρογγυλού τραπέζιου με θέμα "Ανησυχίες του κοινού για την ασφάλεια των εμβολίων και οι απαντήσεις της δημόσιας υγείας" στο 8<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Δημόσιας Υγείας & Υπηρεσιών Υγείας, Αθήνα 15/3/2010.

### **ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ**

**Αγγλικά** : University of Cambridge Certificate of Proficiency in English, December 1982 (Ref. # 226021238).

**Γαλλικά** : Certificat de Langue Francaise. Institut Francais d' Athenes.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στην Α΄ Παιδιατρική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών αρχικά υπό τη διεύθυνση του Ομότιμου Καθηγητή κ<sup>ου</sup> Χρήστου Καττάμη και στη συνέχεια υπό τη διεύθυνση της Ομότιμης Καθηγήτριας Κας Αικατερίνης Μεταξωτού και κατόπιν του Καθηγητού κ<sup>ου</sup> Γεώργιου Χρούσου.

Τον Ομότιμο Καθηγητή κ<sup>ο</sup> Χρήστο Καττάμη θα ήθελα καταρχήν να ευχαριστήσω διότι μου παρείχε τη δυνατότητα εκπόνησης διδακτορικής διατριβής. Με την πολύχρονη εμπειρία του σε θέματα μεσογειακής αναιμίας, βοήθησε στην κατανόηση των ιδιαιτεροτήτων των ασθενών με ενδιάμεση μεσογειακή αναιμία και με την συνεχή υποστήριξη και την πολύτιμη καθοδήγησή του συνέβαλε καθοριστικά στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ<sup>α</sup> Άννα Μεταξωτού-Μαυρομμάτη ευχαριστώ θερμά γιατί μου έδωσε την ευκαιρία να συνεργαστώ μαζί της στην παρακολούθηση των ασθενών με ενδιάμεση μεσογειακή αναιμία στο Εργαστήριο Αιμολυτικών Αναιμιών στο Χωρέμειο Ερευνητικό Εργαστήριο και μου μετέφερε μέρος της πολύχρονης εμπειρίας της.

Τον Αναπληρωτή Καθηγητή Κ<sup>ο</sup> Αντώνη Καττάμη ευχαριστώ ιδιαίτερα γιατί είχε την επίβλεψη της διατριβής, με υποστήριξε σε όλα τα στάδια εκπόνησης της παρούσας διατριβής χαρίζοντας μου απλόχερα την καθοδήγηση και τον πολύτιμο χρόνο του.

Τον Καθηγητή κ<sup>ο</sup> Εμμανουήλ Καναβάκη, Διευθυντή του Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ<sup>α</sup> Joanne Traeger-Συνοδινού και όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής ευχαριστώ για την ουσιαστική προσφορά τους στην μοριακή ανάλυση και το γονοτυπικό χαρακτηρισμό των ασθενών της μελέτης.

Τον κ<sup>ο</sup> Βασίλη Λαδή πρώην Διευθυντή της Μονάδας Μεσογειακής Αναιμίας και την κ<sup>α</sup> Ελένη Μπερδούση πρώην Αναπληρώτρια Διευθύντρια ευχαριστώ ιδιαίτερα γιατί μου προσέφεραν πολύχρονη καθημερινή εμπειρία στην αντιμετώπιση ασθενών με μεσογειακή αναιμία και μου εμπιστεύθηκαν το υλικό των ασθενών που παρακολουθούσαν για μεγάλο χρονικό διάστημα στη Μονάδα Μεσογειακής Αναιμίας.

Τον Κο Ιωάννη Παπασωτηρίου Διευθυντή του Βιοχημικού τμήματος του Νοσοκομείου Παίδων Αγία Σοφία και τον μικροβιολόγο Κο Γιώργο Παλαιολόγο για τη προθυμία και την ουσιαστική συμβολή τους στην εφαρμογή και αξιολόγηση των εργαστηριακών μεθόδων της παρούσας διατριβής.

Τέλος ευχαριστώ την οικογένειά μου, τους γονείς μου που στέκονται πάντα δίπλα μου σε όλη τη ζωή μου, τα παιδιά μου Λευκή και Ελένη για την αισιοδοξία και τη καθημερινή χαρά που μου προσφέρουν και ιδιαίτερα τη σύζυγό μου παιδίατρο κα Θεανώ Γεωργακοπούλου για την ολόψυχη συμπαράσταση, την εξαιρετική βοήθεια και τη σταθερή υποστήριξή της σε όλη τη διάρκεια αυτής της προσπάθειάς μου.

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

### **ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ**

### **ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ**

### **ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ**

### **ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ**

## **ΠΡΟΛΟΓΟΣ** 1

### **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

1.1	Δομή της αιμοσφαιρίνης	4
1.2.	Ερυθροποίηση	8
1.2.1.	Ερυθροποιητίνη	8
1.3.	Μοριακή βάση των διαταραχών της αιμοσφαιρίνης	10
1.3.1.	α-μεσογειακή αναιμία	11
1.3.2.	β-μεσογειακή αναιμία	13
1.3.2.1	Επιδημιολογία της μοριακής βάσης της β-MA	15
1.4	Μεσογειακά σύνδρομα – Γενικές αρχές	18
1.4.1.	Παθοφυσιολογία β-MA	18
1.4.2.	Κλινικοί φαινότυποι β-MA	20
1.4.2.1.	Ετερόζυγη β-MA	20
1.4.2.2.	Ενδιάμεση β-MA	21
1.4.2.3.	Μείζων β-MA	21
1.5.	Συσχέτιση γονότυπου – φαινότυπου στην ενδιάμεση MA	22
1.5.1.	Μεταλλάξεις σιωπηρού τύπου στο β-γονίδιο	23
1.5.2.	Ήπιες μεταλλάξεις στο β γονίδιο	23
1.5.3.	Συνύπαρξη α-MA	24
1.5.4.	δβ-MA	26
1.6.	Επιπλοκές	27

1.6.1.	Υπερφόρτωση με σίδηρο	27
1.6.2	Υπερσπληνισμός	28
1.6.3	Επιπλοκές από το ήπαρ	29
1.6.4.	Επιπλοκές από την καρδιά	30
1.7.	Θεραπεία EMA	32
1.7.1.	Μεταγγίσεις	32
1.7.2	Αποσιδήρωση	33
1.7.3.	Χορήγηση παραγόντων που αυξάνουν την παραγωγή HbF	36
1.7.4.	Ερυθροποιητίνη	37
1.7.5.	Μεταμόσχευση μυελού των οστών	38
1.8.	Μεταβολισμός του σιδήρου	39
1.8.1.	Η βιολογική σημασία του σιδήρου	39
1.8.2.	Κατανομή του σιδήρου στον άνθρωπο	40
1.8.3.	Εντερική απορρόφηση του σιδήρου	41
1.8.4.	Μεταφορά του σιδήρου – Ο κύκλος της τρανσφερρίνης – TfR1	43
1.8.5.	Μη-δεσμευμένος με τρανσφερρίνη σίδηρος	46
1.8.6.	Χρησιμοποίηση και ανακύκλωση του σιδήρου	46
1.8.7	Αποθήκευση	47
1.8.8.	Απέκκριση	49
1.8.9.	Ρύθμιση του μεταβολισμού του σιδήρου	49
1.8.9.1.	Μοριακή ρύθμιση του μεταβολισμού του σιδήρου	49
1.8.9.1.1.	Μετά-μεταγραφική ρύθμιση	49
1.8.9.1.2.	Μεταγραφική ρύθμιση	51
1.8.9.1.3.	Μετά-μεταφραστική ρύθμιση	52
1.8.9.2.	Πρωτεΐνες με ρυθμιστικό ρόλο στο μεταβολισμό του σιδήρου	52



1.8.9.2.1.	HFE	52
1.8.9.2.2.	TfR2	54
1.8.9.2.3.	Εψιδίνη	54
1.8.9.2.4.	Hemojuvelin	58

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

2.	Σκοπός	60
3.	Υλικό	61
4.	Μεθοδολογία	62
4.1.	Κλινική μελέτη	62
4.2.	Αιματολογική μελέτη	62
4.3.	Βιοχημική μελέτη	64
4.4.	Μοριακή μελέτη	65
4.5.	Στατιστική ανάλυση	65
5.	Αποτελέσματα	67
5.1.	Κλινική Ταξινόμηση ασθενών	67
5.2.	Μοριακή μελέτη α και β μεταλλάξεων	69
5.3.	Αιματολογικός έλεγχος ασθενών στη διάγνωση	71
5.4.	Κλινικά ευρήματα	75
5.5.	Μεταγγίσεις	78
5.6.	Βιοχημικός έλεγχος αιμοσιδήρωσης	81
5.7.	Έλεγχος αιμοσιδήρωσης με μαγνητική τομογραφία	87
5.7.1	Ηπατικός σίδηρος	88
5.7.2.	Καρδιακός σίδηρος	92
5.8.	Τροποποιητικοί παράγοντες	94
5.8.1	Ηλικία	94
5.8.2	Γονότυπος- Αιματολογικός φαινότυπος	96

5.8.3	Σπληνεκτομή	98
5.8.4.	Ερυθροποίηση	101
5.8.5.	HbF	103
5.8.6.	Συγγενής αιμοχρωμάτωση	104
6.	Θεραπεία	106
7.	Συζήτηση	119
8.	Συμπεράσματα	127
	Περίληψη	130
	Summary	132
	Βιβλιογραφία	134

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1:	Αιμοσφαιρίνες του ανθρώπου	7
Πίνακας 2:	Γενική κατάταξη γενετικών διαταραχών της αιμοσφαιρίνης	10
Πίνακας 3:	Μοριακή ανάλυση >500 ασθενών με β-MA	17
Πίνακας 4:	Οι συχνές γενετικές αλληλεπιδράσεις που προσδιορίζουν τον φαινότυπο της ενδιάμεσης β-MA	22
Πίνακας 5:	Συνοπτικά κριτήρια για την ταξινόμηση ασθενών με ενδιάμεση β-MA	61
Πίνακας 6:	Προκαθορισμένα παράθυρα από τον κατασκευαστή για το σύστημα Variant	63
Πίνακας 7:	Παρούσα ηλικία και ηλικία διάγνωσης των ασθενών σε σχέση με τις μεταγγίσεις	67
Πίνακας 8:	Παρούσα ηλικία και ηλικία διάγνωσης των ασθενών σε σχέση με τον κλινικό φαινότυπο	68
Πίνακας 9:	Είδος και συχνότητα μεταλλάξεων στο σύμπλεγμα β γονιδίων των ασθενών της μελέτης και σύγκριση με ασθενείς με μείζονα MA	70
Πίνακας 10:	Αιματολογικός έλεγχος των ασθενών σε σχέση με τις μεταγγίσεις	72
Πίνακας 11:	Αιματολογικός έλεγχος των ασθενών σε σχέση με τον κλινικό φαινότυπο	73
Πίνακας 12:	Ποσοστά HbF, HbA και HbA2 ανά αιματολογικό φαινότυπο των ασθενών	74
Πίνακας 13:	Συνοπτική καταγραφή κλινικών ευρημάτων στους ασθενείς της μελέτης	76
Πίνακας 14:	Συσχέτιση μεταγγίσεων με τον αιματολογικό φαινότυπο των ασθενών της μελέτης	79
Πίνακας 15:	Συσχέτιση μεταγγίσεων με το γονότυπο των ασθενών	80
Πίνακας 16:	Επίπεδα φερριτίνης, σιδήρου, ολικής σιδηροδεσμευτικής ικανότητας (TIBC) κορεσμού τρανσφερρίνης και NTBI των ασθενών της μελέτης σε σχέση με τις μεταγγίσεις	82

Πίνακας 17:	Επίπεδα φερριτίνης, σιδήρου, ολικής σιδηροδεσμευτικής ικανότητας (ΤΙΒC) κορεσμού τρανσφερρίνης και ΝΤΒΙ των ασθενών της μελέτης σε σχέση με τον κλινικό φαινότυπο	83
Πίνακας 18:	Επίπεδα φερριτίνης, ηπατικού και μυοκαρδιακού T2*, LIC και LVEF των ασθενών σε σχέση με τις μεταγγίσεις	87
Πίνακας 19:	Παράμετροι υπερφόρτωσης σιδήρου σε σχέση με τον αιματολογικό φαινότυπο σε αμετάγγιστους ασθενείς με ΕΜΑ	97
Πίνακας 20:	Παράμετροι υπερφόρτωσης σιδήρου σε σχέση με τη διενέργεια σπληνεκτομής σε αμετάγγιστους ασθενείς με ΕΜΑ	99
Πίνακας 21:	Επίπεδα sTfR και ΕΡΟ των ασθενών σε σχέση με τις μεταγγίσεις	101
Πίνακας 22:	Τιμές παραμέτρων αιμοσιδήρωσης σε σχέση με την ύπαρξη ΗFΕ μεταλλάξεων σε ασθενείς ηλικίας ≤30 ετών	104
Πίνακας 23:	Παράμετροι αιμοσιδήρωσης πριν και μετά από τη χορήγηση Deferasirox	107

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1:	Τρισδιάστατη ταινιοειδής απεικόνιση της δομής της αιμοσφαιρίνης και χημική δομή των μορίων της αίμης	4
Σχήμα 2:	Η καμπύλη αποδέσμευσης οξυγόνου της αιμοσφαιρίνης του ενήλικα.	6
Σχήμα 3:	Σχηματική απεικόνιση των αυξητικών παραγόντων που επηρεάζουν την ερυθροποίηση.	9
Σχήμα 4:	Το σύμπλεγμα των α γονιδίων στο χρωμόσωμα 16	11
Σχήμα 5:	Σχηματική αναπαράσταση της δομής των α γονιδίων σε διάφορες μορφές της α-MA	12
Σχήμα 6:	Το σύμπλεγμα των α γονιδίων στο χρωμόσωμα 11	13
Σχήμα 7:	Δομή των γονιδίων των αλυσίδων αιμοσφαιρίνης	14
Σχήμα 8:	Παγκόσμια κατανομή των πιο κοινών μεταλλάξεων β-μεσογει-ακής αναιμίας. Η υπογράμμιση δηλώνει ήπια μετάλλαξη.	16
Σχήμα 9:	Παθοφυσιολογία της β-MA. Επίπεδα δράσης (πρωτογενές, δευτερογενές, τριτογενές) των παραγόντων που επηρεάζουν το φαινότυπο	19
Σχήμα 10:	Σιωπηρές μεταλλάξεις στο β γονίδιο	23
Σχήμα 11:	Κατανομή σιδήρου στους ενήλικες	40
Σχήμα 12:	Οδοί απορρόφησης του σιδήρου στο εντεροκύτταρο.	42
Σχήμα 13:	Κρυσταλλική δομή Tf	43
Σχήμα 14:	Κρυσταλλική δομή TfR	44
Σχήμα 15:	Σχηματική παράσταση του κύκλου της τρανσφερρίνης-TfR1	45
Σχήμα 16:	Η δομή του μορίου της φερριτίνης	48
Σχήμα 17:	Ρύθμιση της κυτταρικής ομοιοστασίας του σιδήρου από τις IRP51	
Σχήμα 18:	Η πρωτεΐνη HFE	53
Σχήμα 19:	Εψιδίνη και αιμοχρωμάτωση	56
Σχήμα 20:	Μοντέλο των οδών που συμμετέχουν στη ρύθμιση της εψιδίνης.	57

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1:	Γραμμική συσχέτιση παραμέτρων αιμοσιδήρωσης σε σχέση με τις μεταγγίσεις σε ασθενείς με EMA	84
Διάγραμμα 2:	Γραμμική συσχέτιση του NTBI και του κορεσμού τρανσφερρίνης	85
Διάγραμμα 3:	Γραμμική συσχέτιση του NTBI με: α) τον φυσικό λογάριθμο ( $\ln$ ) της φερριτίνης και β) το σίδηρο, σε σχέση με τις μεταγγίσεις σε ασθενείς με EMA	86
Διάγραμμα 4:	Box plot του LIC ανάλογα με τις μεταγγίσεις	88
Διάγραμμα 5:	Καμπύλη συσχέτισης ηπατικού T2* και LIC	89
Διάγραμμα 6:	Γραμμική συσχέτιση ηπατικού T2* και LIC	89
Διάγραμμα 7:	Γραμμική συσχέτιση φερριτίνης και α) ηπατικού T2* και β) LIC	90
Διάγραμμα 8:	Γραμμική συσχέτιση NTBI και α) Ηπατικού T2* και β) LIC	91
Διάγραμμα 9:	Συσχέτιση καρδιακού T2* με το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας (LVEF)	92
Διάγραμμα 10:	Συσχέτιση καρδιακού T2* και ηπατικού T2*	93
Διάγραμμα 11:	Γραμμική συσχέτιση της τιμής φερριτίνης και της ηλικίας των ασθενών	94
Διάγραμμα 12:	Γραμμική συσχέτιση της τιμής σιδήρου και της ηλικίας των ασθενών	95
Διάγραμμα 13:	Γραμμική συσχέτιση του κορεσμού τρανσφερρίνης και της ηλικίας των ασθενών	95
Διάγραμμα 14:	Box plot α) φερριτίνης, β) κορεσμού τρανσφερρίνης γ) σιδήρου και δ) NTBI σε σχέση με τη διενέργεια σπληνεκτομής σε αμετάγγιστους ασθενείς με EMA	100
Διάγραμμα 15:	Γραμμική συσχέτιση ερυθροποιητίνης και αιμοσφαιρίνης σε αμετάγγιστους ασθενείς με EMA	102
Διάγραμμα 16:	Γραμμική συσχέτιση sTfR και NTBI σε μεταγγισμένους ασθενείς με EMA	102
Διάγραμμα 17:	Γραμμική συσχέτιση φερριτίνης και HbF	103

Διάγραμμα 18:	box plot α) φερριτίνης, β) κορεσμού τρανσφερρίνης γ) TIBC και δ) NTBI σε σχέση με τις μεταλλάξεις του HFE γονιδίου	105
Διάγραμμα 19:	Διαχρονικές τιμές φερριτίνης αμετάγγιστων ασθενών με EMA μετά από θεραπεία με Deferasirox	109
Διάγραμμα 20:	Διαχρονικές τιμές φερριτίνης μεταγγισμένων ασθενών με EMA μετά από θεραπεία με Deferasirox	109
Διάγραμμα 21:	Διαχρονική μεταβολή της τιμής της φερριτίνης σε αμετάγγι- στους ασθενείς με EMA μετά από θεραπεία με Deferasirox	110
Διάγραμμα 22:	Διαχρονική μεταβολή της τιμής του LIC σε αμετάγγιστους ασθενείς με EMA μετά από θεραπεία με Deferasirox	111
Διάγραμμα 23:	Διαχρονικές τιμές LIC αμετάγγιστων ασθενών με EMA μετά από θεραπεία με Deferasirox	113
Διάγραμμα 24:	Διαχρονικές τιμές LIC μεταγγισμένων ασθενών με EMA μετά από θεραπεία με Deferasirox	113
Διάγραμμα 25:	Διαχρονικές τιμές ηπατικού T2* αμετάγγιστων ασθενών με EMA μετά από θεραπεία με Deferasirox	114
Διάγραμμα 26:	Διαχρονικές τιμές ηπατικού T2* μεταγγισμένων ασθενών με EMA μετά από θεραπεία με Deferasirox	114
Διάγραμμα 27:	Διαχρονική μεταβολή της τιμής του καρδιακού T2* σε αμε- τάγγιστους ασθενείς μετά από θεραπεία με Deferasirox	115
Διάγραμμα 28:	Εξέλιξη καρδιακού T2* αμετάγγιστων ασθενών με EMA μετά από θεραπεία με Deferasirox	116
Διάγραμμα 29:	Εξέλιξη καρδιακού T2* μεταγγισμένων ασθενών με EMA μετά από θεραπεία με Deferasirox.	116
Διάγραμμα 30:	Εξέλιξη LVEF αμετάγγιστων ασθενών με EMA μετά από θεραπεία με Deferasirox	118
Διάγραμμα 31:	Εξέλιξη LVEF μεταγγισμένων ασθενών με EMA μετά από θεραπεία με Deferasirox	118



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

FDA	Food and Drug Administration (ΗΠΑ)
EF	κλάσμα εξώθησης
EMA	ενδιάμεση μεσογειακή αναιμία
Fe	σίδηρος
HU	υδροξυουρία
IRP	σιδηρορυθμιστικές πρωτεΐνες
LIC	συγκέντρωση σιδήρου στο ήπαρ
MA	μεσογειακή αναιμία
MMO	μεταμόσχευση μυελού των οστών
NTBI	μη-δεσμευμένος με τρανσφερρίνη σίδηρος
TIBC	ολική σιδηροδεσμευτική ικανότητα
SF	κλάσμα βράχυνσης
sTfR	διαλυτός υποδοχέας τρανσφερρίνης
Tf	τρανσφερρίνη
TfR	υποδοχέας τρανσφερρίνης

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τα μεσογειακά σύνδρομα είναι μια ετερογενής ομάδα αυτοσωματικών κληρονομικών διαταραχών που προκαλούν κυρίως ποσοτική αλλά και ποιοτική διαταραχή στη σύνθεση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων της αιμοσφαιρίνης. Η διαταραχή της σύνθεσης της α-αλυσίδας της αιμοσφαιρίνης οδηγεί σε α-μεσογειακή αναιμία (α-MA) ενώ η διαταραχή της σύνθεσης της β-αλυσίδας σε β-μεσογειακή αναιμία (β-MA) η οποία χαρακτηρίζεται ως (β<sup>+</sup>)-MA όταν οφείλεται σε μερική αναστολή της σύνθεσης β-αλυσίδων και ως (β<sup>0</sup>)-MA όταν οφείλεται σε ολική αναστολή της σύνθεσης β-αλυσίδων.

Η διαφορετικού βαθμού αναστολή της σύνθεσης των β-αλυσίδων στη β-MA έχει σαν συνέπεια τη διαταραχή της ισορροπίας σύνθεσης των α και β αλυσίδων της αιμοσφαιρίνης μέσα στο ερυθρό αιμοσφαίριο. Η περίσσεια α-αλυσίδων που προκαλείται δημιουργεί ιδιαίτερα ασταθή τετραμερή μόρια που κατακρημνίζονται στους ερυθροβλάστες και τα ερυθροκύτταρα με βλαβερές επιπτώσεις τόσο στην ωρίμανση των ερυθρών αιμοσφαιρίων όσο και στην επιβίωσή τους. Το γεγονός αυτό που χαρακτηρίζεται ως μη αποδοτική ερυθροποίηση, κατέχει τον πιο σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της νόσου και οδηγεί σε αναιμία η βαρύτητα της οποίας φαίνεται να επηρεάζεται σημαντικά από το βαθμό της περίσσειας των α-αλυσίδων (Weatherall & Clegg, 2001).

Η μελέτη της αιμοσφαιρίνης ακολούθησε μια μακρά εξελικτική πορεία με σημαντικούς σταθμούς. Πρώτα περιγράφηκε το 1910 η κλινική εικόνα της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας και ακολούθησε το 1949 αρχικά από τον Pauling και στη συνέχεια τον Ingram η ανακάλυψη ότι η HbS διαφέρει από την φυσιολογική HbA λόγω μιας δομικής διαταραχής, την αντικατάσταση ενός αμινοξέος της πρωτεϊνικής αλυσίδας. Αργότερα, το 1925 πρωτοπεριγράφηκε η κλινική εικόνα της μεσογειακής αναιμίας σχεδόν ταυτόχρονα από τους Cooley και Lee στις ΗΠΑ και τους Rietti, Greppi και Michaeli στην Ιταλία. Στη δεκαετία του 1940 ο Καμινόπετρος στην Ελλάδα και ο Neel στις ΗΠΑ έδειξαν ότι η MA κληρονομείται με αυτοσωματικό υπολειπόμενο τρόπο. Τέλος, στα μέσα της δεκαετίας του 50 ανακαλύφθηκε η πρωτεϊνική δομή του μορίου της αιμοσφαιρίνης που αποτελείται από δυο α και δυο β πολυπεπτιδικές αλυσίδες όπου η κάθε αλυσίδα συνδέεται με ένα μόριο αίμης. Τα τελευταία 30 και πλέον χρόνια έχει επιτευχθεί σημαντική πρόοδος στην κατανόηση της β-MA τόσο σε επίπεδο παθολογικής φυσιολογίας όσο και σε

επίπεδο μοριακής δομής όπου βρέθηκε ότι οι υπεύθυνες γενετικές βλάβες είναι στο μεγαλύτερο ποσοστό σημειακές μεταλλάξεις.

Η ενδιάμεση μεσογειακή αναιμία (EMA) είναι ένας κλινικός ορισμός, που πρωτοχρησιμοποιήθηκε από τον Sturgeon (1955) για την περιγραφή ασθενών ενδιάμεσης κλινικής βαρύτητας με φαινότυπο που κινείται μεταξύ των ασυμπτωματικών φορέων και των μεταγγισοεξαρτώμενων με μείζονα MA (Camaschella & Cappellini, 1995). Η σημαντικού βαθμού κλινική ετερογένεια της EMA είναι αποτέλεσμα αντίστοιχης μοριακής ετερογένειας αλλά και παρουσίας επιπρόσθετων ρυθμιστικών παραγόντων. Τα τελευταία χρόνια έχει συντελεστεί σημαντική πρόοδος στην κατανόηση της μοριακής και παθοφυσιολογικής βάσης των ενδιάμεσων μορφών της MA. Σε αντίθεση με τη μείζονα β-MA στην οποία η υπερφόρτωση με σίδηρο είναι βασικό επακόλουθο των μεταγγίσεων, στην EMA η αιμοσιδήρωση είναι, κυρίως, αποτέλεσμα αυξημένης εντερικής απορρόφησης σιδήρου (Origa et al, 2007).

Στα πλαίσια της καλύτερης αντιμετώπισης των ασθενών με EMA, σημαντικά σημεία αποτελούν:

1. Ο καθορισμός του επιπέδου αιμοσιδήρωσης των ασθενών με EMA με τη ποικιλομορφία των μεταλλάξεων που ανευρίσκονται στον Ελλαδικό χώρο
2. Η μελέτη της συσχέτισης μεταξύ της βαρύτητας του κλινικού φαινότυπου και του βαθμού αιμοσιδήρωσης
3. Η διερεύνηση της επίδρασης άλλων παραγόντων στη διαμόρφωση του βαθμού αιμοσιδήρωσης
4. Η διερεύνηση αποτελεσματικής θεραπείας αποσιδήρωσης αυτών των ασθενών

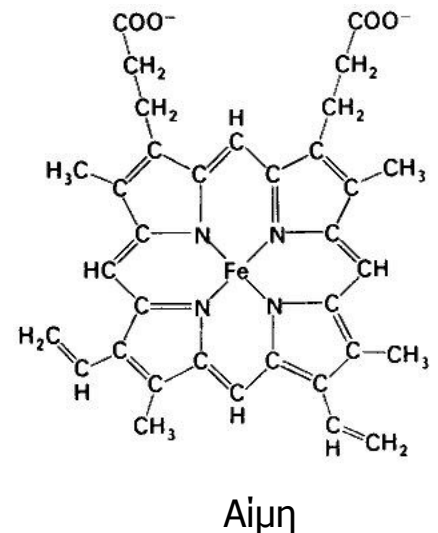
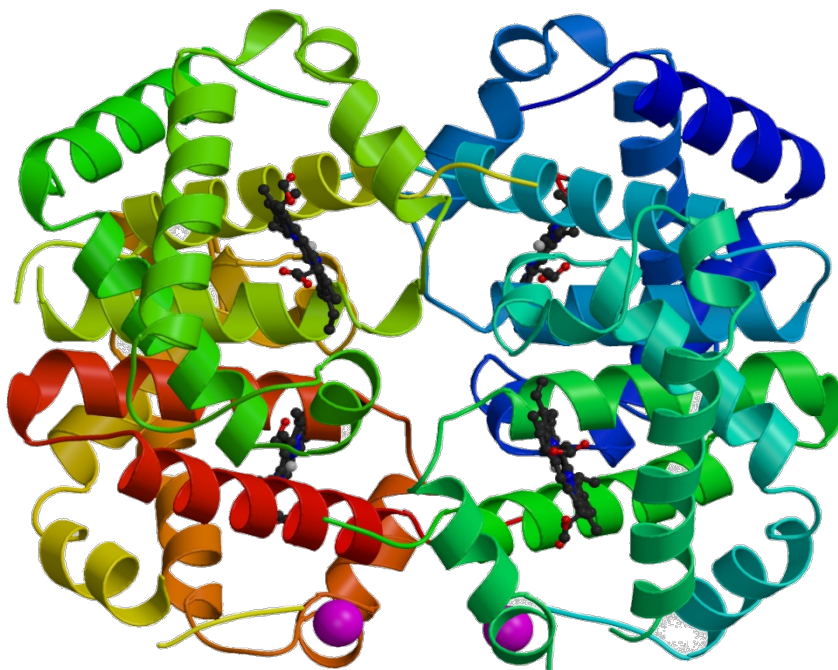
Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης αναμένεται να βοηθήσει στον καλύτερο προσδιορισμό και παρακολούθηση του φορτίου σιδήρου στους ασθενείς με EMA και στην εφαρμογή αποτελεσματικής θεραπείας αποσιδήρωσης.

# **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## Δομή της αιμοσφαιρίνης

Η βασική πρωτεϊνική δομή της Hb αποτελείται από δυο ζεύγη πολυπεπτιδικών αλυσίδων όπου η κάθε αλυσίδα συνδέεται με ένα μόριο αίμης. Το ένα ζεύγος προέρχεται από την ομάδα των α-αλυσίδων ενώ το άλλο από την ομάδα των μη-α. Στην πρώτη ομάδα ανήκουν η α- και η ζ- αλυσίδα ενώ στη δεύτερη οι ε-, γ-, δ- και β- αλυσίδες.

Τα  $\frac{3}{4}$  των πολυπεπτιδικών αλυσίδων του μορίου της αιμοσφαιρίνης έχουν την μορφή μιας α έλικας. Στις περιοχές που διακόπτεται η ελικοειδής δομή, οι αλυσίδες μπορεί να στρέφονται σε γωνία πράγμα που τους δίνει την δυνατότητα να διπλώνονται και παίρνουν τη συμπαγή μορφή που χαρακτηρίζει το τετραμερές μόριο. Κάθε υποομάδα έχει παρεμφερή τρισδιάστατη δομή. Αναγνωρίζονται 8 ελικοειδείς περιοχές (με γράμματα A-H) στη β αλυσίδα και ανάλογες στην α αλυσίδα με μόνη διαφορά ότι λείπουν τα υπολείμματα της D έλικας. Τα μόρια της αίμης (φεροπρωτοπορφυρίνη IX) βρίσκονται σε σχισμές της επιφάνειας των υποομάδων της αιμοσφαιρίνης ανάμεσα στις έλικες E και F. Το άτομο του σιδήρου (Fe) βρίσκεται στο κέντρο του πορφυρινικού δακτυλίου (Σχήμα 1).

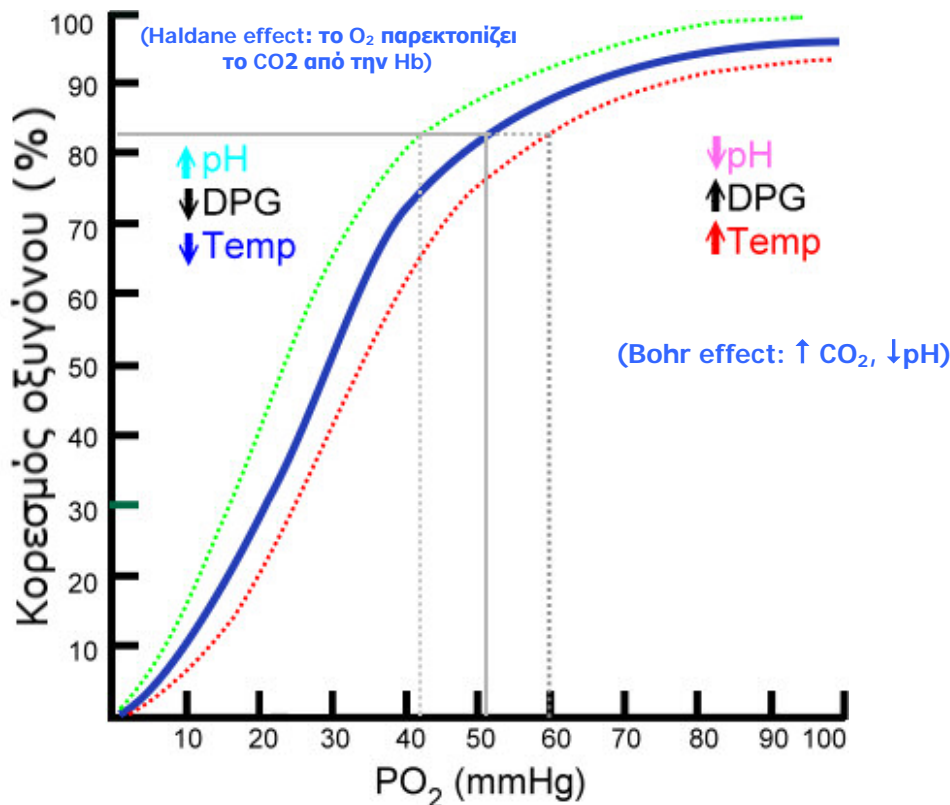


Σχήμα 1: Τρισδιάστατη ταινιοειδής απεικόνιση της δομής της αιμοσφαιρίνης και χημική δομή των μορίων της αίμης.

Η κύρια λειτουργία της αιμοσφαιρίνης είναι η μεταφορά οξυγόνου από τους πνεύμονες στους ιστούς και η ανταλλαγή του με  $\text{CO}_2$  που στη συνέχεια αποδίδεται στους πνεύμονες. Κάθε μόριο αιμοσφαιρίνης μπορεί να μεταφέρει έως 4 μόρια οξυγόνου. Η αιμοσφαιρίνη μπορεί να βρίσκεται σε 2 καταστάσεις: όξυ-αιμοσφαιρίνη (κορεσμένη με οξυγόνο) και δεόξυ-αιμοσφαιρίνη (μη συνδεδεμένη με οξυγόνο) χωρίς κάποια σταθερή ενδιάμεση μορφή (Perutz, 1980). Η οξυαιμοσφαιρίνη έχει μεγαλύτερη χημική συγγένεια με το οξυγόνο σε σχέση με τη δεοξυαιμοσφαιρίνη που έχει μεγαλύτερη χημική συγγένεια με το  $\text{CO}_2$ . Έτσι το οξυγόνο συνδέεται με την οξυαιμοσφαιρίνη στους πνεύμονες, μεταφέρεται στους ιστούς όπου απελευθερώνεται στη μυοσφαιρίνη που το μεταφέρει στα μιτοχόνδρια για να χρησιμοποιηθεί στην αερόβια αναπνοή. Στη θέση του  $\text{O}_2$  η δεοξυαιμοσφαιρίνη προσλαμβάνει 2 πρωτόνια και 2 μόρια  $\text{CO}_2$  και επιστρέφει στους πνεύμονες όπου το  $\text{CO}_2$  αποβάλλεται με την εκπνοή (Perutz, 1978).

Η καμπύλη αποδέσμευσης του οξυγόνου από την αιμοσφαιρίνη έχει σχήμα σιγμοειδές. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι μπορεί να συνδέει και να απελευθερώνει μεγάλες ποσότητες οξυγόνου σε απάντηση σχετικά μικρών διαφορών της μερικής πίεσης. Πολλοί παράγοντες ρυθμίζουν την πρόσληψη του οξυγόνου αλλά ένας από τους σημαντικότερους είναι η ίδια η συνεργασία των μορίων της αίμης. Η οξυγόνωση ενός μορίου αίμης αυξάνει τη χημική συγγένεια των υπολοίπων έτσι ώστε να διευκολύνεται ο πλήρης κορεσμός της οξυαιμοσφαιρίνης και αντίστροφα ο αποκορεσμός της δεοξυαιμοσφαιρίνης. Έτσι η αιμοσφαιρίνη είναι μια αλλοστερική πρωτεΐνη: η πρόσληψη του  $\text{O}_2$  σε ένα σημείο διευκολύνει τη σύνδεση του και σε άλλα. Η δέσμευση του  $\text{O}_2$  ρυθμίζεται επίσης και από χημικούς παράγοντες που περιλαμβάνουν μικρές αλλαγές στο pH (Bohr effect), τη συγκέντρωση ενδοκυττάρων ιόντων  $\text{Cl}^-$ , το  $\text{CO}_2$ , τη σύνδεση μικρών μορίων όπως το 2,3-DPG (Σχήμα 2)

Οι δυο ομάδες πολυπεπτιδικών αλυσίδων κωδικοποιούνται στο επίπεδο του DNA από δύο αντίστοιχες ομάδες γονιδίων (Antonarakis et al, 1985; Stamatoyannopoulos & Grosfeld, 2001). Η ομάδα των α γονιδίων και συγκεκριμένα το ζ γονίδιο και τα  $\alpha_1$  και  $\alpha_2$  γονίδια εδράζονται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 16. Τα μη α-γονίδια (ένα ε, δυο γ το  $^G\gamma$  και  $^A\gamma$ , ένα δ και ένα β) βρίσκονται συγκεντρωμένα στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 11 (Maniatis et al, 1980).



**Σχήμα 2:** Η καμπύλη αποδέσμευσης οξυγόνου της αιμοσφαιρίνης του ενήλικα.

Οι κωδικοποιούσες περιοχές του DNA μεταγράφονται σε mRNA (αγγελιοφόρο RNA) που μεταφέρει στο κυτταρόπλασμα το μήνυμα για την αλληλουχία των αμινοξέων που συνθέτουν τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Στους ανθρώπινους ερυθροποιητικούς ιστούς υπάρχει ρύθμιση της μεταγραφής του DNA σε mRNA ανάλογα με το στάδιο της ανάπτυξης, με αποτέλεσμα να είναι διαφορετικό το προφίλ των αλυσίδων που συντίθενται στην εμβρυϊκή και την ενήλικη ζωή. Οι παράγοντες που δραστηριοποιούνται στην οντογονική διαφοροποίηση της ερυθροποίησης δεν είναι ακριβώς γνωστοί (Wood & Weatherall, 1983; Grosveld et al, 1993; Wood, 1993; Orkin, 1995; Stamatoyannopoulos & Grosveld, 2001). Θεωρείται ότι ο βασικότερος μηχανισμός είναι ένα "εγγενές βιολογικό ρολόι" των κυττάρων της ερυθράς σειράς ενώ δευτερεύοντα ρόλο παίζουν το ορμονικό και βιολογικό περιβάλλον. Αξιοσημείωτο είναι ότι η ακολουθία της τοποθέτησης των γονιδίων κατά μήκος του χρωμοσώματος ταυτίζεται με την διαδοχική τους εκφραστικότητα



κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης (Stamatoyannopoulos & Grosveld, 2001).

Τους 3 πρώτους μήνες της εμβρυϊκής ζωής εκφράζονται οι αιμοσφαιρίνες Portland ( $\zeta_2\gamma_2$ ), Gower I ( $\zeta_2\varepsilon_2$ ) και Gower II ( $\alpha_2\varepsilon_2$ ). Στη μετέπειτα εμβρυϊκή ζωή και τους πρώτους μήνες μετά τη γέννηση κυριαρχεί η εμβρυϊκή HbF με δυο  $\alpha$  και δυο  $\gamma$  αλυσίδες ( $\alpha_2\gamma_2$ ) της οποίας τα επίπεδα προοδευτικά μειώνονται και φυσιολογικά φτάνουν τα επίπεδα του ενήλικου με το τέλος του πρώτου έτους. Κατά την εμβρυϊκή ζωή η αναλογία  $^G\gamma:A\gamma$  είναι 3:1 στον ενήλικα όμως αντιστρέφεται και φτάνει το 2:3 (Schroeder, 1980). Κατά την ενήλικη ζωή κυρίαρχη είναι η έκφραση της αιμοσφαιρίνης A που αποτελείται από ζεύγη  $\alpha$  και  $\beta$  αλυσίδων ( $\alpha_2\beta_2$ ). Σε μικρό ποσοστό ανευρίσκονται η HbA<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ) μέχρι 3,5% και η HbF μέχρι 2% (Πίνακας 1)

Πίνακας 1: Αιμοσφαιρίνες του ανθρώπου			
Στάδιο Ανάπτυξης	Αιμοσφαιρίνη	Δομή	Ποσοστό (%) στον ενήλικο
Εμβρυονικό	Gower I	$\zeta_2\varepsilon_2$	—
	Gower II	$\alpha_2\varepsilon_2$	—
	Portland	$\zeta_2\gamma_2$	—
Εμβρυϊκό	F	$\alpha_2\gamma_2$	<2
Ενήλικου	A	$\alpha_2\beta_2$	96-97
	A <sub>2</sub>	$\alpha_2\delta_2$	2-3

## Ερυθροποίηση

Ο ενήλικας έχει κατά μέσο όρο 5 λίτρα αίματος και αριθμό ερυθροκυττάρων  $5 \times 10^6$ /μλ. Η μέση διάρκεια ζωής του ερυθροκυττάρου είναι φυσιολογικά 120 ημέρες και επομένως για τη διατήρηση αυτής της δεξαμενής πρέπει να παράγονται  $2 \times 10^{11}$  νέα ερυθροκύτταρα ημερησίως. Για την επίτευξη αυτού του στόχου περίπου 2-30% των αρχέγονων κυττάρων του μυελού διαφοροποιούνται σε ερυθροποιητικά κύτταρα. Στην διαδικασία της ωρίμανσης των ερυθροκυττάρων από την προερυθροβλάστη παίζουν ρυθμιστικό ρόλο ορισμένοι παράγοντες. Ο σημαντικότερος από αυτούς είναι ο βαθμός οξυγόνωσης των ιστών. Στους υπόλοιπους περιλαμβάνονται η επάρκεια βιταμίνης B12, φυλλικού οξέως και σιδήρου και η δράση της ερυθροποιητίνης που ρυθμίζεται από το βαθμό οξυγόνωσης (Israel & Israel, 2003; Molineux, 2003).

### Ερυθροποιητίνη

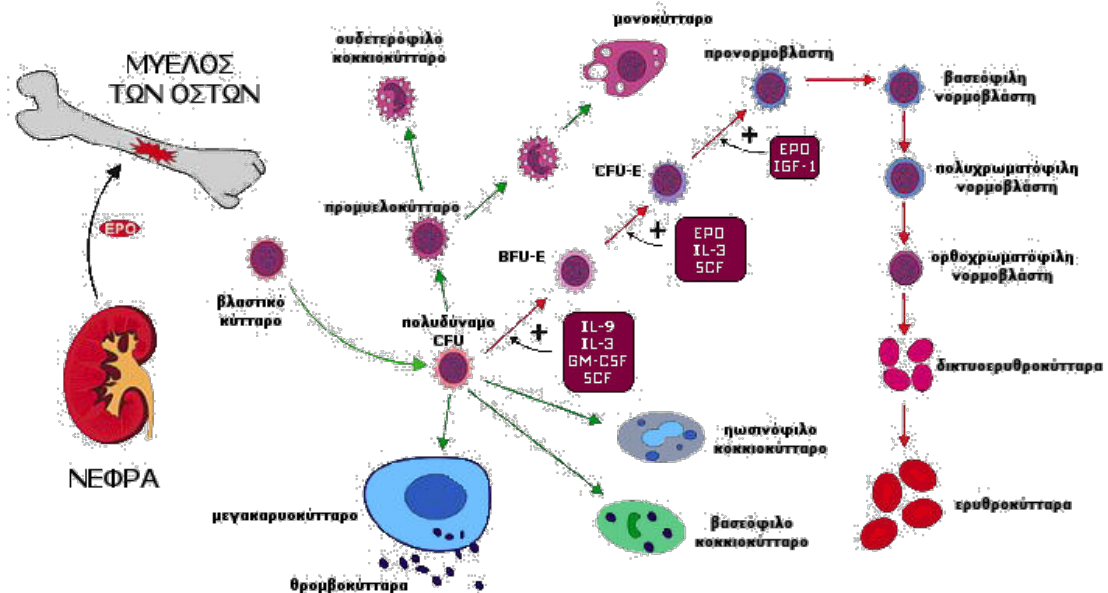
Η ερυθροποιητίνη (EPO) είναι μια γλυκοπρωτεϊνική ορμόνη με μοριακό βάρος 30,4 kDa. Αποτελείται από έναν πεπτιδικό πυρήνα 165 αμινοξέων που χρησιμεύει για την σύνδεσή της με υποδοχέα και την *in vitro* επαγωγή της ερυθροποίησης και 4 αλυσίδες υδρογονανθράκων (περίπου 40% του μορίου) που απαιτούνται για την *in vivo* επιβίωση της ορμόνης. Κατά την εμβρυϊκή περίοδο η EPO παράγεται στα ηπατοκύτταρα ενώ μετά τη γέννηση σχεδόν όλη η ποσότητα που κυκλοφορεί προέρχεται από τα περιωληναριακά διάμεσα κύτταρα του νεφρικού φλοιού (Israel & Israel, 2003; Jelkmann, 2004).

Τα επίπεδα της EPO στον ορό εξαρτώνται από το ρυθμό παραγωγής και κάθαρσής της. Η παραγωγή επάγεται κυρίως από την ιστική υποξία αποτέλεσμα συνήθως αναιμίας, μείωσης της αρτηριακής  $pO_2$  (πχ σε υψηλό υψόμετρο) ή καταστάσεων αυξημένης χημικής συγγένειας της αιμοσφαιρίνης για το οξυγόνο. Η έκφραση του γονιδίου της EPO ελέγχεται από παράγοντες που υποκινούνται από την υποξία (HIF- hypoxia inducible factors) και κυρίως τον HIF-1. Φαίνεται ότι δεν αποθηκεύεται στους νεφρούς μιας και τα επίπεδά της στον ορό δεν αυξάνουν ιδιαίτερα παρά μετά από 2 ώρες από την εμφάνιση υποξίας. Η κάθαρσή της γίνεται από το ήπαρ και τους νεφρούς αν και επιστημονικά

δεδομένα συνηγορούν υπέρ του ότι η EPO φεύγει από τη κυκλοφορία του αίματος μετά από πρόσληψη στα ερυθροκύτταρα ή άλλα κύτταρα που έχουν τον ειδικό υποδοχέα (Jelkmann, 2004).

Όταν η EPO φθάσει στον μυελό των οστών συνδέεται με ειδικούς υποδοχείς στα CFU-E προγονικά κύτταρα της ερυθράς σειράς και επάγει τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την ωρίμανση τους μέσω της νορμοβλάστης σε δικτυοερυθροκύτταρα και σε ώριμα ερυθροκύτταρα ενώ αποτρέπει την απόπτωσή τους (Fisher, 2003; Israel & Israel, 2003) (Σχήμα 3).

Σε αναιμίες όπως οι αιμοσφαιρινοπάθειες ανευρίσκονται αυξημένα επίπεδα EPO.



Σχήμα 3: Σχηματική απεικόνιση των αυξητικών παραγόντων που επηρεάζουν την ερυθροποίηση.

## Μοριακή βάση των διαταραχών της αιμοσφαιρίνης

Οι γενετικές διαταραχές της αιμοσφαιρίνης μπορούν να ταξινομηθούν ευρέως σε 3 αλληλοεπικαλυπτόμενες κατηγορίες (Πίνακας 2): 1/ σε παραλλαγές της αιμοσφαιρίνης λόγω κάποιας δομικής αλλαγής σε μια από τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, 2/ σε Μεσογειακή αναιμία όπου έχουμε διαταραχή της παραγωγής φυσιολογικών αλυσίδων και 3/ μια ομάδα διαταραχών με το γενικό όνομα κληρονομική παραμονή εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης (H<sub>2</sub>FH), όπου παρατηρείται μια διαταραχή στην εξελικτική μετάβαση της παραγωγής από εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη σε αιμοσφαιρίνη ενηλίκου.

Η δυνατότητα καθορισμού της μοριακής διαταραχής των Μεσογειακών συνδρόμων επετεύχθη με την εφαρμογή των μοριακών μεθόδων μελέτης του DNA.

### Πίνακας 2: Γενική κατάταξη γενετικών διαταραχών της αιμοσφαιρίνης

#### *Δομικές παραλλαγές*

Συχνές παραλλαγές που σχετίζονται με νόσο

HbS, HbC, HbE

Σπάνιες παραλλαγές

Σχετιζόμενες με νόσο

Σιωπηρές

#### *Μεσογειακή αναιμία*

α-Μεσογειακή αναιμία

β-Μεσογειακή αναιμία

δβ-Μεσογειακή αναιμία

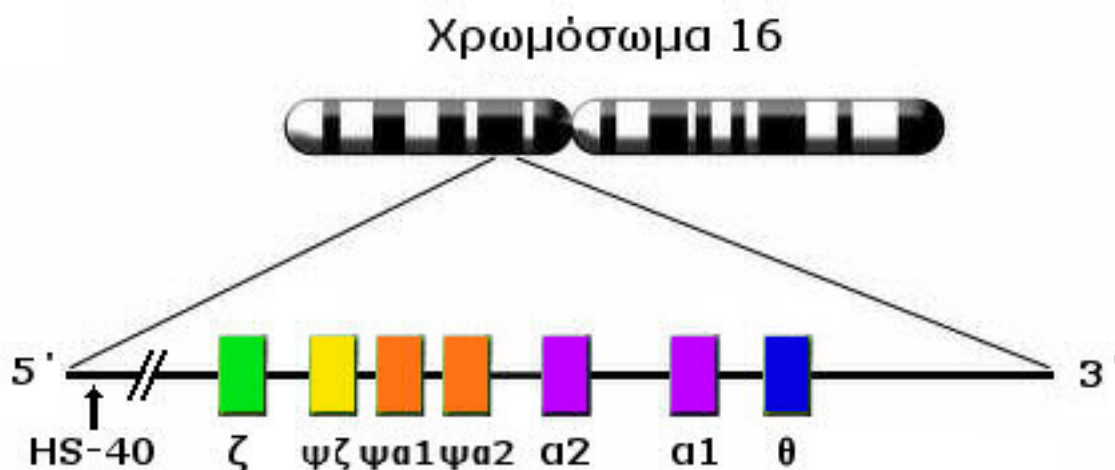
εγδβ-Μεσογειακή αναιμία

*Δομικές παραλλαγές που οδηγούν σε φαινότυπο μεσογειακού συνδρόμου*

*Κληρονομική παραμονή εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης (H<sub>2</sub>FH)*

## α-Μεσογειακή αναιμία

Το σύμπλεγμα των α γονιδίων της Hb βρίσκεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 16 (τμήμα DNA μεγέθους 26 kb) και περιλαμβάνει δυο α γονίδια ( $\alpha_1$  και  $\alpha_2$ ), το εμβρυονικό γονίδιο ζ, τρία ψευδογονίδια ( $\psi\zeta$ ,  $\psi\alpha_2$ ,  $\psi\alpha_1$ ) και το γονίδιο θ το οποίο εκφράζεται κυρίως στο πρωτοεμβρυϊκό στάδιο και σε μικρό ποσοστό στην ενήλικη ζωή (Σχήμα 4). Η ρυθμιστική περιοχή HS-40 των α γονιδίων βρίσκεται 40 kb πριν το ζ γονίδιο είναι ανάλογη του LCR του β γονιδίου και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην έκφραση των α γονιδίων της Hb. Τα δυο α γονίδια αποτελούνται από τρεις κωδικοποιούσες (exons) και 2 μη κωδικοποιούσες περιοχές (introns).



Σχήμα 4: Το σύμπλεγμα των α γονιδίων στο χρωμόσωμα 16 (προσαρμογή από Bank, A. J. Clin. Invest. 2005).

Οι μεταλλάξεις που επηρεάζουν τη σύνθεση της α αλυσίδας χαρακτηρίζονται ως  $\alpha^+$  ή  $\alpha^0$  ανάλογα με το αν υπάρχει μειωμένη ή πλήρης έλλειψη παραγωγής της α-αλυσίδας από το παθολογικό χρωμόσωμα και είναι δυνατόν να οφείλονται σε: 1) έλλειμμα μικρού ή μεγάλου τμήματος DNA (βλάβες με έλλειμμα) ή 2) σε σημειακές μεταλλάξεις των α γονιδίων (βλάβες χωρίς έλλειμμα) (Higgs, 1993).

Ο συχνότερος γονότυπος με έλλειμμα στην Ελλάδα (Kanavakis et al, 2000) προέρχεται από απώλεια DNA μεγέθους 3,7 kb δημιουργείται από άνισο επιχιασμό που συμβαίνει στις ομόλογες περιοχές του DNA των α-γονιδίων και έχει ως αποτέλεσμα τη

δημιουργία ενός χρωμοσώματος με έλλειμμα (-a) και ενός άλλου με περίσσεια ενός a γονιδίου (aaa).

Η συχνότητα των φορέων της α-MA στη χώρα μας κυμαίνεται στα επίπεδα του 8,4% (Kanavakis et al, 1986). Οι ετεροζυγώτες είναι δυνατόν να εμφανίζουν έλλειμμα ενός (-a/aa) ή δυο (- -/aa) α γονιδίων ή να φέρουν σημειακή μετάλλαξη (a<sup>T</sup>a/aa). Στη χώρα μας το μεγαλύτερο ποσοστό των ετεροζυγωτών της α-MA έχει έλλειμμα ενός μόνο α-γονιδίου (Kattamis C et al, 1988; Traeger-Synodinos et al, 1993; Kanavakis et al, 1996). Αιματολογική εικόνα ετερόζυγης α-MA χωρίς κλινικές εκδηλώσεις έχουν και οι ομοζυγώτες (-a/-a).

Η παρουσία ενός μόνο λειτουργικού α-γονιδίου (-a/- -) προκαλεί μέτριας βαρύτητας αιμολυτική αναιμία που ονομάζεται αιμοσφαιρινοπάθεια Η και χαρακτηρίζεται από την παρουσία HbH που είναι τετραμερές β αλυσίδων (β<sup>4</sup>). Η αιμοσφαιρινοπάθεια Η ανευρίσκεται σχετικά σπάνια στη χώρα μας αφού το μεγαλύτερο ποσοστό ετεροζυγωτών της α-MA έχει έλλειμμα ενός μόνο α-γονιδίου. Οι συνδυασμοί με γονότυπους χωρίς έλλειμμα (a<sup>T</sup>a/- -) παρουσιάζουν βαρύτερη κλινική εικόνα.

Η πλήρης απουσία λειτουργικών α-γονιδίων προκαλεί βαριά ενδομήτρια ανοξία με αποτέλεσμα τον εμβρυϊκό ύδρωπα, κατάσταση ασυμβίβαστη με τη ζωή (Kattamis et al, 1980) (Σχήμα 5).

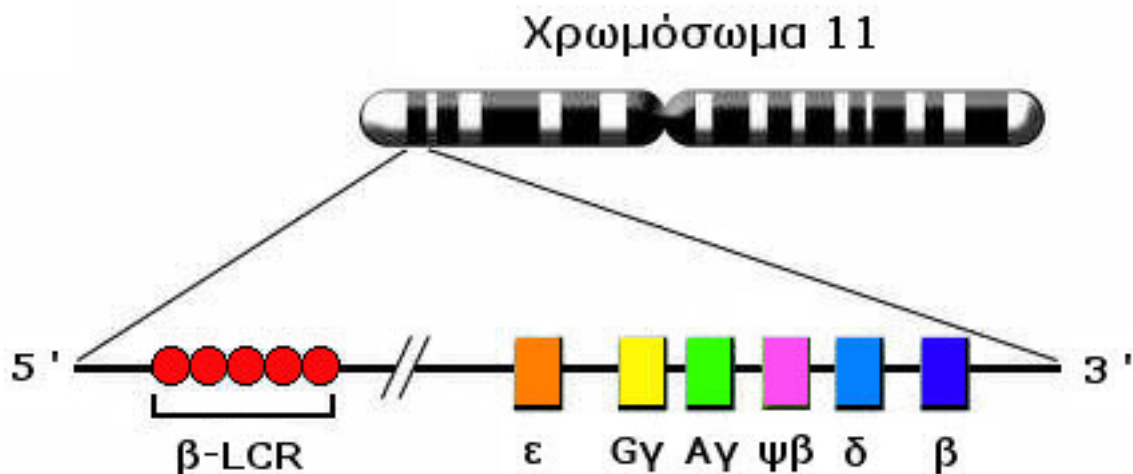


Σχήμα 5: Σχηματική αναπαράσταση της δομής των α γονιδίων σε διάφορες μορφές της α-MA (προσαρμογή από Emery, AEH 1984, revised and reprinted 1985, An introduction to recombinant DNA. John Wiley, Chichester).

## **β-Μεσογειακή Αναιμία (β-ΜΑ)**

Το σύμπλεγμα των β γονιδίων της αιμοσφαιρίνης καλύπτει έκταση 70 kb στο ανθρώπινο γονιδίωμα, βρίσκεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 11 και περιλαμβάνει πέντε λειτουργικά γονίδια ( 5' - ε - <sup>G</sup>γ - <sup>A</sup>γ - ψβ - δ - β - 3' ) που είναι τοποθετημένα με τη σειρά της αναπτυξιακής τους έκφρασης (Collins & Weissman, 1984).

Σε απόσταση 6-20 kb μπροστά από το γονίδιο ε βρίσκεται σημαντική ρυθμιστική περιοχή του συμπλέγματος των β-γονιδίων γνωστή ως Locus Control Region (LCR) η οποία περιλαμβάνει πέντε υπερευαίσθητες στη DNάση-1 θέσεις (HS1-5) και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην έκφραση των β-γονιδίων της αιμοσφαιρίνης (Σχήμα 6).



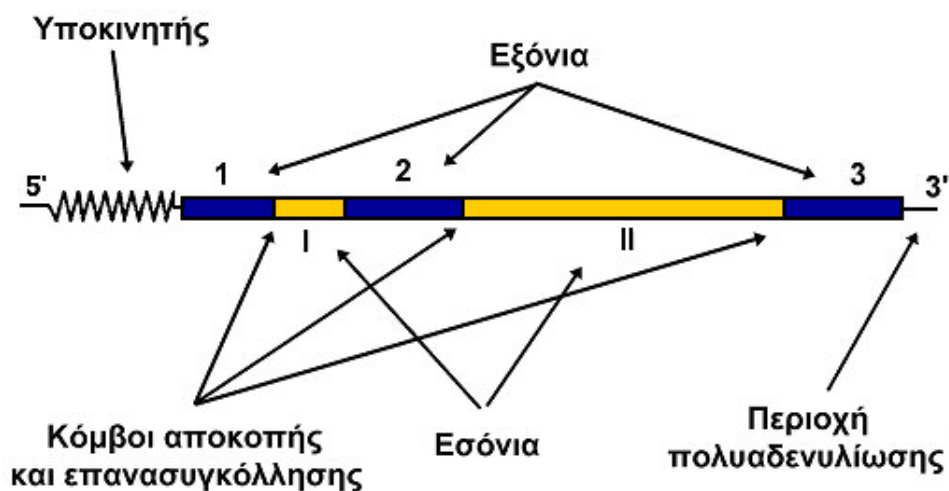
Σχήμα 6: Το σύμπλεγμα των α γονιδίων στο χρωμόσωμα 11 (προσαρμογή από Bank, A. J. Clin. Invest., 2005).

Συγκεκριμένα τόσο στην LCR περιοχή στο β-γονίδιο όσο και στην περιοχή HS-40 στο α-γονίδιο υπάρχουν περιοχές δεσμευτικές για μεταγραφικούς παράγοντες ειδικούς για τα ερυθρά αιμοσφαίρια όπως οι GATA-1 και NF-E2. Ένα πολύ ελκυστικό μοντέλο (Weatherall & Clegg, 1999) προτείνει ότι η μεταγραφή των γονιδίων των πρωτεϊνικών αλυσίδων προκύπτει από παράθεση της περιοχής LCR σε κάθε γονίδιο χωριστά γεγονός το οποίο σε συνεργασία με trans-μεταγραφικούς παράγοντες και RNA-



πολυμεράση II δημιουργεί ένα μεταγραφικό σύμπλοκο στην περιοχή του υποκινητή.

Η περιοχή κωδικοποίησης του β-γονιδίου περιέχεται σε 3 εξόνια (exons) ανάμεσα στα οποία παρεμβάλλονται δυο εσόνια (introns) που είναι μη κωδικοποιούσες περιοχές. Υπάρχουν και μη κωδικοποιούσες περιοχές του γονιδίου που βρίσκονται πέραν του 5' και 3' άκρου κωδικοποίησης και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην λειτουργία του γονιδίου. Η πρώτη αποτελεί την περιοχή του υποκινητή (promoter) και προηγείται του εναρκτήριου κωδικόνιου AUG και η δεύτερη αποτελεί την περιοχή του σημείου πολυαδενυλίωσης (polyadenylation site) που ακολουθεί το κωδικόνιο τερματισμού UAA και είναι απαραίτητη για τη σταθεροποίηση του μορίου του mRNA (Σχήμα 7).



Σχήμα 7: Δομή των γονιδίων των αλυσίδων αιμοσφαιρίνης (Nienhuis et al, 1981).

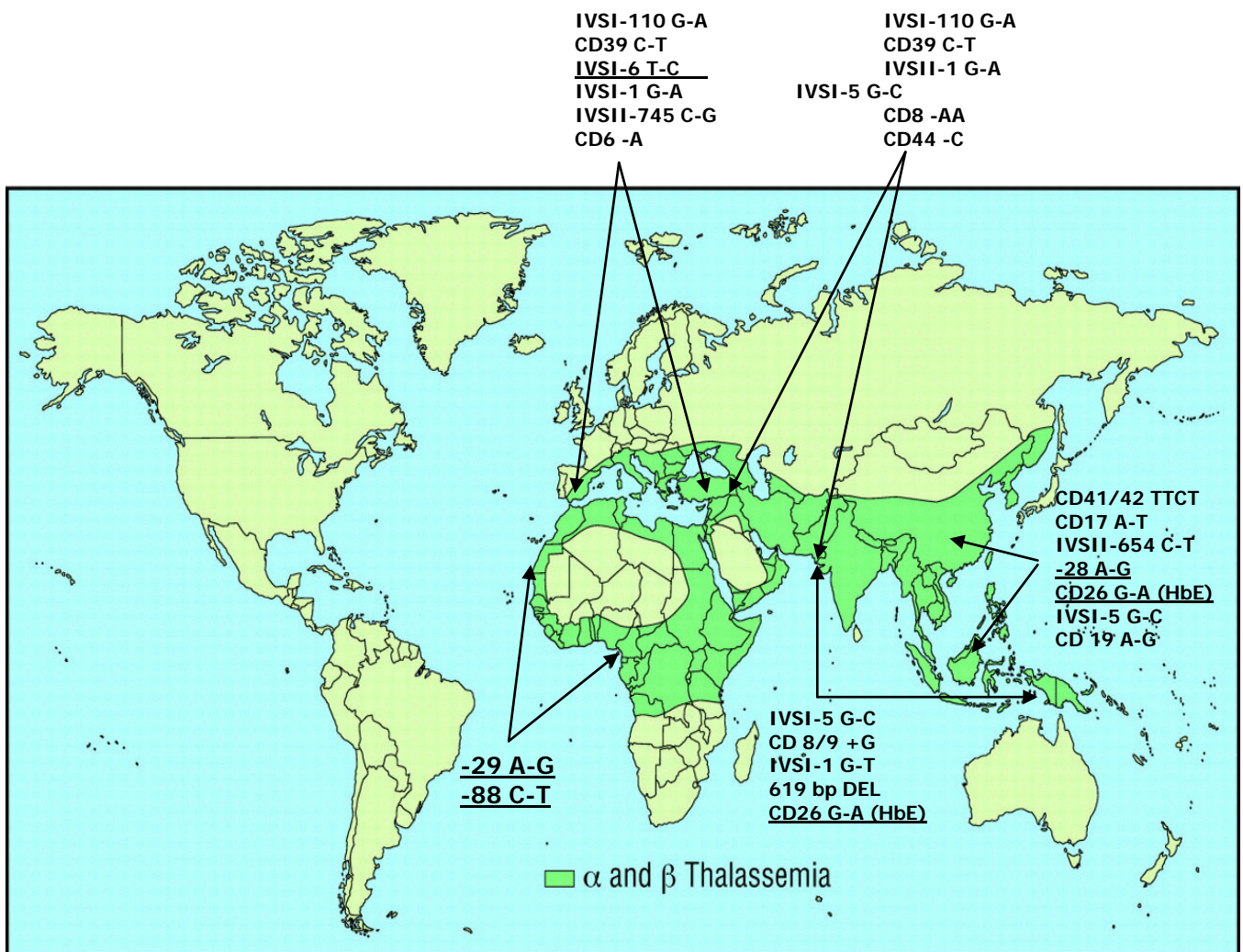
## Επιδημιολογία της μοριακής βάσης της β-MA

Η συχνότητα των μεταλλάξεων της β-MA μελετήθηκε σε πολλούς πληθυσμούς τόσο γύρω από τη λεκάνη της Μεσογείου (Ελλάδα, Ιταλία, Ισπανία, Πορτογαλία, Κύπρος, Μ. Ανατολή, Β. Αφρική) όσο και σε λαούς της Ινδίας, ΝΑ Ασίας, Κίνας και Αφρικής. Σε αρκετούς πληθυσμούς απαντάται ένα ευρύ φάσμα μεταλλάξεων όμως σε κάθε εθνότητα υπάρχουν συγκεκριμένες μεταλλάξεις που είναι συχνότερες (Kazazian, 1990; Weatherall et al, 1995).

Πιο συχνά στους μεσογειακούς πληθυσμούς απαντώνται οι μεταλλάξεις ( $\beta^+$ ) IVSI-110 (G→A), ( $\beta^0$ ) CD39 (C→T), ( $\beta^0$ ) IVSI-1 (G→A), ( $\beta^{++}$ ) IVSI-6 (T→C), ( $\beta^+$ ) IVSII-745 (C→G) και ( $\beta^0$ ) CD6, όμως η συχνότητα της κάθε μιας είναι διαφορετική σε κάθε λαό (Cao et al, 1989; Kattamis C & Kattamis A, 1997). Για παράδειγμα στη Δυτική Μεσόγειο κυρίως Ισπανία, Πορτογαλία, Γαλλία, Ιταλία, Αλγερία και Τυνησία επικρατεί η μετάλλαξη CD39 ενώ στην Ανατολική Μεσόγειο κυρίως, Κύπρο, Τουρκία, Λίβανο και Ελλάδα επικρατεί η μετάλλαξη IVSI-110 (Kattamis C et al, 1990a; Loukoroulos, 1996; Georgiou et al, 2003). Η παγκόσμια κατανομή των πιο συχνών μεταλλάξεων φαίνεται στο [σχήμα 8](#).

Το φάσμα της κλινικής βαρύτητας της β-MA εξαρτάται από τον αριθμό και το είδος των μεταλλάξεων που επικρατούν σε κάθε πληθυσμό. Έτσι το φάσμα είναι πιο ομοιογενές στη Σαρδηνία που το 95% των μεταλλάξεων είναι CD39 (Cao et al, 1978; Rosatelli et al, 1987) σε σχέση με την Ελλάδα όπου παρουσιάζει ετερογένεια λόγω της μεγάλης ποικιλίας μεταλλάξεων και του διαφορετικού βαθμού καταστολής παραγωγής της β αλυσίδας (Kattamis C et al, 1982; Kattamis C et al, 1990a; Kattamis C, 1992; Loukoroulos, 1996). Μελέτη σε 513 ασθενείς με μείζονα β-MA που παρακολουθούνται και μεταγγίζονται στη μονάδα Μεσογειακής Αναιμίας του Νοσοκομείου Παιδών Αγία Σοφία (ασθενείς με ενδιάμεση β-MA αποκλείστηκαν από τη μελέτη), αποκάλυψε την παρουσία 27 β και δβ μεταλλάξεων και 76 γονοτυπικών συνδυασμών. Οι συχνότερες (με ποσοστό >5%) β-μεταλλάξεις ήταν οι IVSI-110 (G→A) (43,9%), CD 39 (C→T) (16,7%), IVSI-1 (G→A) (11%), IVSI-6 (T→C) (7,8%) και IVSII-745 (C→G) (5,5%). Οι παραπάνω μεταλλάξεις καλύπτουν το 85% των γονιδίων (Ladis et al, 2005). Η ετερογένεια της β-MA σε μοριακό επίπεδο στη χώρα μας επιβεβαιώνεται και από μελέτη σε 150 εμβρυικά δείγματα όπου έγινε προγεννητικός έλεγχος (Kanavakis et al, 1997).

Η επιδημιολογία της μοριακής διαταραχής στην ενδιάμεση β-MA



**Σχήμα 8:** Παγκόσμια κατανομή των πιο κοινών μεταλλάξεων β-μεσογειακής αναιμίας. Η υπογράμμιση δηλώνει ήπια μετάλλαξη (προσαρμογή από Weatherall, BMJ 1997).

ΜΑ έχει μελετηθεί τόσο διεθνώς όσο και στη χώρα μας. Πολύ-κεντρική μελέτη 325 ασθενών με ενδιάμεση β-ΜΑ, από έξι χώρες έδειξε ότι στην Κύπρο οι δύο συχνότερες μεταλλάξεις με ποσοστό 50% η καθεμιά ήταν οι IVSI-110 και IVSI-6, στον Μαυρίκιο η συχνότερη μετάλλαξη ήταν η IVSI-5, στην Ινδία η IVSI-1, στο Ιράν η IVSII-1, στην Ταϊλάνδη οι -28 (A→C) και κωδικόνια 41/42 και τέλος στο Πακιστάν η IVSI-5 (Verma et al, 2007).

Η ενδιάμεση β-ΜΑ παρουσιάζεται επίσης ετερογενής σε μοριακό επίπεδο στη χώρα μας και οφείλει την καλοήγη κλινική της πορεία κυρίως στην παρουσία ήπιων β μεταλλάξεων. Μελέτη σε 31 ασθενείς με ενδιάμεση β-ΜΑ και υψηλή HbA<sub>2</sub>, αποκάλυψε την παρουσία της μετάλλαξης IVSI-6 (T→C) σε ποσοστό 39%, της -87 (C→G) σε 10%, άλλων β<sup>+</sup> μεταλλάξεων σε 30%, ενώ 21% ήταν

βαριές  $\beta^0$  μεταλλάξεις (Kanavakis et al, 1995). Την παρουσία ήπιων  $\beta$  μεταλλάξεων σε πάνω από 1500 δείγματα ετεροζυγωτών και ασθενών με MA (μείζονα και ενδιάμεση) στη χώρα μας (στα πλαίσια προγεννητικού ελέγχου) έδειξε και η μελέτη των Traeger-Synodinos et al, 1998.

Μελέτη της σχέσης γονότυπου με τον κλινικό φαινότυπο σε πάνω από 500 Έλληνες ασθενείς με  $\beta$ -MA έδειξε μεγάλη συσχέτιση μεταξύ της βαρύτητας της κλινικής εικόνας και της βαρύτητας της μετάλλαξης. Στους ασθενείς με μείζονα  $\beta$ -MA η παρουσία ήπιας μετάλλαξης είναι σπάνια. Αντίθετα στους ασθενείς με ενδιάμεση  $\beta$ -MA τουλάχιστον μια από τις δύο μεταλλάξεις ήταν ήπια. Μάλιστα, ορισμένες ήπιες μεταλλάξεις βρέθηκαν μόνο σε ασθενείς με ήπια συμπτωματολογία (Καττάμης Χ, 2004) (Πίνακας 3).

**Πίνακας 3:** Μοριακή ανάλυση >500 ασθενών με  $\beta$ -MA (Καττάμης Χ, Δελτίο Α' Παιδ. Κλιν. Παν. Αθηνών 2004)

Μεταλλάξεις	Ποσοστό Αλληλίων (%)	
	Μείζων $\beta$ -MA	Ενδιάμεση $\beta$ -MA
<b><math>\beta^0</math> (βαριές)</b>		
CD 39 (C→T)	16,5	11,0
IVSI-1 (G→A)	12,2	7,0
IVSII-1 (G→A)	2,7	8,5
CD 6 (-A)	2,3	3,0
( $\delta\beta$ ) <sup>0</sup> Sic	2,1	5,0
8 άλλοι / <2%	3,2	-
<b>Σύνολο</b>	<b>39,0</b>	<b>34,5</b>
<b><math>\beta^+</math> (βαριές)</b>		
IVSI-110 (G→A)	44,0	13,0
IVSII-745 (C→G)	5,6	1,0
IVSI-5 (G→A)/ $\delta$ Corfu del	1,1	4,0
3 άλλοι / <2%	5,0	-
<b>Σύνολο</b>	<b>51,2</b>	<b>18,0</b>
<b><math>\beta^{++}</math> (ήπιες) και <math>\beta^{+++}</math> (πολύ ήπιες)</b>		
IVSI-6 (T→C)	7,0	14,0
-87 (C→G)	1,8	7,0
-28 (A→G)	0,2	3,0
Poly A	0,2	11,0
+6 (C→G)	-	2,0
-101 (C→T)	-	9,0
+33 p	-	LO
<b>Σύνολο</b>	<b>9,2</b>	<b>47,0</b>

## Μεσογειακά Σύνδρομα - Γενικές Αρχές

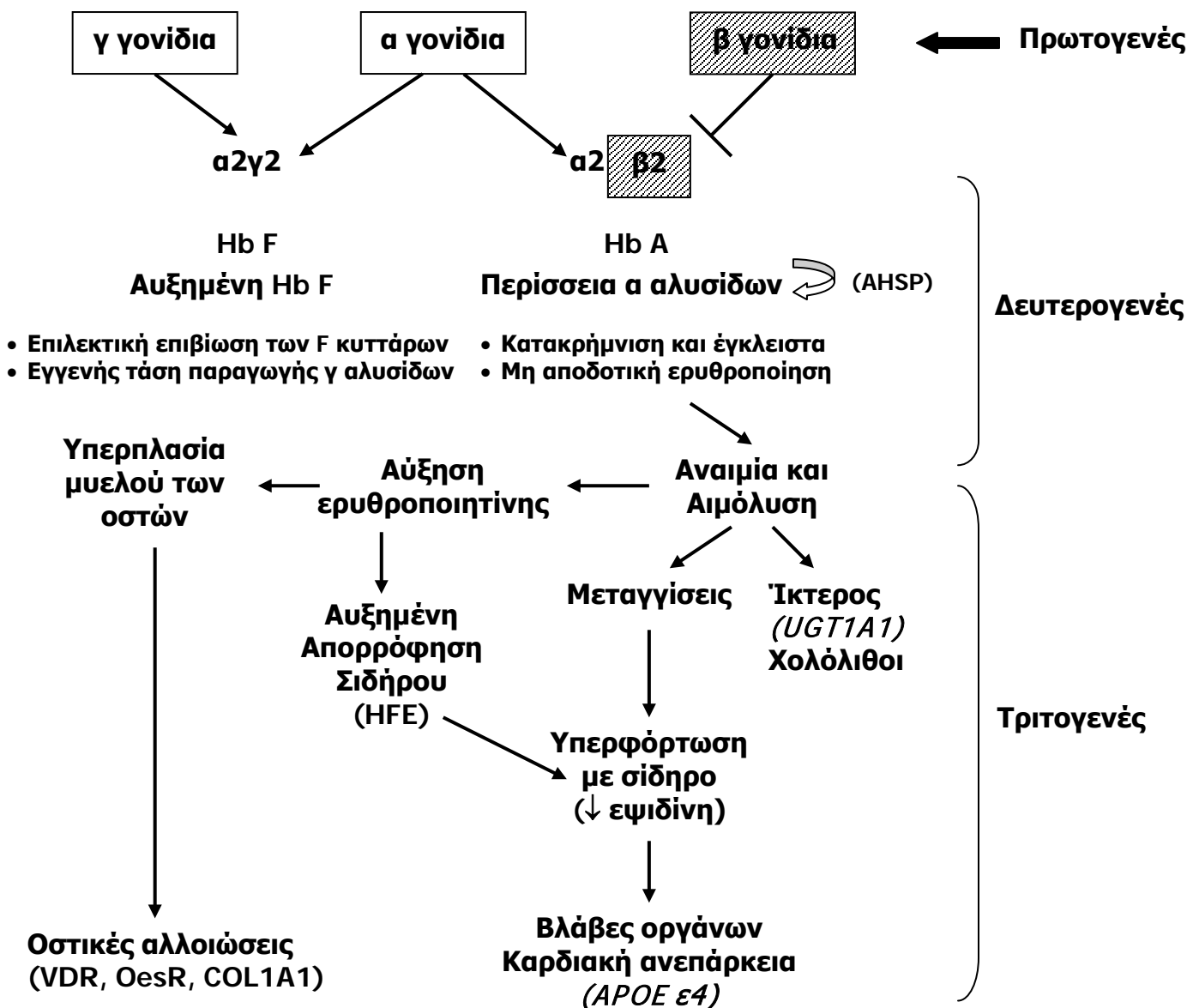
Τα σύνδρομα MA αποτελούν μια ετερογενή ομάδα με κοινό χαρακτηριστικό την ολική ή μερική καταστολή της σύνθεσης μιας ή περισσοτέρων από τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες που σχηματίζουν τις φυσιολογικές αιμοσφαιρίνες (Fessas, 1983; Weatherall & Clegg, 2001). Πρόκειται για ποσοτική διαταραχή της αιμοσφαιρίνης που οφείλεται σε βλάβη στο επίπεδο του DNA, του γενετικού υλικού που κωδικοποιεί τη σύνθεση αλυσίδων και κληρονομείται με υπολειπόμενο σωματικό χαρακτήρα.

Αν η διαταραχή της παραγωγής αφορά την α-αλυσίδα της Hb προκύπτει α-MA ενώ αν αφορά την β-αλυσίδα έχουμε β-MA. Η β-MA διακρίνεται σε β<sup>0</sup>-MA όταν υπάρχει πλήρης αδυναμία σύνθεσης της β-αλυσίδας και β<sup>+</sup>-MA όταν υπάρχει σύνθεση άλλοτε άλλης ποσότητας β-αλυσίδας. Η δβ-MA χαρακτηρίζεται από έλλειψη της σύνθεσης τόσο της β- όσο και της δ-αλυσίδας της Hb και χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα αιμοσφαιρίνης F (HbF).

### Παθοφυσιολογία β-MA

Στη β-MA (Σχήμα 9) υπάρχει ολική (β<sup>0</sup>) ή μερική (β<sup>+</sup>) καταστολή της σύνθεσης της β-αλυσίδας της αιμοσφαιρίνης η οποία είναι συνήθως δομικά φυσιολογική. Η σύνθεση των α-αλυσίδων αιμοσφαιρίνης όμως από τα φυσιολογικά α γονίδια συνεχίζεται κανονικά το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα ανισορροπία στη σύνθεση των πρωτεϊνικών αλυσίδων και σχηματισμό τετραμερών της α-αλυσίδας που βρίσκονται σε περίσσεια. Τα τετραμερή των α-αλυσίδων είναι ιδιαίτερα ασταθή και κατακρημνίζονται στα πρόδρομα ερυθροκύτταρα του μυελού των οστών και λιγότερο στα ερυθροκύτταρα του περιφερικού αίματος, γεγονός που έχει βλαβερές συνέπειες τόσο στην ωρίμανση των ερυθρών αιμοσφαιρίων στο μυελό όσο και στην επιβίωση τους στην περιφερική κυκλοφορία λόγω βλάβης στην κυτταρική τους μεμβράνη. Η ενδομυελική απόπτωση των ερυθροβλαστών οδηγεί σε μη αποδοτική ερυθροποίηση και χαρακτηρίζει τη β-MA (Schrier, 2002; Thein, 2005).





**Σχήμα 9:** Παθοφυσιολογία της β-ΜΑ. Επίπεδα δράσης (πρωτογενές, δευτερογενές, τριτογενές) των παραγόντων που επηρεάζουν το φαινότυπο (Thein, 2004)

Ένας αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων καταστρέφεται στο ΔΕΣ του σπλήνα ο οποίος προοδευτικά υπερπλάσσεται και διογκώνεται σε σημαντικό βαθμό. Η μη αποδοτική ερυθροποίηση και η αιμόλυση οδηγούν σε αναιμία που λόγω της ιστικής υποξίας διεγείρει μέσω της αυξημένης παραγωγής ερυθροποιητίνης το μυελό των οστών για αύξηση της αιμοποίησης (κυρίως της ερυθροποίησης) μέχρι και 30 φορές το φυσιολογικό.

Το γεγονός αυτό έχει σαν συνέπεια την προοδευτική υπερπλασία του μυελού των οστών με παραμόρφωση των οστών και δημιουργία εξωμυελικών μαζών από ερυθροποιητικά κύτταρα στο θώρακα και παρασπονδυλικά. Η οστεοπενία μπορεί να οδηγήσει σε ένα επώδυνο σύνδρομο που χαρακτηρίζεται ιστολογικά από μικροκατάγματα και οστεομαλακία (Gratwick, 1978). Η μυελική υπερπλασία οδηγεί σε αυξημένη απορρόφηση σιδήρου από το γαστρεντερικό σύστημα και προοδευτική αύξηση της εναπόθεσης σιδήρου στους ιστούς, με αποτέλεσμα βλάβη ζωτικών οργάνων όπως η καρδιά. Η αυξημένη αιμόλυση οδηγεί σε επιδείνωση του ίκτερου και σχηματισμό χολόλιθων.

## **Κλινικοί φαινότυποι β-MA**

Η β-MA εκτός από την αιματολογική και γενετική ετερογένεια παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια και στις κλινικές της εκδηλώσεις. Με βάση την κλινική βαρύτητα διακρίνονται τρεις κλινικοί φαινότυποι.

### **1. Ετερόζυγη β-MA**

Αποτελεί το ήπιο άκρο του φαινοτυπικού φάσματος της β-MA και χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη ενός μόνο γονιδίου β-MA το οποίο μπορεί να είναι β<sup>+</sup> ή β<sup>0</sup>. Οι ετεροζυγώτες β-MA είτε είναι β<sup>+</sup> ή β<sup>0</sup> είναι κλινικά ασυμπτωματικοί.

Στην ετερόζυγη β-MA οι ερυθροκυτταρικοί δείκτες χαρακτηρίζονται από υποχρωμία (MCH<27pg) και μικροκυττάρωση (MCV<80fl), υπάρχει ανισοκυττάρωση (αυξημένο εύρος κατανομής του όγκου των ερυθροκυττάρων RDW>14,5%), αυξημένη ωσμωτική αντίσταση ερυθρών σε υπότονα διαλύματα, αυξημένα επίπεδα HbA2 και φυσιολογικά ή ελαφρά αυξημένα επίπεδα HbF. Ο βιοσυνθετικός λόγος α/μη –α αλυσίδων αιμοσφαιρίνης είναι μεγαλύτερος από 1,6.

Η κλινική εικόνα της ετερόζυγης β-MA κυμαίνεται από τη σιωπηρή μορφή χωρίς καμία κλινική και αιματολογική εκδήλωση (σιωπηρός φορέας) μέχρι πολύ ήπια αναιμία με τυπικά αιματολογικά ευρήματα. Η κλινική ετερογένεια της β-MA αντανάκλαται και στον αιματολογικό φαινότυπο, στο βαθμό της υποχρωμίας και μικροκυττάρωσης όπως αυτός εκτιμάται από τα MCH και MCV.

## 2. Ενδιάμεση β-MA (EMA)

Η ενδιάμεση β-MA (EMA) βρίσκεται ανάμεσα στα δυο άκρα του κλινικού φάσματος της ετερόζυγης και της μείζονος β-MA. Πρόκειται για κλινικό όρο που χρησιμοποιείται για να χαρακτηρίσει ένα ευρύ φάσμα της νόσου που εκτείνεται μεταξύ της τυπικής μεταγγισοεξαρτώμενης μορφής και της πολύ ήπιας μορφής που με δυσκολία πολλές φορές διαχωρίζεται από την ομάδα των φορέων.

Αναλύοντας τους γενετικούς μηχανισμούς που οδηγούν σε εμφάνιση EMA ανακαλύπτει κανείς γενετική ετερογένεια γεγονός που αντανάκλαται στη φαινοτυπική ετερογένεια της EMA (Galanello et al, 1989; Kanavakis et al, 1995; Camaschella et al, 1995; Rund et al, 1997; Ho et al, 1998).

Συνήθως οι ασθενείς φέρουν δυο β γονίδια και είναι ομοζυγώτες ή διπλοί ετεροζυγώτες για γονίδια β-MA. Η ήπια ενδιάμεση κλινική εικόνα προκύπτει κυρίως από συνδυασμό δυο ήπιων μεταλλάξεων είτε ήπιων με κλασσικές μεταλλάξεις. Σε αυτές τις περιπτώσεις η ηπιότητα των κλινικών εκδηλώσεων είναι ανάλογη με το ποσοστό της HbA και αντιστρόφως ανάλογη με το ποσοστό της HbF (Kattamis C et al, 1982).

Κλινική εικόνα EMA εμφανίζουν επίσης ασθενείς που είναι ετεροζυγώτες, με ένα γονίδιο β-MA το οποίο είτε συνδυάζεται με αυξημένη παραγωγή α-αλυσίδας όπως συμβαίνει στην περίπτωση τριπλασιασμένου α γονιδίου (Kanavakis et al, 1983; Galanello et al, 1983; Thein et al, 1984; Traeger-Synodinos et al, 1996; Camaschella et al, 1997) είτε πρόκειται για β-MA που κληρονομείται με επικρατούντα χαρακτήρα (Thein, 1999; Thein, 2001).

## 3. Μείζων β-MA

Πρόκειται για ασθενείς με βαριά αναιμία, που γίνεται κλινικά εμφανής από τους πρώτους 6 μήνες της ζωής και αν δεν αντιμετωπιστεί με συστηματικές μεταγγίσεις οι ασθενείς καταλήγουν σε μικρή ηλικία. Οι ασθενείς είναι συνήθως ομοζυγώτες β<sup>0</sup> ή διπλοί ετεροζυγώτες β<sup>0</sup> και β<sup>+</sup> μεταλλάξεων.



## Συσχέτιση γονότυπου – φαινότυπου στην ενδιάμεση MA

Στο 60-90% των ασθενών με EMA η κλινική εικόνα είναι αποτέλεσμα ύπαρξης ενός ή δυο ήπιων γονιδίων,  $\beta^{++}$  ή  $\beta$ -σιωπηρού τύπου που επιτρέπουν την παραγωγή σημαντικού ποσού  $\beta$ -αλυσίδων αιμοσφαιρίνης. Υπάρχουν όμως πολλές γενετικές αλληλεπιδράσεις που καταλήγουν σε φαινότυπο ενδιάμεσης MA όπως φαίνεται στον Πίνακα 4 (Thein, 2005).

**Πίνακας 4:** Οι συχνές γενετικές αλληλεπιδράσεις που προσδιορίζουν τον φαινότυπο της ενδιάμεσης  $\beta$ -MA (Thein, 2005)

### A. Ομόζυγη ή διπλή ετερόζυγη κατάσταση για $\beta$ -MA

1. Κληρονόμηση ήπιων  $\beta$  μεταλλάξεων, σιωπηρών και  $\beta^{++}$  σε ομόζυγη ή διπλή ετερόζυγη κατάσταση (ο φαινότυπος εξαρτάται από το συνολικό ποσό  $\beta$ -αλυσίδας που παράγεται)
2. Συνύπαρξη  $\alpha$ -MA (ο φαινότυπος εξαρτάται από τη βαρύτητα της ανισορροπίας  $\alpha$ /μη- $\alpha$  αλυσίδων)
3. Αυξημένη παραγωγή HbF
  - $\chi$ mnI- $\gamma$  πολυμορφισμός
  - Μεταλλάξεις ή ελλείμματα στον υποκινητή του  $\beta$ -γονιδίου
  - Trans-acting παράγοντες (QTLS) στα χρωμοσώματα 6q, Xp και 8q που αυξάνουν την παραγωγή HbF.

### B. Ετερόζυγη κατάσταση για $\beta$ -MA

1. Συνύπαρξη επιπλέον  $\alpha$ -γονιδίων (aaa/aa, aaa/aaa, aaaa/aa, aaaa/aaaa)
2.  $\beta$ -MA που κληρονομείται με επικρατούντα τρόπο (υπερασταθείς  $\beta$ -αλυσίδες αιμοσφαιρίνης)
3. Σωματική μετάλλαξη του  $\beta$ -γονιδίου – Μωσαϊκισμός

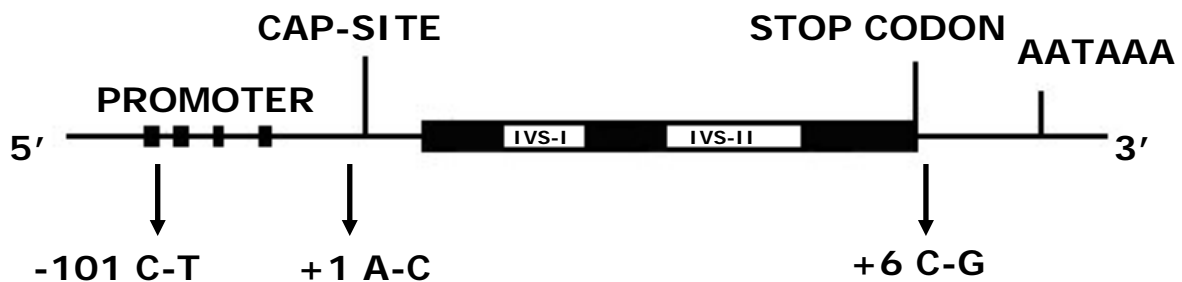
### Γ. Διπλή ετερόζυγη κατάσταση $\beta$ -MA και αιμοσφαιρινοπάθειας (πχ. HbE/ $\beta$ -MA)

### Δ. Διπλή ετερόζυγη κατάσταση για $\beta$ -MA και $\delta\beta$ MA ή HPFH

## Μεταλλάξεις σιωπηρού τύπου στο β γονίδιο

Οι μεταλλάξεις σιωπηρού τύπου χαρακτηρίζονται από φυσιολογικούς ερυθροκυτταρικούς δείκτες και φυσιολογικές τιμές Hb A<sub>2</sub> και HbF αλλά μη ισοζυγισμένη βιοσύνθεση αλυσίδων. Οι αρχικές περιγραφές ήπιας ενδιάμεσης β-MA από συνδυασμό σιωπηρού τύπου μεταλλάξεων με κλασσικές μεταλλάξεις έγιναν από την Κλινική μας (Kattamis et al, 1979). Ο συνδυασμός σιωπηρών με κλασσικές μεταλλάξεις β-MA ( $\beta^{sil} / \beta^{thal}$ ) οδηγεί κατά κανόνα σε κλινική εικόνα ήπιας ενδιάμεσης β-MA (Cao et al, 1994).

Η συχνότερη σιωπηρού τύπου μετάλλαξη στους Μεσογειακούς πληθυσμούς και στην Ελλάδα είναι η αντικατάσταση -101 (C→T) νουκλεοτίδια από το cap site στην CACCC αλληλουχία στον υποκινητή του β γονιδίου. (Gonzalez-Redondo et al, 1989; Ristaldi et al, 1990; Maragoudaki et al, 1999). Άλλες λιγότερο συχνές μεταλλάξεις σιωπηρού τύπου είναι η +1 (A→C) στο σημείο έναρξης της μεταγραφής (cap site) όπου οι ομοζυγώτες της μετάλλαξης έχουν φαινότυπο ετερόζυγου φορέα και η +6 (C→G), έξι νουκλεοτίδια μετά το κωδικόνιο λήξης του β γονιδίου που αποτελεί τη δεύτερη σε συχνότητα σιωπηρού τύπου μετάλλαξη στη χώρα μας (Maragoudaki et al, 1998). (Σχήμα 10)



**Σχήμα 10:** Σιωπηρές μεταλλάξεις στο β γονίδιο (Cao et al, Blood Rev, 1994).

## Ήπιες μεταλλάξεις στο β γονίδιο

Οι ήπιες μεταλλάξεις στο β γονίδιο χαρακτηρίζονται από μικρή μείωση της παραγωγής των β-αλυσίδων και οι ομοζυγώτες παρουσιάζουν εικόνα EMA που συνήθως δεν απαιτεί τακτικές μεταγγίσεις. Διπλοί ετεροζυγώτες για μια ήπια μετάλλαξη και μια βαριά μετάλλαξη που οδηγεί σε ελαττωμένη παραγωγή β-αλυσίδας

παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια στην κλινική τους εικόνα που μπορεί να κυμαίνεται από EMA μέχρι μείζονα MA (Cao et al, 1994).

Μια ομάδα τέτοιων ήπιων μεταλλάξεων περιλαμβάνει την περιοχή του υποκινητή του β γονιδίου και συγκεκριμένα το TATA box και είναι η -29 (A→G) συχνή στους μαύρους, η -31 (A→G) συχνή στους Ιάπωνες και η -28 (A→G) συχνή στους Κινέζους. Ομοζυγώτες γι' αυτές τις μεταλλάξεις έχουν κλινική εικόνα ήπιας EMA, ενώ διπλοί ετεροζυγώτες με βαριά μετάλλαξη παρουσιάζουν νόσο ήπιας βαρύτητας (Antonarakis et al, 1984).

Όλες οι μεταλλάξεις που αφορούν το εγγύς CACCC box έχουν ήπιες φαινοτυπικές εκδηλώσεις. Η συχνότερη από αυτές είναι η -87 (C→G) που είναι αρκετά συχνή στο Μεσογειακό πληθυσμό και δίνει στους ομοζυγώτες πολύ ήπια κλινική εικόνα (Camaschella et al, 1990) και στους διπλούς ετεροζυγώτες με βαριές μεταλλάξεις όπως η CD39 κλινική εικόνα ενδιάμεσης β-MA (Rosatelli et al, 1989).

Μια άλλη ήπια μετάλλαξη συχνή στο Μεσογειακό πληθυσμό που συνοδεύεται από υψηλή παραγωγή β-αλυσίδας αιμοσφαιρίνης είναι η IVSI-6 (T→C) στη θέση 6 του πρώτου εσονίου του β γονιδίου (Tamagnini et al, 1983; Stefanis et al, 1994). Ορισμένοι ομοζυγώτες γι' αυτή τη μετάλλαξη εμφανίζουν κλινική εικόνα EMA (Efremov et al, 1994), ενώ διπλοί ετεροζυγώτες με μια βαριά μετάλλαξη παρουσιάζουν ευρύ φάσμα κλινικών εκδηλώσεων που κυμαίνεται από ήπια EMA ως μείζονα MA (Cao et al, 1994).

Μια άλλη ομάδα ήπιων β μεταλλάξεων βρίσκεται στο 3' άκρο του πρώτου εξονίου και συγκεκριμένα στα κωδικόνια 24-27. Στο κωδικόνιο 27 η μετάλλαξη G→T οδηγεί σε εμφάνιση αιμοσφαιρινοπάθειας Κνωσσού. Διπλοί ετεροζυγώτες για Hb Knossos και βαριές β μεταλλάξεις (Fessas et al, 1986; Olds et al, 1991) όπως και ομοζυγώτες για Hb Knossos παρουσιάζουν σταθερά κλινική εικόνα EMA (Baklouti et al, 1986).

### Συνύπαρξη α-MA

Σε πολλούς πληθυσμούς όπου η β-MA είναι συχνή μπορεί να υπάρχει και α-MA σε υψηλή συχνότητα. Η αλληλεπίδραση της β-MA με την α-MA αποτελεί τη βάση για σημαντική κλινική ετερογένεια και έχει μελετηθεί σε διάφορους πληθυσμούς (Wainscoat et al, 1983; Melis et al, 1983; Rosatelli et al, 1984).

Ο βαθμός βελτίωσης του κλινικού φαινότυπου της ομόζυγης β-MA εξαρτάται πάντοτε τόσο από τη βαρύτητα των β-μεταλλάξεων

όσο και από τον αριθμό των λειτουργικών  $\alpha$  γονιδίων αιμοσφαιρίνης που έχουν συγκληρονομηθεί δηλαδή από το βαθμό ανισορροπίας  $\alpha/\mu\eta$ - $\alpha$  αλυσίδων (Ho et al, 1998; Camaschella et al, 1995).

Ομοζυγώτες για  $\beta^0$  MA που έχουν έλλειμμα ενός  $\alpha$  γονιδίου συνήθως παρουσιάζουν μείζονα MA παρόλο που οι κλινικές εκδηλώσεις μπορεί να εμφανιστούν καθυστερημένα (Thein, 2004). Αντίθετα ομοζυγώτες για  $\beta^0$  MA που έχουν έλλειμμα δυο  $\alpha$  γονιδίων της αιμοσφαιρίνης ( $-\alpha/-\alpha$ ) ή μια μετάλλαξη χωρίς έλλειμμα που οδηγεί σε αναστολή της λειτουργίας του ενός  $\alpha_2$  γονιδίου παρουσιάζουν περισσότερο κλινικό φαινότυπο ενδιάμεσης  $\beta$ -MA (Cao et al, 1994).

Όταν πρόκειται για ομοζυγώτες  $\beta^+$ -MA τότε έλλειμμα έστω και ενός, πολύ δε περισσότερο δυο  $\alpha$  γονιδίων, οδηγεί σε φαινότυπο EMA, πράγμα το οποίο αποδίδεται στην παραγωγή επαρκούς  $\beta$  αλυσίδας αιμοσφαιρίνης και στην συνεπαγόμενη μείωση της ανισορροπίας μεταξύ  $\alpha/\mu\eta$ - $\alpha$  αλυσίδων που περιορίζει τη μη αποδοτική ερυθροποίηση και την περιφερική αιμόλυση (Thein, 2004).

Ακραία έκφραση της επίδρασης της  $\alpha$ -MA στην ομόζυγη  $\beta$ -MA παρατηρείται σε ασθενείς που πάσχουν από HbH (και συνεπώς έχουν ένα μόνο λειτουργικό  $\alpha$  γονίδιο) ενώ παράλληλα είναι ομοζυγώτες της  $\beta$ -MA όπου η κλινική εικόνα που παρουσιάζουν είναι αυτή της EMA (Kanavakis et al, 2004).

Με αντίστοιχο τρόπο η συνύπαρξη περισσότερων από τα φυσιολογικά  $\alpha$  γονιδίων (πχ. τριπλασιασμένου  $\alpha$  γονιδίου ( $\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$ ) ή τετραπλασιασμένου  $\alpha$  γονιδίου ( $\alpha\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ) επιδεινώνει την ανισορροπία  $\alpha/\mu\eta$ - $\alpha$  αλυσίδων και καταλήγει σε κλινική εικόνα EMA αντί για την τυπική ασυμπτωματική κλινική εικόνα του ετεροζυγώτη φορέα  $\beta$ -MA (Kanavakis et al, 1983; Galanello et al, 1983; Sampietro et al, 1983; Thein et al, 1984; Oron et al, 1994). Σε κάθε άτομο υπάρχει ένα κρίσιμο επίπεδο ανισορροπίας των αλυσίδων της αιμοσφαιρίνης πέρα από το οποίο προκύπτει η εμφάνιση των κλινικών συμπτωμάτων. Ο φαινότυπος των ασθενών αυτών παρουσιάζει ποικίλο φάσμα και εξαρτάται από τη βαρύτητα του  $\beta$  γονιδίου (Traeger-Synodinos et al, 1996; Camaschella et al, 1997).

## δβ MA

Η παρουσία δβ MA που οφείλεται σε διαφόρου βαθμού έλλειμμα στο σύμπλεγμα των β γονιδίων και χαρακτηρίζεται από απουσία παραγωγής β και δ αλυσίδων της αιμοσφαιρίνης και αυξημένη παραγωγή HbF, μειώνει τη βαρύτητα της MA. Ομοζυγώτες δβ MA και σε ορισμένες περιπτώσεις διπλοί ετεροζυγώτες δβ και β-MA παρουσιάζουν κλινική εικόνα EMA που προφανώς οφείλεται στην αυξημένη παραγωγή HbF (Kattamis C, 1992; Kattamis C et al, 1982).

Ένας άλλος τύπος δβ MA είναι η δβ Lepore. Ομοζυγώτες δβ Lepore και διπλοί ετεροζυγώτες δβ Lepore και βαριάς β-MA παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια στην κλινική εικόνα που ποικίλλει από ήπια μείζονα MA ως EMA (Cao et al, 1994). Και σε αυτήν την περίπτωση η κλινική εικόνα EMA οφείλεται στην αυξημένη παραγωγή HbF.

Μια άλλη συχνή δβ μετάλλαξη που συναντάται μόνο στην Ελλάδα είναι η δβ Corfu που χαρακτηρίζεται από τη συνύπαρξη της μετάλλαξης β<sup>+</sup> IVS1 -5 (G→A) στο β γονίδιο με ένα έλλειμμα στο δ γονίδιο μεγέθους 7,2 kb (Wainscoat et al, 1985; Kulozik et al, 1988). Πρόκειται για μετάλλαξη που επηρεάζει τη μετα-μεταγραφική ρύθμιση της έναρξης παραγωγής HbF όταν το β-mRNA πέφτει κάτω από ένα κρίσιμο όριο (Chakalova et al, 2005). Ετεροζυγώτες δβ Corfu έχουν φαινότυπο ετερόζυγης β MA που χαρακτηρίζεται από φυσιολογική ή ελαφρά ελαττωμένη τιμή HbA<sub>2</sub> και τιμή HbF φυσιολογική ή ήπια αυξημένη (4-5%). Οι ομοζυγώτες δβ Corfu έχουν σχεδόν εξ' ολοκλήρου HbF, απουσία HbA<sub>2</sub> και ίχνη HbA (Traeger-Synodinos et al, 1991). Το έλλειμμα στο δ γονίδιο με φυσιολογικό το β γονίδιο έχει περιγραφεί σε μελέτη από την Ιταλία που χαρακτηρίζεται από φυσιολογική παραγωγή β-αλυσίδας (Galanello et al, 1990).

## Επιπλοκές

Η κλινική εικόνα των ασθενών με EMA είναι σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό ίδια με αυτή που χαρακτηρίζει και τη μείζονα β-MA. Η χρόνια αναιμία και η υπερφόρτωση με σίδηρο είναι υπεύθυνη για πολλές από τις επιπλοκές της ενδιάμεσης β-MA οι οποίες είναι σπάνιες στη μείζονα MA. Στη συνέχεια αναφέρονται συνοπτικά ορισμένες επιπλοκές που σχετίζονται με τη μελέτη.

### Υπερφόρτωση με σίδηρο

Ακόμη και οι ασθενείς με EMA που δεν μεταγγίζονται συχνά παρουσιάζουν υπερφόρτωση με σίδηρο εξαιτίας της μη αποδοτικής ερυθροποίησης, της περιφερικής αιμόλυσης και της αυξημένης εντερικής απορρόφησης Fe. Ειδικά σχετικά με την απορρόφηση του σιδήρου από το έντερο, το ηπατικό πεπτίδιο εψιδίνη φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο όπως έχει ήδη αναφερθεί. Η παραγωγή της ρυθμίζεται κυρίως από την αυξημένη μυελική δραστηριότητα παρά από την υπερφόρτωση σε σίδηρο. Αυξημένη παραγωγή εψιδίνης εμποδίζει την εντερική απορρόφηση σιδήρου ενώ ελαττωμένη παραγωγή προκαλεί το αντίθετο. Έχει αποδειχθεί ότι σε ασθενείς με μείζονα MA η εψιδίνη είναι σημαντικά ελαττωμένη γεγονός που επιτρέπει την απορρόφηση σιδήρου από το έντερο ακόμη και αν υπάρχει υπερφόρτωση με σίδηρο (Kattamis et al, 2006).

Προοδευτικά όσο η υπερφόρτωση με σίδηρο προχωρεί, η ικανότητα της τρανσφερίνης του ορού να συνδέει το σίδηρο κορρένυται. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την κυκλοφορία ενός κλάσματος σιδήρου που δεν συνδέεται με την τρανσφερίνη και λέγεται non-transferrin bound iron (NTBI). Αυτό δημιουργεί βλάβη στους ιστούς μέσω ελευθέρων ριζών και παρά το γεγονός ότι ο οργανισμός διαθέτει ένα σημαντικό αριθμό από αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, η οξειδωτική βλάβη δεν είναι δυνατόν να εξουδετερωθεί (Hershko et al, 1998a).

Το ήπαρ και η καρδιά είναι οι κύριοι στόχοι της τοξικής βλάβης του Fe αλλά και άλλα όργανα όπως το πάγκρεας και οι ενδοκρινείς αδένες είναι ευαίσθητα στη βλαπτική του δράση. Η αιμοσιδήρωση είναι κυρίως προφανής μετά τη 2<sup>η</sup> -3<sup>η</sup> δεκαετία της ζωής, η βαρύτητα της ποικίλλει από ασθενή σε ασθενή και φαίνεται να συσχετίζεται με τη βαρύτητα του κλινικού φαινότυπου και την ηλικία του ασθενούς. Μελέτες έδειξαν ότι ασθενείς με EMA που

έχουν κάνει σπληνεκτομή παρουσιάζουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα κορεσμού τρανσφερρίνης, φερριτίνης και απέκκρισης σιδήρου με τα ούρα σε σχέση με ασθενείς που δεν έχουν σπληνεκτομηθεί (Camaschella & Cappellini, 1995). Ωστόσο οι προαναφερθείσες παράμετροι έμμεσα μόνο εκφράζουν το φορτίο σιδήρου του οργανισμού αφού δεν αντανακλούν τον ηπατικό σίδηρο και δεν συσχετίζονται με τη συγκέντρωση σιδήρου στο ηπατικό παρέγχυμα όπως εκτιμάται με βιοψία ήπατος τη στιγμή της σπληνεκτομής (Fiorelli et al, 1990).

Πρόσφατες εργασίες αποκαλύπτουν καινούριους παράγοντες που ενέχονται στην ομοιόσταση του σιδήρου και είναι πιθανό ότι μελλοντικά θα βρεθούν γενετικοί μηχανισμοί οι οποίοι επηρεάζουν το διαφορετικό βαθμό της υπερφόρτωσης με σίδηρο στη β-MA (Andrews, 2004; Hentze et al, 2004).

Υπάρχουν αναφορές ότι η συνύπαρξη της μετάλλαξης C282Y στο HFE1 γονίδιο η οποία προκαλεί κληρονομική αιμοχρωμάτωση προδιαθέτει σε υπερφόρτωση με σίδηρο τους ασθενείς με EMA, (Rees et al, 1997), ενώ η συνύπαρξη στίγματος β-MA σε ομοζυγώτες της μετάλλαξης C282Y επιδεινώνει την υπερφόρτωση με σίδηρο (Piperno et al, 2000). Ωστόσο η μετάλλαξη C282Y είναι σπάνια σε πληθυσμούς όπου η β-MA είναι συχνή, άρα ο ρόλος της στην υπερφόρτωση σε σίδηρο των ασθενών αυτών είναι περιορισμένος (Merryweather-Clarke et al, 1997).

Συχνότερος είναι ο πολυμορφισμός H63D στο HFE γονίδιο και ο ρόλος του μελετάται. Μελέτη έδειξε ότι φορείς β-MA ομοζυγώτες για H63D παρουσιάζουν υψηλότερες τιμές φερριτίνης σε σχέση με φορείς β-MA χωρίς αυτόν τον πολυμορφισμό (Melis et al, 2002) υποδεικνύοντας ότι ο πολυμορφισμός H63D μπορεί να έχει ένα ιδιαίτερο τροποποιητικό ρόλο στην απορρόφηση του σιδήρου.

Σε κάθε περίπτωση επιβεβαιώνεται ότι η συγκληρονόμηση γονιδίων ενέχεται στην ετερογένεια του φαινότυπου των μονογονιδιακών νοσημάτων (Weatherall, 2000).

## **Υπερσπληνισμός**

Οι ασθενείς με EMA αναπτύσσουν συχνά υπερσπληνισμό ο οποίος χαρακτηρίζεται από σημαντικό βαθμό αύξηση των ορίων του σπλήνα και ελάττωση της μέσης τιμής αιμοσφαιρίνης χωρίς τη συνύπαρξη άλλων παραγόντων όπως λοίμωξη. Η σπληνομεγαλία είναι αποτέλεσμα της αυξημένης καταστροφής των ερυθρών

αιμοσφαιρίων σ' αυτόν καθώς και του εγκλωβισμού στο σπλήνα μεγάλων ποσοτήτων αίματος (κρίση σπληνικού εγκλωβισμού) και συνύπαρξης εξωμυελικής αιμοποίησης. Σε υπερσπληνισμό συνυπάρχει λευκοπενία και θρομβοπενία. Ο ρυθμός και ο βαθμός ανάπτυξης υπερπληνισμού φαίνεται να σχετίζεται με τη βαρύτητα του κλινικού φαινότυπου και τον αιματολογικό φαινότυπο. Η διενέργεια σπληνεκτομής αντιστρέφει τη διαδικασία και επιτρέπει στην πλειονότητα των ασθενών τη διακοπή των μεταγγίσεων αλλά δεν επαναφέρει στα φυσιολογικά την κατάσταση αυξημένης καρδιακής παροχής και πνευμονικής υπέρτασης που συχνά χαρακτηρίζει την EMA (Aessoros et al, 2005a).

Παράλληλα με την αναιμία η διόγκωση του σπλήνα αποτελεί το πρώτο και συχνότερο εύρημα (κλινικά και υπερηχογραφικά) σε ασθενείς με EMA. Σε μελέτη από τη χώρα μας όλοι σχεδόν από 37 ασθενείς με EMA (μέση ηλικία  $22,2 \pm 10$  έτη) παρουσίασαν σπληνομεγαλία ενώ σε σπληνεκτομή είχε ήδη υποβληθεί ποσοστό 30% αυτών (Papadaki et al, 2003). Σε άλλη μελέτη από το Λίβανο σε 44 ασθενείς με EMA σε σπληνεκτομή υποβλήθηκε το 90% αυτών (Inati et al, 2006), ενώ από μελέτη στην Ιταλία σε 63 ασθενείς με EMA προκύπτει ότι το ποσοστό σπληνεκτομής ήταν 67% (Carpellini, 2002).

Η ηλικία σπληνεκτομής στην EMA είναι συνήθως υψηλότερη σε σχέση με τη μείζονα MA (Camaschella & Carpellini, 1995). Οι ενδείξεις σπληνεκτομής σε EMA (Taher et al, 2006a) είναι οι εξής:

1. Καθυστέρηση της αύξησης
2. Λευκοπενία
3. Θρομβοπενία
4. Αυξημένες ανάγκες αίματος στους συστηματικά μεταγγιζόμενους ασθενείς
5. Συμπτωματική σπληνομεγαλία

## **Επιπλοκές από το ήπαρ**

Το ήπαρ είναι το κύριο όργανο αποθήκευσης του Fe και άρα η ηπατοτοξικότητα από τις πιο συνήθεις εκδηλώσεις της υπερφόρτωσης με Fe. Ένα από τα συχνότερα υπερηχογραφικά ευρήματα σε ασθενείς με EMA είναι η ύπαρξη ηπατομεγαλίας. Μελέτη σε 37 Έλληνες ασθενείς με EMA αποκάλυψε την ύπαρξη ηπατομεγαλίας σε ποσοστό 43% (Papadaki et al, 2003). Οι αυξημένες τιμές ηπατικών ενζύμων (SGOT, SGPT) που



ανευρίσκονται σε ασθενείς με EMA οφείλονται σε καταστροφή του ηπατοκυττάρου λόγω της υπερφόρτωσης με Fe. Πολλές φορές με την κατάλληλη θεραπεία αποσιδήρωσης αυτές επανέρχονται στα φυσιολογικά επίπεδα. Η ηπατική βλάβη που προκαλείται από την υπερφόρτωση με Fe μπορεί να οδηγήσει σε ίνωση και κίρρωση και σε προχωρημένες περιπτώσεις σε ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (Arthur, 1996; Ramm & Ruddell, 2005). Συγκεκριμένα το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα είναι συχνή επιπλοκή μόνο σε ασθενείς με ηπατική κίρρωση που οφείλεται είτε στη συνύπαρξη αιμοχρωμάτωσης είτε σε χρόνια ιογενή ηπατίτιδα. Παρ' όλα αυτά μελέτη αποκάλυψε την ύπαρξη αρκετών περιστατικών ηπατοκυτταρικού καρκίνου συχνότερα σε ασθενείς με EMA παρά με μείζονα MA, σε μέση ηλικία  $45 \pm 11$  έτη (Borgna-Pignatti et al, 2004). Αντίθετα οι ιογενείς ηπατίτιδες από HBV και HCV είναι λιγότερο συχνές στην EMA αφού και οι μεταγγίσεις είναι πιο αραιές ή απουσιάζουν.

## **Επιπλοκές από την καρδιά**

Η καρδιά μαζί με το ήπαρ και τους ενδοκρινείς αδένες είναι τα κύρια όργανα όπου η εναπόθεση Fe προκαλεί σοβαρές επιπλοκές. Ο Fe επιδρά δυσμενώς στο μυοκαρδιακό κύτταρο ευοδώνοντας τη μετατροπή ελευθέρων ριζών οξυγόνου ( $O_2^{\cdot -}$ ) και υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) σε ιδιαίτερα τοξικές ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου ( $OH^{\cdot}$ ) (Hershko et al, 1998b). Η εναπόθεση σιδήρου στην καρδιά προκαλεί αρρυθμίες, συστολική και διαστολική δυσλειτουργία και συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια που εκδηλώνονται την δεύτερη ή τρίτη δεκαετία ζωής (Wood et al, 2005).

Οι επιπλοκές από την καρδιά λόγω της υπερφόρτωσης με σίδηρο αποτελούν την κύρια αιτία θανάτου σε ασθενείς με β-MA κυρίως μέσω της πρόκλησης αριστερής καρδιακής ανεπάρκειας (Aessoros et al, 2005b). Οι ασθενείς με EMA οι οποίοι δεν έχουν συνήθως σημαντική αιμοσιδήρωση είναι λιγότερο επιρρεπείς σε καρδιολογικά προβλήματα.

Από πλευράς παθοφυσιολογίας δυο είναι οι κύριοι μηχανισμοί εμφάνισης καρδιακής νόσου στην EMA:

1. Η αυξημένη καρδιακή παροχή που είναι αποτέλεσμα της χρόνιας ιστικής υποξίας και των αντισταθμιστικών μηχανισμών που απορρέουν από αυτή και

2. Η αγγειακή συμμετοχή που οδηγεί σε αυξημένη αντίσταση των πνευμονικών αγγείων και αυξημένες συστηματικές αγγειακές αντιστάσεις (Aessoros et al, 2007a).

Στους προαναφερθέντες μηχανισμούς είναι σημαντική η συμβολή της υπερφόρτωσης με Fe όπως ήδη αναφέρθηκε και η ύπαρξη βαλβιδοπάθειας. Σαν αποτέλεσμα τόσο η δεξιά όσο και η αριστερή κοιλία διατηρούν αυξημένη καρδιακή παροχή διαμέσου ενός αγγειακού δικτύου με αυξημένη αντίσταση.

Στην κλινική εικόνα της EMA κυριαρχεί η συμμετοχή των δεξιών καρδιακών κοιλοτήτων και η πνευμονική υπέρταση που οδηγούν σε συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια (Aessoros et al, 2007a). Παρόλο που η λειτουργία των αριστερών καρδιακών κοιλοτήτων είναι επίσης επηρεασμένη στην EMA, η συστολική λειτουργία της αριστερής κοιλίας διατηρείται σε ικανοποιητικά επίπεδα ενώ σταματά να αντιρροπεί κάτω από συνθήκες που χαρακτηρίζονται από υπέρμετρο καρδιακό έργο. Πολλές υπερηχογραφικές μελέτες επιβεβαιώνουν ότι το καρδιακό κλάσμα εξώθησης πολύ σπάνια επηρεάζεται σε ασθενείς με EMA (Aessoros et al, 2005b; Vaccari et al, 2002).

Μεγάλη πολυκεντρική μελέτη σε 110 Έλληνες ασθενείς με EMA και μέση ηλικία  $32,5 \pm 11,4$  έτη έδειξε ότι 5,4% αυτών είχε συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια, 34% είχε χρόνιες περικαρδιακές αλλοιώσεις και περισσότεροι από τους μισούς είχαν κάποιου είδους βαλβιδοπάθεια. Επιπλέον 59% των ασθενών είχε ένδειξη πνευμονικής υπέρτασης (Aessoros et al, 2001).

Άλλη μεγάλη μελέτη από την Ελλάδα σε 74 ασθενείς με EMA με μέση ηλικία  $28,2 \pm 7,4$  έτη έδειξε ότι 2,7% αυτών παρουσίασε συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια ενώ σημαντική πνευμονική υπέρταση παρουσίασε 23% των ασθενών (Aessoros et al, 2005b).

## Θεραπεία EMA

Οι επιπλοκές της EMA δεν αντιμετωπίζονται πάντοτε με επιτυχία γι' αυτό η πρόληψη είναι η καλύτερη δυνατή επιλογή. Αυτό επιτυγχάνεται με τακτικές μεταγγίσεις σύμφωνα με τα κριτήρια που αναφέρονται παρακάτω, χαμηλές δόσεις ασπιρίνης και αντιπηκτική αγωγή κατά προτίμηση με χαμηλού μοριακού βάρους ηπαρίνη για την αποφυγή της εν τω βάθει φλεβικής θρόμβωσης.

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει ένας αριθμός επιλογών που είναι διαθέσιμες για την αντιμετώπιση της EMA και περιλαμβάνουν

1. έναρξη μεταγγίσεων
2. χορήγηση παραγόντων που αυξάνουν την παραγωγή HbF
3. μεταμόσχευση μυελού των οστών

## Μεταγγίσεις

Η απόφαση για το αν θα πρέπει ένας ασθενής με EMA να ξεκινήσει ένα πρόγραμμα μεταγγίσεων είναι εξαιρετικά δύσκολη και βασίζεται κυρίως σε κλινικά κριτήρια. Μάλιστα η ηλικία εμφάνισης των συμπτωμάτων της ενδιάμεσης β-MA είναι ένα καλό κριτήριο για την μελλοντική έναρξη ή όχι μεταγγίσεων και την ηλικία έναρξης αυτών (Cao, 1988). Οι μεταγγίσεις κρίνονται απαραίτητες όταν η αίσθηση "καλής υγείας" του ασθενούς είναι τόσο ελαττωμένη που του απαγορεύει να έχει φυσιολογική δραστηριότητα στη ζωή του. Προβλήματα δημιουργούνται συνήθως λόγω της χρόνιας αναιμίας και της συνυπάρχουσας χρόνιας υποξίας ιδιαίτερα όταν οι τιμές αιμοσφαιρίνης είναι <7 gr/dl.

Ένα δεύτερο σημαντικό πρόβλημα που αποτελεί επίσης κριτήριο για έναρξη μεταγγίσεων είναι η διατήρηση στα παιδιά τιμών αιμοσφαιρίνης που να επιτρέπουν φυσιολογική αύξηση και ανάπτυξη, φυσιολογική οστική ηλικία, φυσιολογικό μέγεθος σπλήνα και απουσία οστικών αλλοιώσεων. Σημαντικό είναι επίσης το κριτήριο ύπαρξης μυελικής και εξωμυελικής υπερπλασίας. Η ύπαρξη καρδιακής νόσου είναι ένα άλλο κριτήριο για έναρξη μεταγγίσεων αλλά σε μεγαλύτερη ηλικία.

Οι ήπιες μορφές ενδιάμεσης EMA δεν απαιτούν μεταγγίσεις παρά μόνο σε ειδικές συνθήκες όπως είναι λοιμώξεις, περίοδοι ταχείας αύξησης, κύηση κλπ. Όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία

οι μεταγγίσεις κρίνονται απαραίτητες και σε περιπτώσεις απλαστικών κρίσεων λόγω λοίμωξης από parvo ιό B19 (Serjeant et al, 1981). Έτσι ενώ κάποιοι ασθενείς υποβάλλονταν σε μεταγγίσεις στην παιδική ηλικία αυτές μπορεί να διακοπούν μετά την ενήβωση. Αντίθετα ενήλικες που έμειναν αμετάγγιστοι για περισσότερες από 2 δεκαετίες και ανέπτυξαν βαριά αναιμία απαιτούν συστηματικές μεταγγίσεις. Σε κάθε περίπτωση οι μεταγγίσεις θεωρούνται επιβεβλημένες σε ασθενείς με βαριές μεταλλάξεις που υποδηλώνουν βαριά κλινική εικόνα προκειμένου να αποφευχθούν οι επιπλοκές και να εξασφαλισθεί καλή ποιότητα ζωής και μακρόχρονη επιβίωση (Mohamed & Jackson, 1998). Αφού ξεκινήσουν οι μεταγγίσεις το επίπεδο αιμοσφαιρίνης πριν τη μετάγγιση καλό είναι να διατηρείται μεταξύ 9,5-10 gr/dl ώστε να καταστέλλεται η μυελική υπερπλασία και να ελαττώνεται η απορρόφηση σιδήρου από το έντερο.

Αρκετοί συγγραφείς πιστεύουν ότι ασθενείς ομοζυγώτες ή διπλοί ετεροζυγώτες για βαριές μεταλλάξεις β-MA πρέπει να ξεκινούν τις μεταγγίσεις νωρίς. Αυτή η άποψη υποστηρίζεται από το γεγονός ότι ασθενείς με βαριές μεταλλάξεις έχουν τόσο σοβαρές επιπλοκές που είναι καλύτερα να τις προλαμβάνει κανείς με συστηματικές μεταγγίσεις παρά να τις θεραπεύει (Aessoros et al, 2007b).

Ένας άλλος λόγος για να ξεκινήσουν νωρίς οι μεταγγίσεις είναι η αποφυγή της αλλοανοσοποίησης. Σε μια μελέτη το ποσοστό αλλοανοσοποίησης ήταν 21% όταν οι ασθενείς μεταγγίζονταν σε ηλικία κάτω των τριών ετών και 47,5% όταν η έναρξη των μεταγγίσεων ήταν άνω των τριών ετών (Spanos et al, 1990).

Ενδείξεις για έναρξη μεταγγίσεων σε EMA (Taher et al, 2006a):

1. Μειωμένη αύξηση και κακή επίδοση στο σχολείο
2. Καταστάσεις παροδικού stress (πχ. λοιμώξεις, εγκυμοσύνη)
3. Συμπτωματική αναιμία
4. Συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια ± πνευμονική υπέρταση
5. Άτονα έλκη κάτω άκρων

## **Αποσιδήρωση**

Η υπερφόρτωση με σίδηρο αποτελεί συνήθως λιγότερο σημαντικό πρόβλημα σε ασθενείς με EMA σε σχέση με τη μείζονα

ΜΑ, εκτός και αν ο ασθενής έχει ξεκινήσει συστηματικές μεταγγίσεις. Σε ασθενείς με ΕΜΑ η κύρια πηγή του πλεονάζοντος σιδήρου είναι η αιμόλυση και η αυξημένη εντερική απορρόφηση, όπου η επιδιδίνη φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο.

Πάντως μελέτες δείχνουν όπως αναμένεται ότι η ανάπτυξη των κλινικών επιπλοκών λόγω αιμοσιδήρωσης σε μη μεταγγιζόμενους ασθενείς με ΕΜΑ είναι πιο αργή σε σχέση με ασθενείς με μείζονα ΜΑ (Pippard et al, 1979). Το φορτίο του σιδήρου σε ασθενείς με ΕΜΑ έχει τη τάση να συσσωρεύεται στο ήπαρ ενώ η καρδιά είναι συνήθως ακόμη ελεύθερη όπως φαίνεται από μετρήσεις με MRI. Το πλεόνασμα του σιδήρου και η αιμοσιδήρωση αντιμετωπίζονται με θεραπεία αποσιδήρωσης.

Τρία φάρμακα είναι διαθέσιμα για τη θεραπεία αποσιδήρωσης:

Δεσφεροξαμίνη υποδόρια σε μέση δόση 40mg/kg σε έγχυση 8-12 ωρών (Borgna-Pignatti, 2007). Αποτελεί φάρμακο αναφοράς με σημαντική βελτίωση της νοσηρότητας και θνησιμότητας των ασθενών (Cossu et al, 1981; Brittenham et al, 1994).

Η δεσφεροξαμίνη ανήκει στην κατηγορία των σιδηροχηλικών ουσιών του υδροξαμικού οξέος και παράγεται από τον *Streptomyces pilosus*. Έχει την ιδιότητα να συνδέεται εύκολα και με μεγάλη χημική συγγένεια με το Fe της φερριτίνης και της αιμοσιδηρίνης, με όχι ιδιαίτερα εύκολα με αυτόν της τρανσφερρίνης ενώ δεν συνδυάζεται καθόλου με το Fe των κυτοχρωμάτων και της αιμοσφαιρίνης. Το σύμπλοκο αποβάλλεται με τα ούρα, στα οποία δίνει κόκκινη απόχρωση, αν και αναφέρεται ότι ως και 50% μπορεί να ανιχνευθεί στα κόπρανα (Cumming et al. 1969). Ο χρόνος ημίσειας ζωής της δεσφεροξαμίνης στην κυκλοφορία είναι περίπου 75 λεπτά. Παρότι οι ασθενείς με υπερφόρτωση Fe μπορεί να έχουν αποθηκευμένες τεράστιες ποσότητες, μόνο ένα μικρό ποσό από αυτές είναι διαθέσιμο ανά πάσα στιγμή για αποσιδήρωση και φαίνεται ότι αυτό αναπληρώνεται πολύ αργά από τις αποθήκες. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τον μικρό χρόνο ημιζωής πιθανά δικαιολογεί τη λιγότερο ικανοποιητική απόδοση μετά από ενδομυϊκή bolus έγχυση. Δυστυχώς η δεσφεροξαμίνη απορροφάται μέτρια από το ΓΕΣ και μεταβολίζεται γρήγορα στο πλάσμα. Για το λόγο αυτό πρέπει να χορηγείται με παρατεταμένη παρεντερική έγχυση και η συγκέντρωσή της στο πλάσμα φθάνει σε σταθερά επίπεδα μετά από περίπου 12 ώρες. Η οδός χορήγησης της όμως μπορεί να έχει

συνέπειες στη συμμόρφωση των ασθενών και την ποιότητα ζωής τους (Treadwell & Weissman, 2001; Mourad et al, 2003; Cappellini, 2005).

Δεφεριπρόνη χορηγούμενη από το στόμα σε δόση 75-100 mg/kg/24ωρο 3 φορές την ημέρα μια ώρα πριν τα γεύματα (Borgna-Pignatti, 2007).

Η υπεροχή της έναντι της δεσφεροξαμίνης φαίνεται να είναι η καλύτερη δέσμευση του καρδιακού σιδήρου (Hershko et al, 2004; Borgna-Pignatti et al, 2006; Telfer et al, 2006; Pennell et al, 2006) που είναι ακόμη εντονότερη όταν συνδυάζεται με δεσφεροξαμίνη (Kattamis A, 2005) οπότε αυτή η συνεργική δράση μπορεί να αναστρέψει ακόμη και εγκατεστημένη συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια σε ασθενείς με μείζονα MA (Wu et al, 2004). Η καλύτερη δράση αποδίδεται στο shuttle effect όπου η δεφεριπρόνη που έχει καλύτερη διαπερατότητα και προσβασιμότητα στο καρδιακό κύτταρο δεσμεύει το σίδηρο και τον παραδίδει στην κυκλοφορία όπου δεσμεύεται από τη δεσφεροξαμίνη. Ο ρόλος της συνδυασμένης χορήγησης δεφεριπρόνης-δεσφεροξαμίνης μένει να αποσαφηνιστεί καθώς μπορεί απλά να πρόκειται για την αθροιστική ενέργεια δυο φαρμάκων που έχουν διαφορετικούς τρόπους δράσης (Hershko, 2006). Εναλλασσόμενη χορήγηση δεφεριπρόνης 5 ημέρες την εβδομάδα και δεσφεροξαμίνης τις υπόλοιπες 2 ημέρες έχει επίσης προταθεί με ταυτόσημη αποτελεσματικότητα με τη συμβατική θεραπεία με δεσφεροξαμίνη για 5-7 ημέρες την εβδομάδα χωρίς αυξημένη τοξικότητα (Galanello et al, 2006).

Deferasirox (ICL 670) επίσης χορηγούμενο από το στόμα σε δόση 10-30 mg/kg σε μια εφάπαξ πρωινή δόση (Borgna-Pignatti, 2007).

Το Deferasirox ανήκει σε μια νέα ομάδα χηλικών ουσιών, τις N-υποκατεστημένες δις-υδροξυφαινυλ-τριαζόλες (Nick et al, 2003). Η ημίσεια ζωή των 6 έως 18 ωρών στο πλάσμα επιτρέπει τη χορήγησή του μόνο μια φορά την ημέρα αλλά ταυτόχρονα η παρατεταμένη κυκλοφορία του επιτρέπει τη δέσμευση του ασταθούς σιδήρου του πλάσματος που προέρχεται από τον μη-δεσμευμένο με τρανσφερρίνη σίδηρο (NTBI) (Daar et al, 2009). Ο μεταβολισμός και η αποβολή του χηλικού συμπλόκου γίνεται κυρίως με γλυκουρονιδίωση και στη συνέχεια με απέκκριση από το ήπαρ-χοληφόρα στα κόπρανα. Οι προκλινικές μελέτες έδειξαν την ικανότητά του να εισέρχεται και να απομακρύνει σίδηρο από τα κύτταρα (Nisbet et al 2003; Glickstein et al, 2005). Η

αποτελεσματικότητά του καταδείχτηκε σε αρκετές κλινικές μελέτες με ασθενείς με μεταγγισοεξαρτώμενη αναιμία (Piga et al 2006; Cappellini et al, 2006; Porter et al, 2008b).

Και τα τρία φάρμακα είναι αποτελεσματικά και η επιλογή για κάθε ασθενή πρέπει να εξατομικεύεται και να γίνεται με βάση

1. τη βαρύτητα της υπερφόρτωσης με σίδηρο
2. το όργανο όπου ο σίδηρος έχει κυρίως εναποτεθεί
3. τη συμμόρφωση στη θεραπεία
4. τις ανεπιθύμητες ενέργειες
5. το κόστος

Η αποσιδήρωση από του στόματος φαίνεται πιο ικανή να προσεγγίσει το σίδηρο του καρδιακού μυός και να μειώσει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών οξυγόνου. (Glickstein et al, 2006).

Η έναρξη της θεραπείας αποσιδήρωσης σε ασθενείς με EMA στηρίζεται όχι μόνο στο ποσό του φορτίου σιδήρου αλλά στο ρυθμό συσσώρευσής του και στη διάρκεια έκθεσης του ασθενούς στις βλαβερές συνέπειες της υπερφόρτωσης με σίδηρο (Olivieri & Brittenham, 1997).

Μελέτες σε ασθενείς με EMA έδειξαν ηπατικές βιοψίες όμοιες με αυτές ασθενών με μείζονα MA και αυξημένες τιμές ηπατικού σιδήρου παρά το γεγονός ότι η αύξηση στην τιμή της φερριτίνης ήταν μικρή (Fiorelli et al, 1990; Mancosu et al, 2000). Σύμφωνα με τα παραπάνω υπάρχει ένδειξη για εκτίμηση του φορτίου σιδήρου του ήπατος είτε με βιοψία είτε με μη επεμβατικές μεθόδους όπως το MRI (Anderson et al, 2001; Voskaridou et al, 2004) και το SQUID (Fischer et al, 2003) πριν την έναρξη μεταγγίσεων/αποσιδήρωσης ώστε να έχουμε πιο αξιόπιστη εκτίμηση του φορτίου του οργανισμού σε σίδηρο, σε σχέση με τη χρήση δεικτών όπως οι τιμές τρανσφερρίνης και φερριτίνης (Jensen, 2004). Ένδειξη για έναρξη αποσιδήρωσης υπάρχει όταν η συγκέντρωση σιδήρου στο ήπαρ (LIC) είναι >7 mg/gr ξηρού ιστού ήπατος (Kushner et al, 2001; Porter, 2001).

### **Χορήγηση παραγόντων που αυξάνουν την παραγωγή HbF**

Η αύξηση της σύνθεσης HbF συνεισφέρει στην ανακούφιση των συμπτωμάτων αναιμίας και βελτιώνει την κλινική εικόνα ασθενών με EMA (Olivieri, 1996). Η κλινική εικόνα της EMA μπορεί

να βελτιωθεί σημαντικά σαν αποτέλεσμα βελτίωσης της ανισορροπίας των α/μη-α αλυσίδων της αιμοσφαιρίνης. Από τα πολλά φάρμακα που έχουν δοκιμασθεί, σε μια προσπάθεια επανενεργοποίησης της σύνθεσης των γ-αλυσίδων αιμοσφαιρίνης, οι περισσότερες μελέτες έχουν γίνει με την υδροξουρία (HU). Η υδροξουρία αποτελεί ένα χημειοθεραπευτικό παράγοντα ειδικό για την S-φάση του κυτταρικού κύκλου που έχει την ιδιότητα να προκαλεί αύξηση της HbF. Ο τρόπος δράσης της έγκειται στο ότι προτιμά να καταστρέφει διαιρούμενα κύτταρα επιτρέποντας έτσι την ανάδυση αρχέγονων κυττάρων της ερυθράς σειράς που είναι περισσότερο προορισμένα να παράγουν αιμοσφαιρίνη F. Επίσης μπορεί να έχει ένα γενικότερο ρόλο στο να αυξάνει την παραγωγή σφαιρίνης (Atweh & Loukoroulos, 2001).

Η HU παρότι έχει εγκριθεί από το FDA μόνο για χρήση στη δρεπανοκυτταρική αναιμία έχει χορηγηθεί διεθνώς και σε ασθενείς με MA. Υπάρχουν δημοσιευμένα αποτελέσματα χορήγησης του φαρμάκου σε μεγάλες σειρές ασθενών με EMA από το Ιράν (Karimi et al, 2005) και την Ινδία (Dixit et al, 2005; Panigrahi et al, 2005). Ειδικά τα αποτελέσματα στους ασθενείς από το Ιράν ήταν εντυπωσιακά καθώς οι περισσότεροι έπαψαν να είναι μεταγγισοεξαρτώμενοι. Σε αμετάγγιστους ασθενείς με EMA η συγκέντρωση της ολικής αιμοσφαιρίνης αυξήθηκε. Προηγούμενες μελέτες στην Ευρώπη ανέφεραν μια σταθερή αύξηση στον ερυθροκυτταρικό όγκο και την HbF αλλά μια μικρή επίδραση στην ολική συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης. Η συνύπαρξη α-ελλειμμάτων MA και ΧμnI-<sup>G</sup> πολυμορφισμού είναι θετικοί προγνωστικοί παράγοντες για καλή ανταπόκριση στην HU (Panigrahi et al, 2005). Σχεδόν καθολικά αναφέρεται βελτίωση στην αίσθηση “καλής υγείας” των ασθενών, γεγονός που ενδεχομένως να οφείλεται στη σημαντική ελάττωση της μη-αποτελεσματικής ερυθροποίησης (Loukoroulos et al, 1998).

## **Ερυθροποιητίνη**

Η χορήγηση ερυθροποιητίνης αυξάνει επίσης την παραγωγή γ-αλυσίδων. Σε σπληνεκτομηθέντες ασθενείς με EMA παρατηρήθηκε μια σημαντική δοσοεξαρτώμενη αύξηση της ερυθροποίησης χωρίς αύξηση της HbF, του MCV και του MCH και χωρίς μεταβολή του πηλικού α/μη α αλυσίδων (Bohl et al, 2000). Υπάρχουν μελέτες χορήγησης ερυθροποιητίνης σε ασθενείς με EMA (Bourantas et al, 1997; Chaidos et al, 2004) όπου παρατηρείται αύξηση της τιμής



αιμοσφαιρίνης σε υποομάδα ασθενών, αλλά ο αριθμός των ασθενών είναι πολύ μικρός, η δράση παροδική, το φάρμακο ακριβό και η υποδόρια χορήγηση δύσκολη στη συμμόρφωση γι' αυτό και η χρήση του φαρμάκου είναι περιορισμένη.

### **Μεταμόσχευση μυελού των οστών (ΜΜΟ)**

Μεταμόσχευση μυελού των οστών γίνεται σπάνια σε ασθενείς με ΕΜΑ. Η θνησιμότητα από ΜΜΟ ακόμη και με τις καλύτερες συνθήκες αγγίζει το 5% οπότε η ΜΜΟ απευθύνεται κυρίως σε σοβαρά πάσχοντες μεταγγισοεξαρτώμενους ασθενείς. Τουλάχιστον 2 ασθενείς με ΕΜΑ που είχαν αναπτύξει αυτο /αλλοανοσοποίηση μεταμοσχεύτηκαν επιτυχώς ο ένας από ΗΛΑ-ταυτόσημο αδελφό και ο άλλος από μη συγγενικό δότη με πλήρη διόρθωση της συγγενούς και της επίκτητης διαταραχής. (De Stefano et al, 1999).

## Μεταβολισμός του σιδήρου

### Η βιολογική σημασία του σιδήρου

Ο σίδηρος (Fe) είναι το τέταρτο σε αφθονία μέταλλο στο φλοιό της γης. Είναι ελάχιστα διαλυτός και έτσι οι ζωντανοί οργανισμοί έχουν αναπτύξει ιδιαίτερες μεθόδους απορρόφησης και μεταβολισμού του. Με ελάχιστες εξαιρέσεις όλοι οι οργανισμοί από τους πιο στοιχειώδεις έως τους πιο περίπλοκους χρειάζονται Fe για να διατηρήσουν μεγάλο αριθμό βιολογικών αντιδράσεων. Σ' αυτές περιλαμβάνονται ο κυτταρικός μεταβολισμός όπως η σύνθεση DNA, RNA και πρωτεϊνών, η μεταφορά ηλεκτρονίων, η κυτταρική αναπνοή, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση και η ρύθμιση έκφρασης πολλών γονιδίων.

Ο Fe επιδρά στην κυτταρική διαφοροποίηση και στον πολλαπλασιασμό επηρεάζοντας τη μεταγραφή γονιδίων όπως η πρωτεϊνική κινάση C-β, το p21 και η όξινη φωσφατάση. Ένζυμα όπως οι οξειδάσες, οι καταλάσες, οι υπεροξειδάσες, τα κυτοχρώματα, οι ριβονουκλεοτιδικές αναγωγάσες, οι ακονιτάσες και οι συνθετάσες του νιτρικού οξέως έχουν ως βασικό λειτουργικό τους συστατικό το Fe. Τα σιδηρούχα αυτά ένζυμα ενοχοποιούνται στην εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων που δε σχετίζονται στενά με νοσήματα μεταβολισμού του σιδήρου όπως νευροεκφυλιστικά νοσήματα, η γήρανση και η καρκινογένεση. Στον άνθρωπο, υψηλά επίπεδα Fe βρίσκονται στα ερυθρά αιμοσφαίρια, στο ήπαρ, στα μακροφάγα και στον εγκέφαλο. Ακόμα και ο σχηματισμός της μυελίνης και του νευρωνικού δένδριτικού δικτύου απαιτούν τη συμμετοχή σιδήρου, η δε διατήρηση της ομοιόστασης του είναι σημαντική για την εξασφάλιση φυσιολογικών εγκεφαλικών λειτουργιών όπως η μάθηση και η μνήμη.

Η μεγάλη βιολογική αξία του Fe οφείλεται στις χημικές του ιδιότητες. Έχει την ικανότητα να δίνει αλλά και να δέχεται ηλεκτρόνια μεταπίπτοντας εύκολα από την αναχθείσα ( $Fe^{2+}$ ) στην οξειδωμένη του μορφή ( $Fe^{3+}$ ). Συμμετέχει στην αντίδραση Haber-Weis-Fenton όπου η αναγωγή του  $O_2$  από το  $Fe^{2+}$  οδηγεί στο σχηματισμό υπεροξειδικού ανιόντος ( $O_2^{\cdot-}$ ) το οποίο στη συνέχεια σχηματίζει ρίζες υδροξυλίου:

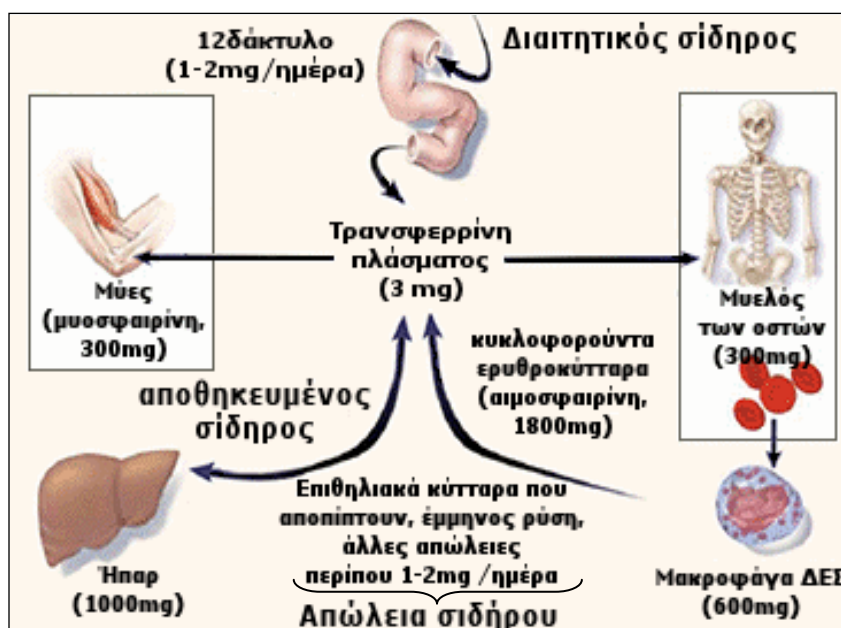
<b>Αντίδραση Haber-Weis-Fenton</b>	$\text{Fe}^{2+} + \text{O}_2 \rightleftharpoons \text{Fe}^{3+} + \text{O}^{2\cdot-}$ $2 \text{O}^{2\cdot-} + 2\text{H}^+ \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightleftharpoons \text{OH}^\bullet + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$
----------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Με αυτόν τον τρόπο παράγονται ελεύθερες ρίζες που μπορεί να οδηγήσουν στην οξειδωτική βλάβη πρωτεϊνών, νουκλειικών οξέων, υδατανθράκων και λιπιδίων και στον κυτταρικό θάνατο.

Για αυτό το λόγο η διατήρηση της ομοιόστασης του Fe είναι ιδιαίτερα σημαντική για ισορροπία μεταξύ απορρόφησης και απέκκρισης σιδήρου ώστε να συντηρούνται οι βιοχημικές δραστηριότητες και να αποφεύγονται οι δυσάρεστες συνέπειες από υπερφόρτωση (Lieu et al, 2001; Aisen et al, 2001; Testa, 2002).

### Κατανομή του σιδήρου στον άνθρωπο

Οι αποθήκες σιδήρου σε έναν ενήλικα άνδρα υπολογίζονται γύρω στα 35-45mg/kg σωματικού βάρους ενώ σε προεμμηνόπαυσιακές γυναίκες είναι μικρότερες λόγω της απώλειας του με την έμμηνο ρύση. Το 60-70% του συνολικού σιδήρου περιέχεται στην αιμοσφαιρίνη και ένα 10% στη μυοσφαιρίνη, στα κυτοχρώματα και σε άλλα ένζυμα. Το υπόλοιπο 20-30% είναι αποθηκευμένο στη φερριτίνη και την αιμοσιδηρίνη των ηπατοκυττάρων και των κυττάρων του ΔΕΣ (Cook et al, 1973; Andrews, 1999).



Σχήμα 11:  
Κατανομή  
σιδήρου στους  
ενήλικες.

Από το Fe της τροφής απορροφούνται 1-2 mg την ημέρα, ενώ ανάλογο ποσό αποβάλλεται με τη χολή, τα ούρα και τις ημερήσιες απώλειες κυττάρων του εντέρου και του δέρματος. Στον ενήλικα συνολικά αποβάλλεται 1 mg σιδήρου ενώ σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας το ποσό μπορεί να φθάσει τα 2 mg. Το ισοζύγιο σιδήρου διατηρείται κατά βάση με τη ρύθμιση της απορρόφησης διότι ο μηχανισμός αποβολής έχει ελάχιστες δυνατότητες αυξομείωσης (Σχήμα 11) (Andrews, 1999; Wick et al, 2000).

## Εντερική απορρόφηση του σιδήρου

Η απορρόφηση του σιδήρου επιτελείται κυρίως στο λεπτό έντερο. Ο Fe απορροφάται από τα ώριμα απορροφητικά κύτταρα των λαχνών (εντεροκύτταρα) και απελευθερώνεται από τη βασική τους μεμβράνη στην κυκλοφορία.

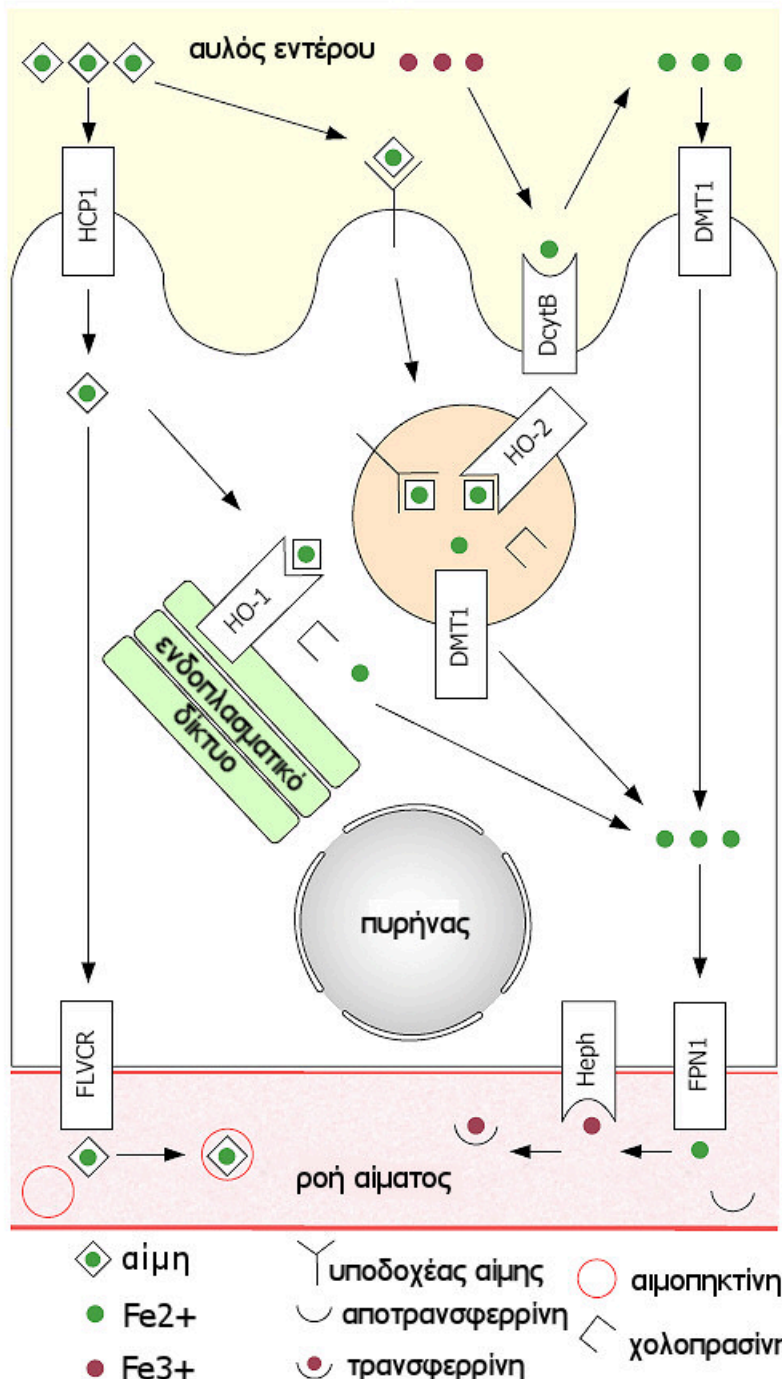
Ο Fe στις τροφές βρίσκεται κυρίως σε δυο μορφές: είτε συνδεδεμένος με την αίμη είτε ανόργανος. Τα 2/3 του απορροφούμενου Fe είναι συνδεδεμένα με την αίμη καθώς έτσι απορροφάται αποτελεσματικότερα.

Ο μηχανισμός απορρόφησης του συνδεδεμένου με την αίμη Fe είναι ακόμη ελάχιστα κατανοητός. Η αιμοσφαιρίνη διασπάται ενζυμικά στον εντερικό αυλό και η αίμη εισέρχεται στο εντεροκύτταρο σαν άθικτο μόριο μεταλλοπορφυρίνης (Conrad et al, 1967). Από έρευνες φάνηκε ότι η είσοδος της αίμης γίνεται με διευκολυνόμενη μεταφορά και όχι με απλή διάχυση. Αυτή τη στιγμή υπάρχουν δυο επικρατούσες υποθέσεις: 1/ η παλαιότερη στην οποία πιστεύεται ότι η αίμη ενδοκυτταρώνεται μέσω υποδοχέα και 2/ η πρόσφατη που βασίζεται στην ανακάλυψη ενός μεταφορέα της αίμης που τη μεταφέρει απευθείας από τον αυλό του εντέρου στο κυτταρόπλασμα (Σχήμα 12) (West & Oates, 2008).

Ο διαιτητικός ανόργανος Fe βρίσκεται κυρίως με τη μορφή  $Fe^{3+}$ . Ο  $Fe^{3+}$  είναι αδιάλυτος σε  $pH > 3$  και προκειμένου να μπορεί να απορροφηθεί αποτελεσματικά θα πρέπει να αναχθεί σε  $Fe^{2+}$  ή να συνδεθεί με αμινοξέα ή σάκχαρα. Η απορρόφηση του σιδήρου γίνεται στο εγγύς τμήμα του 12δακτύλου όπου πολωμένα κύτταρα διατάσσονται σε λάχνες που προέχουν στον εντερικό αυλό ώστε να μεγιστοποιείται η επιφάνεια απορρόφησης. Κάθε απορροφητικό κύτταρο ή εντεροκύτταρο διαθέτει επίσης μικρολάχνες. Ο  $Fe^{3+}$  στον αυλό του εντέρου ανάγεται σε  $Fe^{2+}$  παρέχοντας πρωτόνια,

απαραίτητα για τη μεταφορά του στην απορροφητική μεμβράνη. Η διαδικασία αυτή προάγεται από τη σιδηροαναγωγή Dcytb, ένα ομόλογο του κυτοχρώματος B561 που χρησιμοποιεί το ασκορβικό οξύ σαν συμπάρογοντα (McKie et al, 2001).

Ο  $Fe^{2+}$  εισέρχεται στα εντεροκύτταρα μέσω ενός διαμεμβρανικού μεταφορέα δισθενών μετάλλων του DMT1 (Divalent Metal Transporter 1 ή Nramp2) που βρίσκεται στις



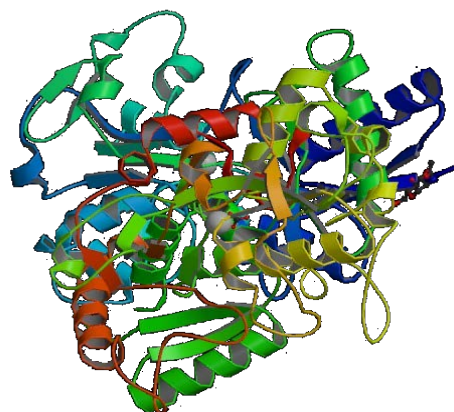
Ο Fe που είναι συνδεδεμένος με την αίμη κατά μια υπόθεση απορροφάται με ενδοκύτωση μέσω υποδοχέα. Μέσα στα ενδοσώματα και/ή λυσοσώματα η αίμη διασπάται ενζυματικά από την οξυγενάση της αίμης 2 (HO-2) απελευθερώνοντας  $Fe^{2+}$  και παράγοντας χολοπρασίνη. Ο  $Fe^{2+}$  στη συνέχεια μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα από τον DMT1. Σύμφωνα με άλλο μηχανισμό ο Fe που είναι συνδεδεμένος με την αίμη μπορεί επίσης να μεταφερθεί απευθείας στο κυτταρόπλασμα από τον PCFT/HCP1 μεταφορέα (Shayeghi et al, 2005; Qiu et al, 2006). Η άθικτη αίμη μπορεί να μεταφερθεί διαμέσω της βασικής μεμβράνης από τον μεταφορέα FLVCR (Quigley et al, 2004) όπου και συνδέεται με την κυκλοφορούσα αιμοπηκτίνη. Εναλλακτικά, η αίμη μπορεί να καταβολιστεί σε μη συνδεδεμένο με αίμη  $Fe^{2+}$  και χολοπρασίνη από την οξυγενάση της αίμης 1 (HO-1) που βρίσκεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Ο  $Fe^{2+}$  που απελευθερώνεται μέσα στο εντεροκύτταρο, ανεξάρτητα από τον τρόπο που προήλθε, τελικά μεταφέρεται στα αιμοφόρα αγγεία από τη φερροπορτίνη (FPN1).

Σχήμα 12: Οδοί απορρόφησης του σιδήρου στο εντεροκύτταρο.

κρύπτες των μικρολαχνών. Ο DMT1 είναι μεταφορέας και άλλων μετάλλων όπως  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  και  $Pb^{2+}$  αλλά η σημασία του έχει τεκμηριωθεί μόνο για τον  $Fe^{2+}$ . Μετά την είσοδο του στο εντεροκύτταρο ο Fe είτε αποθηκεύεται στη φερριτίνη είτε μεταφέρεται στο πλάσμα από μια άλλη πρωτεΐνη, τη φερροπορτίνη (FPN -ferroportin, ή επίσης ονομαζόμενη IREG1, MTP1, SCLC39A1 και τώρα SLC40A1). Η φερροπορτίνη εδρεύει στη βασική μεμβράνη των εντεροκυττάρων αλλά βρίσκεται επίσης στα ηπατοκύτταρα και στα μακροφάγα του ΔΕΣ. Η μεταφορά διευκολύνεται από χαλκοεξαρτώμενες σιδηροξειδάσες που περιλαμβάνουν την σερουλοπλασμίνη και την ομόλογό της πρωτεΐνη ηφαιστίνη (hephaestin) που απαντάται κυρίως στο λαχνωτό επιθήλιο του εντέρου. Πριν λίγα χρόνια πίστευαν ότι οι σιδηροξειδάσες χρησιμεύουν απλά στην οξείδωση του  $Fe^{2+}$ . Πρόσφατα όμως βρέθηκε ότι η σερουλοπλασμίνη χρησιμεύει επίσης στη σταθεροποίηση της φερροπορτίνης (De Domenico et al, 2007).

### **Μεταφορά του σιδήρου- Ο κύκλος της τρανσφερρίνης-TfR1**

Ο Fe μεταφέρεται στους ιστούς συνδεδεμένος με μια πρωτεΐνη του πλάσματος που ονομάζεται τρανσφερρίνη (Transferrin- Tf). Η τρανσφερρίνη είναι μια γλυκοπρωτεΐνη 80 kDa μονής αλυσίδας που παρουσιάζει ιδιαίτερη χημική συγγένεια με τον  $Fe^{3+}$ . Συντίθεται κυρίως στο ήπαρ και σε άλλα όργανα όπως ο εγκέφαλος, οι όρχεις και ο μαστός κατά τη γαλουχία. Κάθε μόριο τρανσφερρίνης έχει δυο θέσεις πρόσδεσης σιδήρου με τη χημική συγγένεια της με το Fe να εξαρτάται από το pH έτσι ώστε ο Fe να απελευθερώνεται σε  $pH < 6,5$ . Στο πλάσμα κυκλοφορεί με 2 μορφές: είτε μη συνδεδεμένη με Fe (αποτρανσφερρίνη) είτε συνδεδεμένη τρανσφερρίνη με ένα ή δυο μόρια Fe (Σχήμα 13). Η τρανσφερρίνη επιτελεί ουσιαστικά τρεις λειτουργίες: α/ συνδέεται με τον κατά βάση αδιάλυτο σε ουδέτερο pH  $Fe^{3+}$  αυξάνοντας έτσι τη

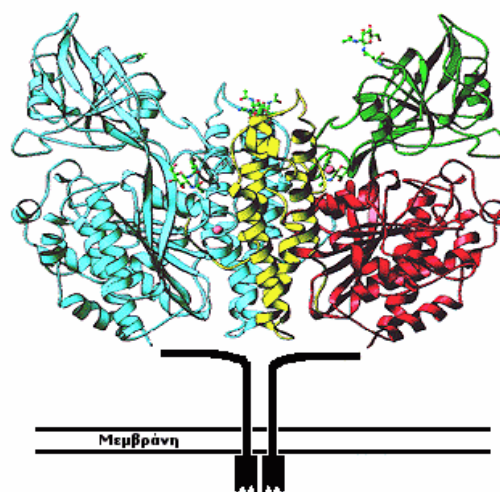


Σχήμα 13: Κρυσταλλική δομή Tf



διαλυτότητά του, β/ ενώνεται με μεγάλη χημική συγγένεια με τον  $Fe^{3+}$  μειώνοντας τη δημιουργία ελεύθερων ριζών και γ/ μεταφέρει το Fe στα κύτταρα συνδεδεμένος με τους υποδοχείς τρανσφερίνης 1 και 2 (Testa, 2002).

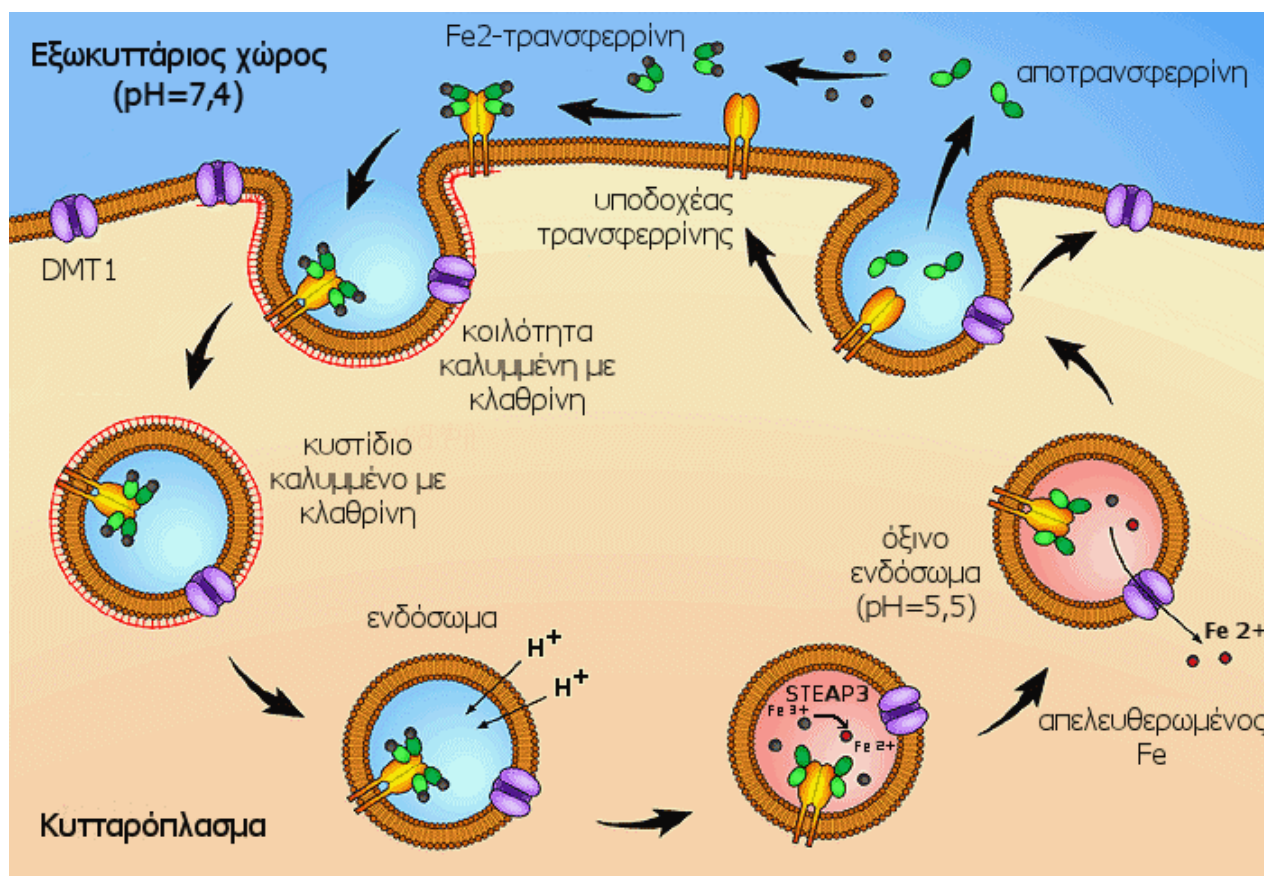
Η πρόσληψη του σιδήρου από την πλειοψηφία των κυττάρων, με εξαίρεση τα εντεροκύτταρα, γίνεται με ενδοκυττάρωση μέσω της σύνδεσης της τρανσφερίνης με τον ειδικό υποδοχέα TfR1 (Transferrin Receptor 1) που βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη. Ο TfR1 είναι μια διμερής πρωτεΐνη που αποτελείται από 2 όμοιες υποομάδες (Σχήμα 14). Η τρανσφερίνη συνδέεται με τον TfR1 με στοιχειομετρία 2:2. Ο TfR1 εκφράζεται σε όλους τους ιστούς με εξαίρεση τα ώριμα ερυθροκύτταρα. Υψηλά επίπεδα TfR1 ανευρίσκονται στα άωρα κύτταρα της ερυθράς σειράς, στα ηπατοκύτταρα, στον πλακούντα και σε ταχέως διαιρούμενα κύτταρα. Η έκφραση του TfR1 εξαρτάται από την ενδοκυττάρια συγκέντρωση του σιδήρου και η ρύθμιση της γίνεται από τις πρωτεΐνες IRP και IRE.



Σχήμα 14: Κρυσταλλική δομή TfR

Η τρανσφερίνη συνδέεται με τον υποδοχέα της στην επιφάνεια του κυττάρου. Για να ξεκινήσει ο κύκλος της τρανσφερίνης θα πρέπει πρώτα να δημιουργηθούν περιοχές κάτω από την κυτταρική μεμβράνη καλυμμένες με κλαθρίνη οι οποίες στη συνέχεια θα δώσουν γέννηση σε κυστίδια καλυμμένα με κλαθρίνη που ουσιαστικά οδηγούν σε ενδοκυττάρωση του συμπλέγματος Tf-TfR1. Μετά την αφαίρεση της κλαθρίνης, στο εσωτερικό του σχηματιζόμενου ενδοσωματίου, μια αντλία πρωτονίων που βρίσκεται στη μεμβράνη του, ελαττώνει το pH και οδηγεί στην απελευθέρωση του σιδήρου από την τρανσφερίνη. Ο ελεύθερος  $Fe^{3+}$  στη συνέχεια ανάγεται από τη σιδηροαναγωγή STEAP3 (six-transmembrane epithelial antigen of prostate 3) σε  $Fe^{2+}$  που μπορεί να εξέλθει από το ενδόσωμα μέσω του μεταφορέα DMT1 στο κυτταρόπλασμα. Εκεί ο Fe αποθηκεύεται ως φερριτίνη ή αιμοσιδηρίνη ενώ ειδικά στα ερυθρά ο περισσότερος κινείται προς

τα μιτοχόνδρια για την προσθήκη του στην πρωτοπορφυρίνη προκειμένου να σχηματιστεί αίμη. Το σύμπλεγμα TfR1-αποτρανσφερρίνης μεταφέρεται ξανά στην κυτταρική μεμβράνη όπου η αποτρανσφερρίνη αποδίδεται στην κυκλοφορία και ο TfR1 επαναχρησιμοποιείται (Σχήμα 15).



Σχήμα 15: Σχηματική παράσταση του κύκλου της τρανσφερρίνης-TfR1

Μέσα στα κύτταρα ο Fe κατανέμεται σε 3 διαμερίσματα:

1. ένα διακινούμενο ασταθές διαμέρισμα ελεύθερου σιδήρου
2. ένα λειτουργικό διαμέρισμα όπου τα μιτοχόνδρια έχουν έναν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο και
3. ένα διαμέρισμα αποθήκευσης.

Το μεγαλύτερο μέρος του σιδήρου οδηγείται προς τα μιτοχόνδρια για την παραγωγή κυρίως της αίμης και σιδηροθειούχων συμπλόκων που παίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των κύτταρων (Napier et al, 2005). Για να εισέλθει ο Fe στα μιτοχόνδρια θα πρέπει να διέλθει μια αδιαπέραστη στα ιόντα



μεμβράνη. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω του πρόσφατα ταυτοποιημένου μιτοχονδριακού μεταφορέα σιδήρου που ονομάζεται μιτοφερρίνη (mitoferrin ή αλλιώς SLC25A37) και που είναι καθοριστικός για την τροφοδοσία σιδήρου στη σιδηροχηλάση ώστε να συνδεθεί στην πρωτοπορφυρίνη IX προς παραγωγή αίμης (Andrews, 2008).

### **Μη-δεσμευμένος με τρανσφερρίνη σίδηρος**

Μη-δεσμευμένος με την τρανσφερρίνη Fe (NTBI – Nontransferrin bound iron) ανευρίσκεται σε καταστάσεις υπερφόρτωσης με Fe όπως σε επανειλημμένες μεταγγίσεις, σε αιμοσφαιρινοπάθειες, στη συγγενή αιμοχρωμάτωση αλλά και σε ασθενείς που υποβάλλονται σε χημειοθεραπεία ή σε επέμβαση bypass και γενικά σε καταστάσεις όπου μεγάλες ποσότητες Fe απελευθερώνονται στην κυκλοφορία μετά από καταβολισμό της Hb. Στις περιπτώσεις αυτές το ποσό του Fe υπερβαίνει τις δυνατότητες σύνδεσης και μεταφοράς από την τρανσφερρίνη και παραμένει ελεύθερο στο πλάσμα. Αρχικά, ο NTBI αναζητήθηκε και ανιχνεύτηκε σε ασθενείς με β-ΜΑ και ΕΜΑ με υπερφόρτωση σιδήρου και κορεσμό τρανσφερρίνης  $\geq 100\%$  (Hershko et al, 1978). Με την αύξηση της ευαισθησίας των μεθόδων ανίχνευσης ο NTBI μετρήθηκε στον ορό και σε περιπτώσεις κορεσμού της τρανσφερρίνης μικρότερου από το 80% (Breuer et al, 2000a). Ο NTBI μπορεί να φτάσει σε ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα. Η κάθαρσή του από το πλάσμα γίνεται γρήγορα από το ήπαρ και άλλα όργανα (Craven et al, 1987) με αποτέλεσμα τη συσσώρευση και την τοξική βλάβη των ιστών μέσω παραγωγής ελευθέρων ριζών (Hershko et al, 1998a; Breuer et al, 2000b). Πιστεύεται ότι ο NTBI στο πλάσμα δεν είναι υπερβολικά τοξικός. Αυτό που προκαλεί τις βλάβες είναι το ασταθές τμήμα του που εισέρχεται στα κύτταρα. Πρόσφατα διαπιστώθηκε ότι ο ασταθής Fe του πλάσματος (LPI- labile plasma iron) που είναι οξειδοαναγωγικός, χηλικός και ικανός να διεισδύει στα όργανα και να προκαλεί ιστική υπερφόρτωση Fe είναι συστατικό του NTBI (Esposito et al, 2003).

### **Χρησιμοποίηση και ανακύκλωση του σιδήρου**

Ο Fe είναι απαραίτητος για πολλές κυτταρικές διεργασίες αλλά η μεγαλύτερη ποσότητά του διατίθεται στην ερυθροποίηση και κυρίως τη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης. Μιας και ο Fe που

λαμβάνεται με την τροφή είναι περίπου 2mg την ημέρα, το μεγαλύτερο ποσοστό του απαιτούμενου για ερυθροποίηση σιδήρου ανακυκλώνεται και προέρχεται από τη φαγοκυττάρωση των γερασμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων στα μακροφάγα του ΔΕΣ στον σπλήνα την αποσύνθεση της αιμοσφαιρίνης και ελευθέρωση σιδήρου (Nemeth & Ganz, 2006).

Στα μακροφάγα όπως και στα εντεροκύτταρα η αίμη αποδομείται από την οξυγενάση της αίμης. Ο Fe που απελευθερώνεται εξέρχεται με τη βοήθεια της φερροπορτίνης και συνδέεται με την τρανσφερρίνη στο πλάσμα. Τα πρόδρομα κύτταρα της ερυθράς σειράς προσλαμβάνουν το Fe μέσω του TfR1 και τον προσαρτούν στην αιμοσφαιρίνη. Μετά από περίπου 120 ημέρες, τα γερασμένα πλέον ερυθρά φαγοκυτταρώνονται από τα μακροφάγα και ο κύκλος ξαναρχίζει. Η διαθεσιμότητα Fe καθορίζει και το επίπεδο σύνθεσης αίμης. Όταν αυξάνεται ο ρυθμός ερυθροποίησης, διεγείρεται η απορρόφηση Fe από τις τροφές (Frazer et al, 2004) μέσω της επιδίνης όπως θα αναφερθεί παρακάτω. Σε αυτό συνάδει και η εύρεση στα μακροφάγα υψηλών επιπέδων φερροπορτίνης που δρα ως υποδοχέας της επιδίνης.

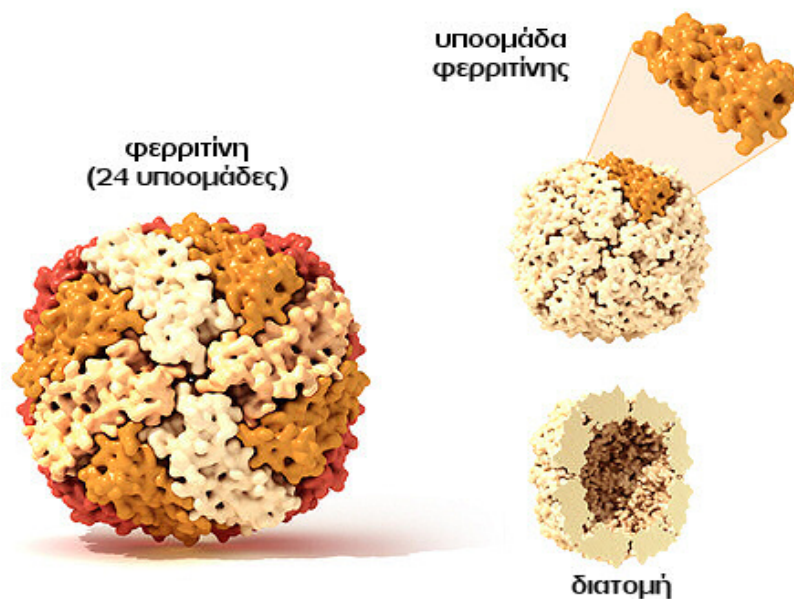
Τα μυϊκά κύτταρα χρειάζονται επίσης Fe για την παραγωγή μιοσφαιρίνης, που αποτελεί το 10-15% του συνολικού ποσού Fe στον άνθρωπο (Andrews, 1999). Ο μηχανισμός όμως της χρησιμοποίησης Fe για τη σύνθεση της μιοσφαιρίνης είναι ελάχιστα γνωστός.

## **Αποθήκευση**

Το ήπαρ είναι το κύριο όργανο εναπόθεσης και αποθήκευσης σιδήρου. Όταν έχουμε πληρότητα Fe ένα τμήμα αυτού αποθηκεύεται στα μακροφάγα του ήπατος, του σπληνός και του μυελού των οστών. Ο αποθηκευμένος Fe στα ηπατοκύτταρα και στα μακροφάγα μπορεί να κινητοποιηθεί για να καλυφθούν οι ερυθροποιητικές και κυτταρικές ανάγκες όταν τα επίπεδα του Fe είναι χαμηλά. Το μεγαλύτερο μέρος του Fe στο ήπαρ είναι συνδεδεμένο με τη φερριτίνη ή αιμοσιδηρίνη (περίπου 80%), ενώ 5% είναι συνδεδεμένο με την τρανσφερρίνη, 2% με την αίμη και το υπόλοιπο βρίσκεται στις ασταθείς αποθήκες Fe.

Η φερριτίνη είναι μια ετεροπολυμερής πρωτεΐνη 450 kDa που αποτελείται από 24 υποομάδες H- (βαριών, 21 kDa) και L- (ελαφρών, 19 kDa) αλυσίδων που η αναλογία τους διαφέρει στους διάφορους ιστούς. Στερεοδομικά οι αλυσίδες σχηματίζουν ένα

περίβλημα (αποφερριτίνη) μέσα στο οποίο μπορούν να αποθηκευτούν μέχρι και 4500 μόρια Fe ανά μόριο φερριτίνης (Crichton, 1971; Theil, 1990) (Σχήμα 16).



U.S. National Library of Medicine

Σχήμα 16: Η δομή του μορίου της φερριτίνης

Η Η-υποομάδα που έχει δράση σιδηροξειδάσης, βρίσκεται σε ιστούς όπου χρησιμοποιείται περισσότερο ο Fe (καρδιά, ερυθροκύτταρα) ενώ η L-υποομάδα, που προάγει τις βιοχημικές αντιδράσεις που σχετίζονται με την εναπόθεση του σιδήρου στην εσωτερική κοιλότητα, σε ιστούς όπου αποθηκεύεται Fe (ήπαρ, σπλήνας). Η σύνθεση της φερριτίνης προάγεται από τα υψηλά επίπεδα ενδοκυττάριου Fe και καταστέλλεται σε έλλειψη του. Η ρύθμιση αυτή επιτυγχάνεται μέσω του συστήματος IRE-IRP στο οποίο γίνεται εκτενέστερη αναφορά παρακάτω. Επίσης η μεταγραφή της ρυθμίζεται από κυτοκίνες όπως η ιντερφερόνη- $\gamma$ , και οι ιντερλευκίνες 1 και 6 (Harrison & Arosio, 1996).

Σε περίσσεια Fe, η φερριτίνη μετατρέπεται στα λυσοσώματα σε αιμοσιδηρίνη, που είναι ένα πρωτεϊνικό κατάλοιπο με εναποθέσεις σιδήρου, αδιάλυτο στο νερό. Συνήθως βρίσκεται στο σπλήνα, στο μυελό των οστών και στα κύτταρα Kupffer. Τόσο η φερριτίνη όσο και η αιμοσιδηρίνη είναι αυξημένες στην κληρονομική αιμοχρωμάτωση και στη MA (Harrison & Arosio, 1996).

Πρόσφατα βρέθηκε και ένας νέος τύπος υποομάδας φερριτίνης, η "μιτοχονδριακή φερριτίνη" που είναι ένα ομοπολυμερές με κέντρο που έχει ιδιότητες σιδηροξειδάσης όπως η

H-υποομάδα. Φαίνεται ότι παίζει κάποιο ρόλο στην κυτταρική ρύθμιση της ομοιοστασίας του σιδήρου μιας και η υπερέκφρασή της οδηγεί σε αυξημένη συγκράτηση σιδήρου στα μιτοχόνδρια, μείωση των κυτταροπλασματικών φερριτινών και αύξηση της έκφρασης του TfR1 (Levi et al, 2001).

## **Απέκκριση σιδήρου**

Μόνο ένα μικρό ποσό Fe απεκκρίνεται καθημερινά με τα ούρα και τα κόπρανα. Ειδικός μηχανισμός που να επάγει την απέκκριση Fe δεν υπάρχει. Σίδηρος χάνεται επίσης με το αίμα κατά την έμμηνο ρύση. Το μεγαλύτερο μέρος του Fe στον οργανισμό ανακυκλώνεται από τα κύτταρα του ΔΕΣ στο σπλήνα και τα κύτταρα Kupffer στο ήπαρ (Miret et al, 2003).

## **Ρύθμιση του μεταβολισμού του σιδήρου**

Καθώς δεν υπάρχει ρυθμιστικός μηχανισμός για την απέκκριση του σιδήρου, για την ομοιοστασία του απαιτείται μια λεπτή ισορροπία μεταξύ των λειτουργιών απορρόφησης, μεταφοράς, αποθήκευσης και χρήσης του Fe. Αυτό επιτυγχάνεται με διάφορους μηχανισμούς που ακόμα δεν έχουν διευκρινιστεί εντελώς. Η έκφραση μορίων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό του σιδήρου ρυθμίζεται τόσο κατά τη μεταγραφή όσο και μέτα-μεταγραφικά μέσω αναδραστικού μηχανισμού ρύθμισης σε απάντηση του επιπέδου του κυτταρικού σιδήρου και άλλων ερεθισμάτων όπως η υποξία, το NO και το οξειδωτικό stress. Μπορεί επίσης να υπάρξει ρύθμιση μέσω μετα-μεταφραστικών μηχανισμών που αφορούν την έκφραση πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες που ενέχονται στη ρύθμιση της ομοιοστασίας του σιδήρου και αυτές με κάποια πιθανή ρυθμιστική δράση αναφέρονται παρακάτω.

### **A. Μοριακή ρύθμιση του μεταβολισμού του σιδήρου**

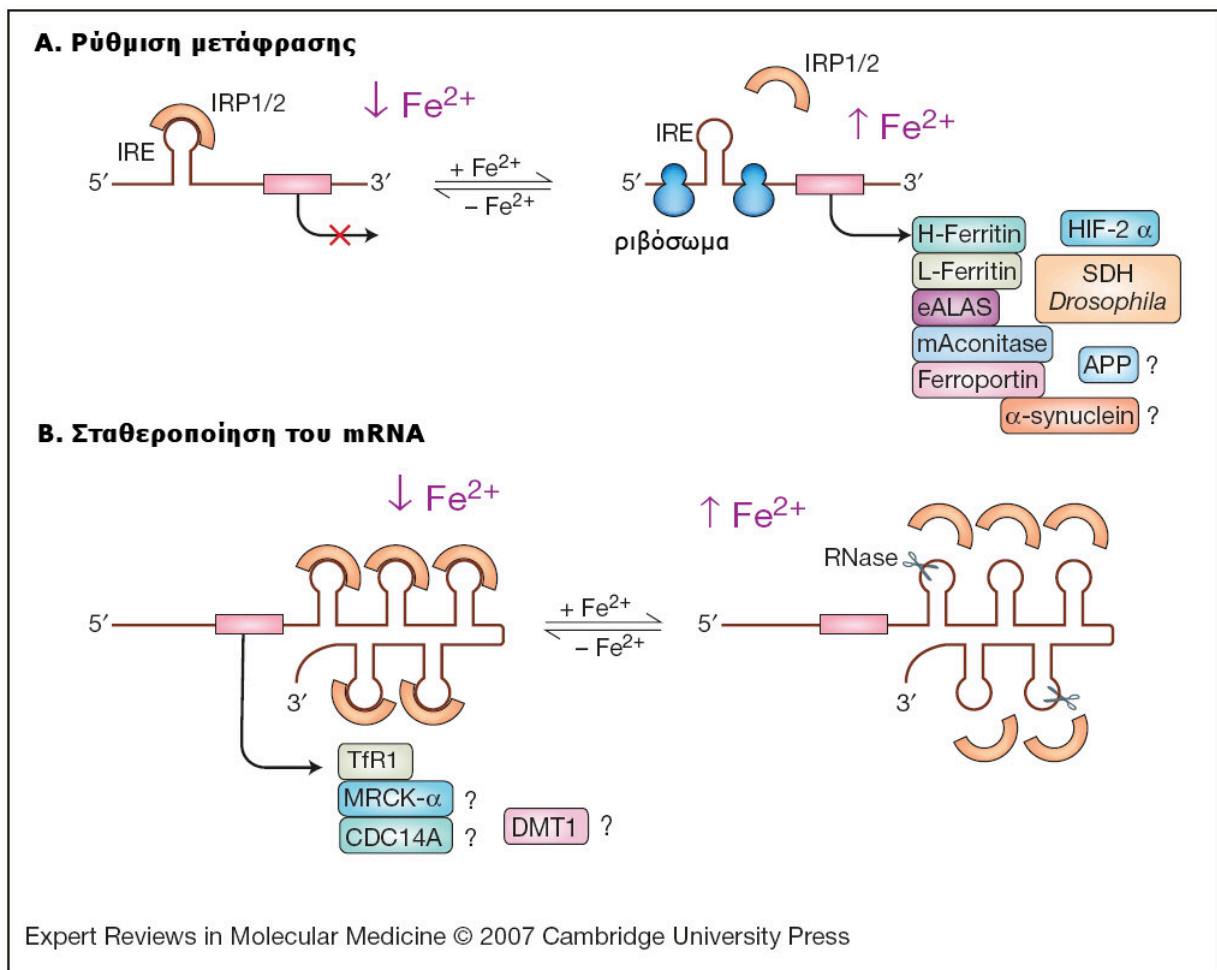
#### **1. Μετά-μεταγραφική ρύθμιση**

Η ενδοκυττάρια ομοιοστασία του σιδήρου διατηρείται, τουλάχιστον εν μέρει, μέσω ενός λεπτού μετα-μεταγραφικού ρυθμιστικού μηχανισμού. Το 1987 οι ερευνητές παρατήρησαν ότι συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων στις 5' αμετάφραστες περιοχές (UTR) των mRNA της H- και L- φερριτίνης είναι

απαραίτητες για τη ρύθμιση της παραγωγής φερριτίνης σε περίσσεια σιδήρου (Aziz & Munro, 1987; Hentze et al, 1987a). Τα τμήματα αυτά έχουν χαρακτηριστική δευτεροταγή δομή αγκύλης και ονομάζονται σιδηροαποκριτικά στοιχεία (Iron Responsive Elements- IREs) και στη συνέχεια αποκαλύφθηκαν και στην 3' περιοχή. Λίγο αργότερα βρέθηκαν πρωτεΐνες που αποκαλούνται πλέον σιδηρορυθμιστικές (Iron Regulating Proteins-IRP1 και IRP2) που αναγνωρίζουν τα IREs και συνδέονται μαζί τους (Hentze et al, 1987b). Η IRP1 περιλαμβάνει ένα σύμπλεγμα [4Fe-4S] και έχει δράση ακονιτάσης (Kaptain et al, 1991) σε αντίθεση με την IRP2 που μόνο συνδέεται με το mRNA.

Τα IREs βρίσκονται τόσο στην 5' όσο και στην 3' αμετάφραστη περιοχή του mRNA των γονιδίων την έκφραση των οποίων ρυθμίζουν. Η σύνδεση IRP με IRE που βρίσκεται στην 5' UTR περιοχή, αναστέλλει τη μεταγραφή του mRNA του γονιδίου (καταστολέας έκφρασης), ενώ η σύνδεση στην 3' UTR περιοχή αυξάνει τη σταθερότητα του mRNA (ενισχυτής μεταγραφής) (Ponka et al, 1998). Στην 5' UTR περιοχή IRE ανιχνεύονται στα γονίδια της φερριτίνης, της φερροπορτίνης, της συνθετάσης του 5-αμινολεβουλενικού οξέως και της μιτοχονδριακής ακονιτάσης. Αντίθετα στην 3' UTR περιοχή ανιχνεύθηκαν IRE στα γονίδια του υποδοχέα της τρανσφερρίνης 1 (TfR1) και του DMT 1. Έτσι σε καταστάσεις ένδειας σιδήρου τα IRPs συνδέονται με τα IREs και σταθεροποιούν το TfR1 mRNA ενώ ταυτόχρονα μειώνουν τη μεταγραφή του mRNA της φερριτίνης και οδηγούν σε αύξηση της πρόσληψης και διαθεσιμότητας σιδήρου μέσα στο κύτταρο. Αντίθετα τα υψηλά επίπεδα σιδήρου μειώνουν τη σύνδεση IRE και οδηγούν σε μεταγραφή του mRNA της φερριτίνης και μειωμένη σταθερότητα του TfR1 mRNA ευνοώντας έτσι την αποθήκευση σε σχέση με την πρόσληψη (Σχήμα 17) (Testa, 2002; Cairo & Recalcati, 2007; Andrews, 2008).

Η δραστηριότητα των IREs εξαρτάται επίσης και από μηχανισμούς ανεξάρτητους του σιδήρου. Η υποξία αδρανοποιεί την τάση σύνδεσης IRP1 με το mRNA και αυξάνει τη δραστηριότητα ακονιτάσης της IRP1 σταθεροποιώντας το σύμπλοκο [4Fe-4S] με μετα-μεταγραφική ρύθμιση. Σε αντίθεση η υποξία ενεργοποιεί την IRP2 σταθεροποιώντας τη. Ερέθισμα για την αύξηση της δραστηριότητας σύνδεσης της IRP1 αποτελεί το NO και το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> τα οποία αποδομούν το σύμπλεγμα [4Fe-4S] (Pantopoulos et al, 1996). Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> δεν ενεργοποιεί την IRP2 ενώ για το NO αναφέρονται τόσο ενεργοποίηση όσο και καταστολή της IRP2.



**Σχήμα 17:** Ρύθμιση της κυτταρικής ομοιοστασίας του σιδήρου από τις IRP

## 2. Μεταγραφική ρύθμιση

Από μελέτες έχει καταγραφεί η ρύθμιση των σχετικών με το επίπεδο μεταγραφής γονιδίων από τα επίπεδα σιδήρου, των κυτοκινών και της υπόξιας. Συγκεκριμένα η έκφραση του Dctyb mRNA, που δεν έχει IRE, αυξάνεται σημαντικά σε καταστάσεις ένδειας Fe (McKie et al, 2001). Κυτοκίνες όπως η IFN- $\gamma$ , η IL-1, και η IL-6 επηρεάζουν την έκφραση των mRNA της Η-φερριτίνης, του TFR1, της επιδίνης και της FPN (Torti & Torti, 2002). Υπό συνθήκες χαμηλής πίεσης οξυγόνου, ενεργοποιείται ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1) που συνδέεται με την ερυθροποιητίνη και οδηγεί σε αυξημένη ζήτηση Fe για ερυθροποίηση. Η υποξία επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων της τρανσφερρίνης, του TfR1, της σερουλοπλασμίνης,

της FPN, του DcytB, και της επιδίνης (HAMP) (McKie et al, 2001; Peyssonnaud et al, 2007; Nemeth, 2008).

### 3. Μετά-μεταφραστική ρύθμιση

Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί πολλοί μηχανισμοί ρύθμισης του μεταβολισμού του Fe σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο. Παραδείγματα αποτελούν η ρύθμιση της FPN από την επιδίνη που προκαλεί την μεταφορά της στο εσωτερικό και την αποδόμησή της οδηγώντας σε μειωμένη αποδέσμευση Fe στο κύτταρο. Επίσης τα υψηλά επίπεδα Fe επάγουν τη μεταφορά στο εσωτερικό της DMT1 ενώ η φωσφορυλίωση του TfR1 από την πρωτεϊνική κινάση C μειώνει την επιφανειακή έκφραση του TfR1.

## **B. Πρωτεΐνες με ρυθμιστικό ρόλο στο μεταβολισμό του σιδήρου**

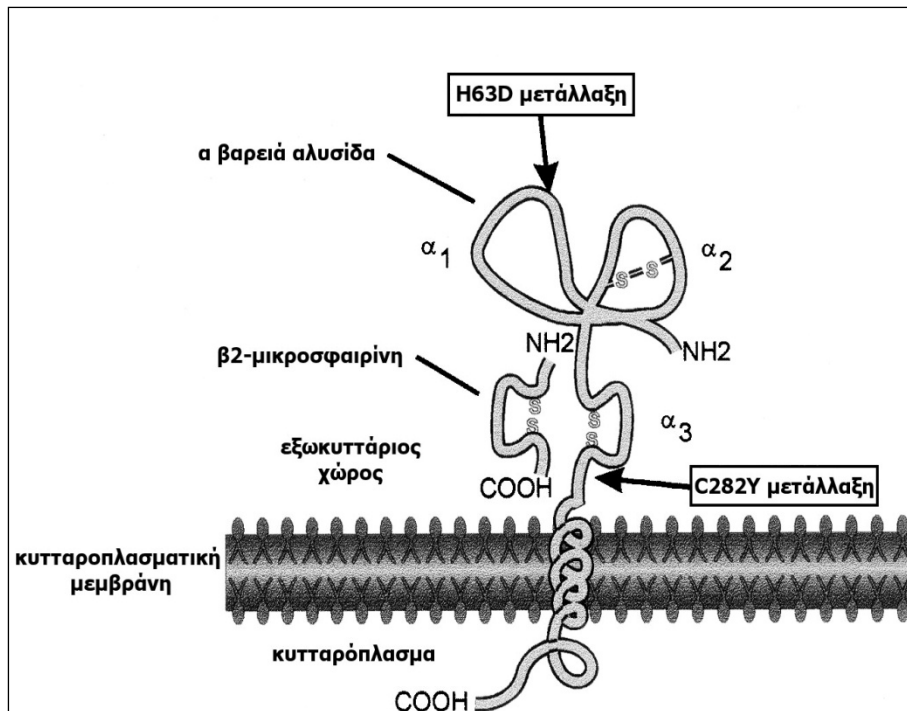
### 1. HFE

Το γονίδιο HFE ανακαλύφθηκε το 1996 και ανήκει στην οικογένεια των μη κλασικών HLA τάξεως I μορίων (Feder et al, 1996). Εδράζεται στο γονίδιο 6 και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 343 αμινοξέων (σχήμα 18).

Η HFE πρωτεΐνη εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα σε όλους τους ιστούς εκτός από τον εγκέφαλο αλλά κυρίως στο έντερο και το ήπαρ. Εντοπίζεται στη βασική μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων του στομάχου και του παχέως εντέρου και ενδοκυττάρια αλλά και περιπυρηνικά στα κύτταρα των κρυπτών του λεπτού εντέρου.

Η HFE συνδέεται με τον TfR1 στα κύτταρα των κρυπτών του δωδεκαδακτύλου. Ο σχηματισμός του συμπλέγματος HFE-TfR1-(Fe)<sub>2</sub>-Tf με στοιχειομετρία 1:2:1 είναι απαραίτητος για την ενδοκυττάρωση της HFE και τη ρύθμιση της ομοιοστασίας του Fe. Η HFE και η τρανσφερρίνη συναγωνίζονται για τις ίδιες θέσεις σύνδεσης στον TfR1. Η HFE συνδεόμενη με τον TfR1 πιθανά αλλοιώνει τη δομική του συμμετρία και ελαττώνει τη χημική του συγγένεια με την τρανσφερρίνη κατά 5-10 φορές ενώ αναστέλλει την ενδοκυττάρωση του.





**Σχήμα 18:** Η πρωτεΐνη HFE σχηματίζει ένα ετεροδιμερές με τη β2-μικροσφαιρίνη και περιλαμβάνει: ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο 22 αμινοξέων, ένα μεγάλο εξωκυττάριο τμήμα με τρεις τομείς α<sub>1</sub>, α<sub>2</sub> και α<sub>3</sub> (τομέας που μοιάζει με ανοσοσφαιρίνη), μια διαμεμβρανική περιοχή και μια μικρή κυτταροπλασματική ουρά. Στο σχήμα σημειώνονται οι θέσεις των δυο πιο κοινών μεταλλάξεων. (προσαρμογή από Bacon et al, Gastroenterology 1999).

Οι περισσότερες μελέτες σήμερα δείχνουν ότι η υπέρκφραση της HFE προσδίδει στα κύτταρα έναν φαινότυπο σιδηροπενίας. Παραμένει όμως ασαφές αν αυτό οφείλεται σε μια μειωμένη πρόσληψη από την τρανσφερίνη χωρίς να επηρεάζεται ο κύκλος του TfR1 (Roy et al, 1999), ή οφείλεται είτε στην αυξημένη ενδοκυττάρωση TfR1-(Fe)<sub>2</sub>-Tf (Salter-Cid et al, 1999) είτε στη μειωμένη εξωκυττάρωση (Ikuta et al, 2000). Η αρχική εκτίμηση ήταν ότι η HFE προκαλούσε διαταραχή στον κύκλο της τρανσφερίνης είτε στα ηπατοκύτταρα είτε στα επιθηλιακά εντερικά κύτταρα (Roy & Enns, 2000).

Νεώτερες μελέτες προτείνουν ένα διαφορετικό σενάριο. Σύμφωνα με αυτό ο TfR1 ρυθμίζει τη δραστηριότητα της HFE συνδεδεμένος μαζί της (Schmidt et al, 2008). Μιας και η τρανσφερίνη και η HFE συναγωνίζονται για τη σύνδεση με τον TfR1, η παρεκτόπιση της HFE από τον TfR1 από την τρανσφερίνη



μπορεί να ενεργοποιεί την HFE να στείλει σήμα για αυξημένη μεταγραφή της εψιδίνης, μέσω ενός άγνωστου προς το παρόν μηχανισμού.

## 2. TfR2

Το 1999 κλωνοποιήθηκε ο TfR2 (Kawabata et al, 1999). Παρότι ο TfR2 αρχικά περιγράφηκε σαν ένας μεταφορέας Fe στη συνέχεια αναδείχτηκε ο ρόλος του στην ομοιοστασία του Fe. Ο TfR2 είναι παρόμοιος με τον TfR1 και έχει τη δυνατότητα σύνδεσης με την τρανσφερρίνη σε σύμπλεγμα το οποίο όμως παρουσιάζει μικρότερη χημική συγγένεια από αυτό του Tf-TfR1. Ο TfR2 εκφράζεται κυρίως στα ηπατοκύτταρα και μάλιστα περισσότερο από τον TfR1.

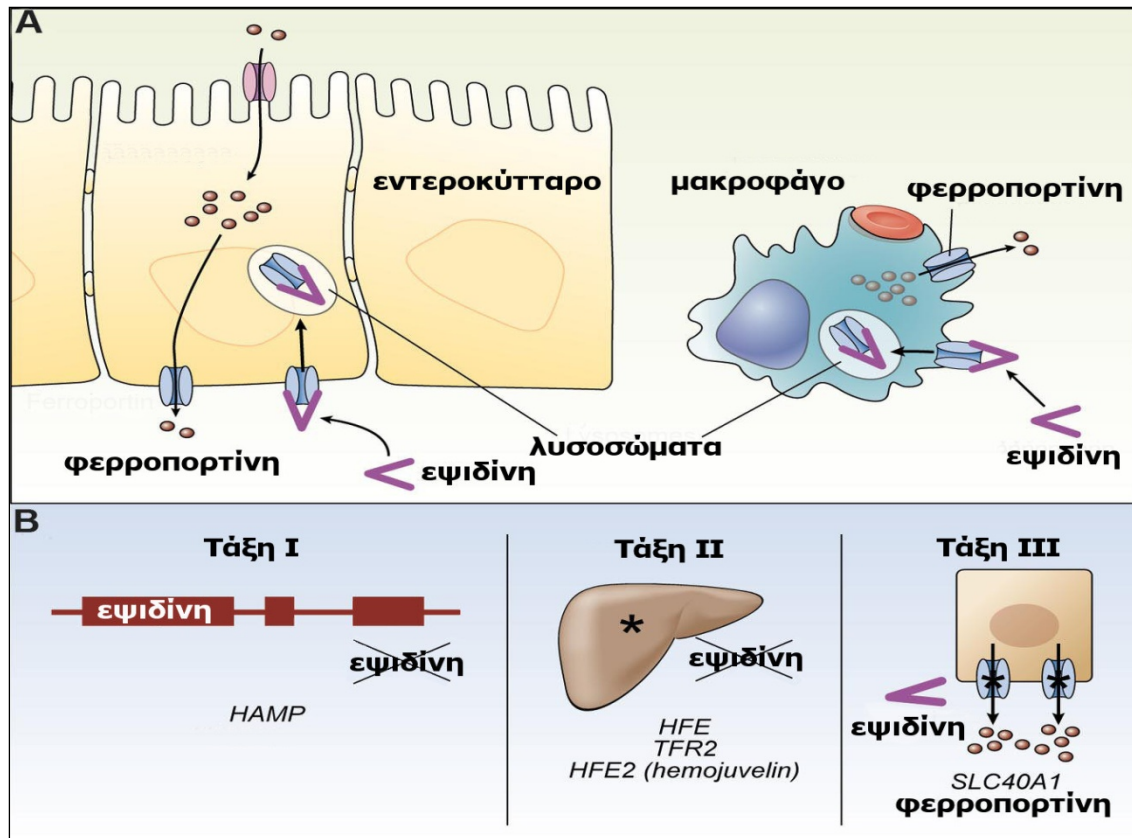
Ο TfR2 όπως και ο TfR1 αλληλεπιδρά με την HFE και σχηματίζει ένα σταθερό πρωτεϊνικό σύμπλεγμα. Η HFE δεν συνδέεται όμως σε ανάλογα τμήματα με τον TfR1. Επίσης δεν συνδέεται το ίδιο αποτελεσματικά με την  $(Fe)_2$ -Tf (Kawabata et al, 1999). Φαίνεται ότι κύρια λειτουργία του είναι αυτή του δείκτη του επιπέδου Fe στο σώμα. Η σύνθεση και η έκφρασή του δε φαίνεται να επηρεάζεται από την ενδοκυττάρια συγκέντρωση σιδήρου μιας και στο mRNA του δεν έχει IRE. Η συγκέντρωση του TfR2 αυξάνει σε απάντηση του επιπέδου της κορεσμένης τρανσφερρίνης (Robb A & Wessling-Resnick, 2004). Έχει προταθεί μοντέλο σύμφωνα με το οποίο ο TfR2 συνοδεύει την HFE μακριά από τον TfR1 όταν το επίπεδο Fe στον ορό (όπως απεικονίζεται από τον κορεσμό της τρανσφερρίνης) είναι υψηλό (Schmidt et al, 2008). Κατά αυτόν τον τρόπο η HFE και ο TfR2 συμμετέχουν σε ένα σύμπλεγμα μηνυμάτων με σκοπό την αύξηση έκφρασης της εψιδίνης.

## 3. Εψιδίνη

Η εψιδίνη είναι μια πεπτιδική ορμόνη που συντίθεται και εκκρίνεται κατά κύριο λόγο στα ηπατοκύτταρα και λιγότερο στα νεφρά (Park et al, 2001). Το υπεύθυνο γονίδιο στον άνθρωπο (HAMP) εδράζεται στο χρωμόσωμα 19q13.1 και κωδικοποιεί ένα προπεπτίδιο 84 αμινοξέων. Αυτό αποτελείται από ένα τυπικό σηματοδοτικό τμήμα 24 αμινοξέων στο N-άκρο, μια κεντρική περιοχή 35 αμινοξέων και ένα πεπτίδιο 20, 22 ή 25 αμινοξέων στο

C-άκρο. Με ενζυματική αποκοπή από πρωτεάσες προκύπτουν ενεργά τελικά πεπτίδια 20-25 αμινοξέων πλούσια σε κυστεΐνη (Hunter et al, 2002). Οι 8 κυστεΐνες που υπάρχουν σχηματίζουν 4 δισουλφιδικούς δεσμούς που προσδίδουν ακαμψία στο μόριο. Πρόσφατα φάνηκε ότι οι αλληλουχίες στο N-άκρο είναι απαραίτητες για τη φυσιολογική λειτουργία της επιδίνης (Nemeth et al, 2006).

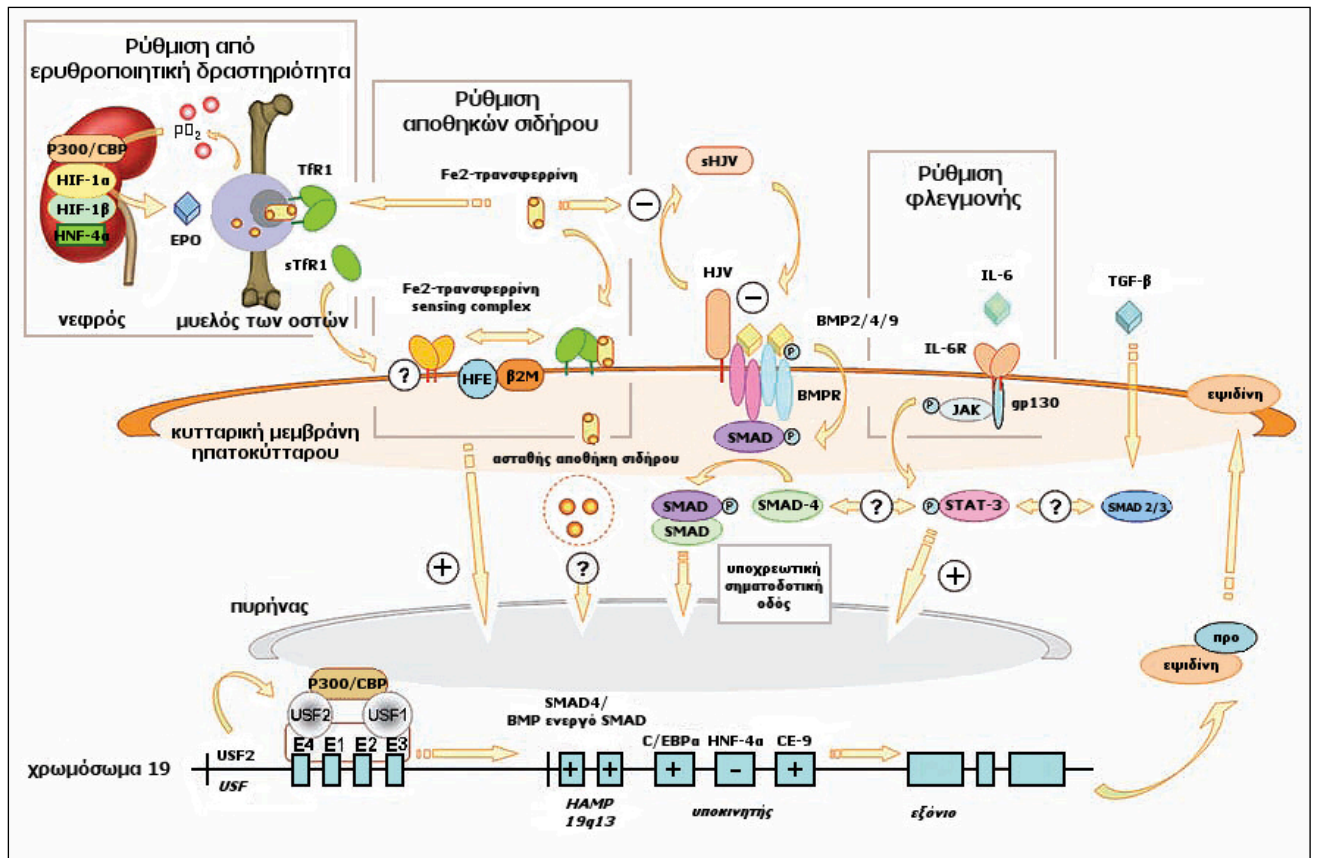
Η έκφραση της ρυθμίζεται από τα επίπεδα Fe, τη φλεγμονή και την υποξία. Τα επίπεδα επιδίνης αναμένονται υψηλά σε εναπόθεση σιδήρου στο ήπαρ και μειωμένα σε ανεπάρκεια σιδήρου. Παρά ταύτα βρέθηκαν μη αναμενόμενα χαμηλά επίπεδα σε ασθενείς με συγγενή αιμοχρωμάτωση λόγω μεταλλάξεων στα γονίδια των HFE και TfR2 ενδεικτικά της έλλειψης ρύθμισης προς τα πάνω της επιδίνης παρά τις αυξημένες αποθήκες σιδήρου (Bridle et al, 2003). Η επιδίνη επίσης δεν ανιχνεύεται σε περιπτώσεις συγγενούς αιμοχρωμάτωσης από ανωμαλίες στο γονίδιο της HFE2 (hemojuvelin). Η μείωση των επιπέδων επιδίνης στο ήπαρ προάγει την απορρόφηση σιδήρου πράγμα που εξηγεί εν μέρει γιατί μεταλλάξεις στα γονίδια HFE και TfR2 οδηγούν σε υπερφόρτωση σιδήρου (Σχήμα 19). Η επιδίνη συνδέεται με τη φερροπορτίνη γεγονός που οδηγεί στην μεταφορά της στο εσωτερικό των κυττάρων και στην αποδόμησή της στα λυσοσώματα (Nemeth et al, 2004a). Αυτό σημαίνει ότι όταν τα επίπεδα επιδίνης είναι υψηλά, όπως σε καταστάσεις έλλειψης σιδήρου ή συγγενούς αιμοχρωμάτωσης, η έκφραση της φερροπορτίνης και η απελευθέρωση σιδήρου από τα μακροφάγα και από τα κύτταρα των κρυπτών του 12δακτύλου ρυθμίζεται προς τα πάνω. Υπάρχουν επίσης στοιχεία υπέρ του ότι η επιδίνη μπορεί να δρα κατευθείαν στα ώριμα εντεροκύτταρα του 12δακτύλου για να ρυθμίσει την έκφραση μεταφορέων σιδήρου. Από πειράματα σε ποντίκια με προκλητή αναιμία και αιμόλυση, η έκφραση της επιδίνης μειώθηκε μετά από 3 ημέρες διάστημα κατά το οποίο παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης στο 12δάκτυλο των DMT, Dctyb και φερροπορτίνης ενώ μετά από ένα 24ωρο αυξήθηκε η απορρόφηση σιδήρου (Frazer et al, 2004). Η επιδίνη έχει αντιμικροβιακές ιδιότητες και η φλεγμονή αλλά και οι λοιμώξεις μπορούν να προάγουν την έκφρασή της. Η έκφραση του HAMP mRNA αυξάνεται από φλεγμονή που προκαλείται από λιποπολυσακχαρίτες όπως και από τις κυτοκίνες IL-6 και IL-1 (Nemeth et al, 2004b; Lee et al, 2005).



### Σχήμα 19: Επιδίνη και αιμοχρωμάτωση.

(A) Απεικονίζεται η δράση της επιδίνης πάνω στη φερροπορτίνη τόσο στα εντεροκύτταρα όσο και στα μακροφάγα. Η επιδίνη συνδέεται με την φερροπορτίνη προκαλώντας την μεταφορά της στο εσωτερικό και την αποδόμησή της στα λυσοσώματα. (B) Τρεις τάξεις αιμοχρωμάτωσης επηρεάζουν τον ρυθμιστικό άξονα επιδίνης/φερροπορτίνης: Στην τάξη I ανωμαλίες στο γονίδιο της επιδίνης (HAMP) εμποδίζουν την παραγωγή λειτουργικής επιδίνης, στην τάξη II ανωμαλίες στα γονίδια των HFE, TFR2 ή HFE2 (hemojuvelin) εμποδίζουν τη φυσιολογική ρύθμιση της έκφρασης της επιδίνης και στην τάξη III ανωμαλίες στην φερροπορτίνη εμποδίζουν τη φυσιολογική της ρύθμιση από την επιδίνη. (προσαρμογή από Andrews, Blood 2008)

Γενικά οι μελέτες δείχνουν ότι η επιδίνη έχει έναν πολυδιάστατο ρόλο στη φλεγμονή, στο μεταβολισμό του σιδήρου και στην ερυθροποίηση υποστηρίζοντας την πιθανότητα να είναι τόσο ο ρυθμιστής των αποθηκών όσο και της ερυθροποίησης. Το μοντέλο των οδών που συμμετέχουν στη ρύθμιση της επιδίνης φαίνεται στο Σχήμα 14.



**Σχήμα 20:** Μοντέλο των οδών που συμμετέχουν στη ρύθμιση της εψιδίνης. Απεικονίζονται οι 3 οδοί ενεργητικής ρύθμισης (ρύθμιση από ερυθροποιητική δραστηριότητα, ρύθμιση αποθηκών Fe, ρύθμιση φλεγμονής) και μια υποχρεωτική σηματοδοτική οδός που μαζί ελέγχουν την παραγωγή εψιδίνης στο ηπατοκύτταρο (Προσαρμογή από Kemna et al, Haematologica 2008).

Συμβολισμοί: pO<sub>2</sub>: μερική πίεση οξυγόνου; HIF: παράγοντας που υποκινείται από την υποξία ; CBP: CREB συνδετική πρωτεΐνη; EPO: ερυθροποιητίνη; HNF: ηπατικός πυρηνικός παράγοντας ; TfR: υποδοχέας τρανσφερίνης; sTfR: διαλυτός υποδοχέας τρανσφερίνης ; HFE: πρωτεΐνη αιμοχρωμάτωσης; b2M: β-2 μικροσφαιρίνη; HJV: hemojuvelin; sHJV: διαλυτή HJV; BMP: μορφογενετική πρωτεΐνη των οστών ; BMPR: υποδοχέας BMP; P: φώσφορος; SMAD: mothers against decapentaplegic homologue (*Drosophila*); IL: ιντερλευκίνη; IL-6R: υποδοχέας ιντερλευκίνης 6; gp: γλυκοπρωτεΐνη; JAK: κινάση του Janus; STAT: μετατροπέας σήματος και ενεργοποιητής της μεταγραφής ; TGF: μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας; USF: upstream stimulation factor; E: Ebox; HAMP: γονίδιο εψιδίνης; CE-9: συντηρούμενο στοιχείο 9.

Η ερυθροποίηση ελέγχεται από την ερυθροποιητίνη που παράγεται από το νεφρό και επάγεται από την υποξία. Ο μυελός των οστών επικοινωνεί μέσω ενός ακόμη άγνωστου παράγοντα που πιθανά παρεμβαίνει στη ρύθμιση των αποθηκών Fe. Αυτή η ρύθμιση των αποθηκών περιλαμβάνει την ποσότητα του Fe που κυκλοφορεί συνδεδεμένος με την τρανσφερίνη και συναγωνίζεται με την HFE για τη σύνδεση με τον TfR1 και έτσι επάγει το σχηματισμό του TfR2/HFE συμπλέγματος σαν έναν υποκινητή της παραγωγής εσιδίνης. Η άμεση επίδραση του ενδοκυττάριου Fe από την ασταθή αποθήκη Fe στη ρύθμιση της εσιδίνης δεν είναι ακόμη ξεκάθαρη. Η ρυθμιστική οδός της φλεγμονής επάγεται κατά κύριο λόγο από την IL-6 και πιστεύεται ότι είναι η κυρίαρχη παρά τη δραστηριότητα των άλλων οδών. Η σηματοδοτική οδός του BMP/SMAD που ελέγχεται από την HJV φαίνεται να είναι υποχρεωτική για τη δραστηριότητα των ρυθμιστικών οδών μέσω των αποθηκών Fe και της ερυθροποίησης. Τα υποψήφια γονίδια USF1 και 2 του μεταβολικού συνδρόμου ελέγχουν άμεσα το γονίδιο HAMP υποδηλώνοντας έναν σύνδεσμο μεταξύ του μεταβολισμού των λιπών, της γλυκόζης και του Fe.

#### 4. Hemojuvelin

Η hemojuvelin (HJV ή αλλιώς HFE2) είναι μέλος της οικογένειας των RGM μορίων (repulsive guidance molecules) και σχετίζεται με την παθογένεση της νεανικής αιμοχρωμάτωσης (Paranikolaou et al, 2004). Σύμφωνα με πρόσφατη ανακοίνωση υπάρχει η υπόθεση ότι τόσο η ρύθμιση των αποθηκών σιδήρου όσο και η ρύθμιση της ερυθροποιητικής δραστηριότητας στηρίζεται στην ύπαρξη μιας επιπρόσθετης οδού που ελέγχεται από τη συνδεδεμένη με γλυκοσυλφωσφατιδυλινοσιτόλη HJV. Η HJV θεωρείται ότι διατηρεί μια αναγκαία ρυθμιστική οδό για την παραγωγή της εσιδίνης μέσω σηματοδότησης από το σύστημα μορφογενετικής πρωτεΐνης των οστών (BMP)/SMAD (Babitt et al, 2006). Παράλληλα αναγνωρίστηκε και η διαλυτή μορφή της HJV (sHJV) που φαίνεται να σχετίζεται με τον κυκλοφορούντα Fe ενώ *in vitro* μπορεί να καταστείλει την έκφραση του mRNA της εσιδίνης. Όλα αυτά τα στοιχεία υποθέτουν, έναν ελεγχόμενο από το Fe, συναγωνισμό μεταξύ HJV και sHJV που ρυθμίζει την παραγωγή εσιδίνης (Ganz & Nemeth, 2006).

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## ΣΚΟΠΟΣ

Οι ασθενείς με ενδιάμεση β-ΜΑ παρουσιάζουν ηπιότερη κλινική πορεία σε σχέση με τους ασθενείς με μείζονα ΜΑ και για την επιβίωσή τους δεν απαιτούνται συστηματικές μεταγγίσεις. Λόγω της μεγάλης ετερογένειας του γονότυπου και του κλινικού φαινότυπου, οι ασθενείς με ΕΜΑ παρουσιάζουν ποικίλου βαθμού αναιμία και ιστική υποξία που οδηγεί σε υπερπλασία του μυελού των οστών. Η ομοιόσταση του σιδήρου στους ασθενείς με μη-μεταγγιζόμενη ΕΜΑ διαταράσσεται σαν αποτέλεσμα της αυξημένης απορρόφησης σιδήρου από το έντερο που συνδυάζεται με δευτερογενώς χαμηλά επίπεδα επιδίνης λόγω της μη αποδοτικής ερυθροποίησης.

Στις μέρες μας τα διαθέσιμα στοιχεία για το βαθμό αιμοσιδήρωσης στους ασθενείς αυτούς και για τους επιβαρυντικούς παράγοντες που ενέχονται στην αυξημένη συσσώρευση σιδήρου στους ιστούς είναι περιορισμένα. Για την αποτελεσματική θεραπευτική αντιμετώπιση της αιμοσιδήρωσης αυτής της ομάδας ασθενών υπάρχει επιτακτική ανάγκη καταγραφής και μελέτης των παραγόντων αυτών και του ρόλου τους στην ανάπτυξη αιμοσιδήρωσης.

Η παρούσα μελέτη αφορά σε μια μεγάλη ομάδα 70 Ελλήνων ασθενών με ενδιάμεση β-ΜΑ και στοχεύει:

1. στην εκτίμηση του βαθμού αιμοσιδήρωσης και στη συσχέτιση του με τον κλινικό φαινότυπο
2. στη μελέτη του ρόλου τροποποιητικών/επιβαρυντικών παραγόντων στην παθογένεια της αιμοσιδήρωσης
3. στη μελέτη αναγκαιότητας εφαρμογής προληπτικής και θεραπευτικής αγωγής στους ασθενείς αυτούς

## ΥΛΙΚΟ

Υλικό της μελέτης αποτέλεσαν 70 ασθενείς με κλινική εικόνα ενδιάμεσης β-ΜΑ που διαγνώστηκαν και παρακολουθήθηκαν για μακρύ χρονικό διάστημα στη Μονάδα Μεσογειακής Αναιμίας της Α΄ Παιδιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών και στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής.

Ο χαρακτηρισμός των ασθενών σαν ενδιάμεσης β-ΜΑ έγινε με τα κριτήρια που χρησιμοποιούνται στη Μονάδα Μεσογειακής Αναιμίας της Α΄ Παιδιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών στο Νοσοκομείο Παίδων "Η Αγία Σοφία" (Πίνακας 5).

**Πίνακας 5:** Συνοπτικά κριτήρια για την ταξινόμηση ασθενών με ενδιάμεση β-ΜΑ (Kattamis C, 1992).

Κριτήρια	Κλινικός φαινότυπος ενδιάμεσης β-ΜΑ	
	Βαρύς (I <sub>1</sub> )	Ήπιος (I <sub>2</sub> )
Hb	>8 gr/dl <6 ετών 7-8 gr/dl 6-12 ετών	8-10 gr/dl 6-12 ετών
Μεταγγίσεις	Περιστασιακές	Όχι
Σπληνομεγαλία	Μέτρια	Ήπια
Διαταραχή αύξησης	Ναι	Όχι
Οστικές αλλοιώσεις	Μέτριες-Βαριές	Ήπιες



## ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

### A. Κλινική μελέτη

Καταγράφηκαν και εκτιμήθηκαν οι εξής παράμετροι:

1. Η ηλικία των ασθενών και η ηλικία διάγνωσης.
2. Ο κλινικός φαινότυπος των ασθενών.
3. Η διενέργεια ή όχι μεταγγίσεων. Η ηλικία έναρξης των συστηματικών μεταγγίσεων.
4. Η υπερηχογραφική μέτρηση του μεγέθους του σπλήνα για εκτίμηση πιθανής σπληνομεγαλίας, η διενέργεια ή όχι σπληνεκτομής καθώς και η ηλικία που έγινε η σπληνεκτομή.
5. Η υπερηχογραφική εκτίμηση της χοληδόχου κύστης για ύπαρξη χολολιθίασης και η διενέργεια ή όχι χολοκυστεκτομής.
6. Η σωματική ανάπτυξη των ασθενών με υπολογισμό των εκατοστιαίων θέσεων του ύψους.
7. Η ύπαρξη οστικών αλλοιώσεων με ακτινογραφίες πλαγίες κρανίου και μακρών οστών για εκτίμηση του βαθμού οστεοπόρωσης.
8. Η ύπαρξη ή όχι εξωμυελικών εστιών αιμοποίησης
9. Ο υπερηχογραφικός έλεγχος καρδιάς: Διαστάσεις καρδιακών κοιλοτήτων και συσταλτικότητα της αριστερής κοιλίας με εκτίμηση του κλάσματος εξώθησης (EF) και του κλάσματος βράχυνσης (SF).

### B. Αιματολογική μελέτη

1. Η αιμοσφαιρίνη (Hb), ο αιματοκρίτης (Ht), οι ερυθροκυτταρικοί δείκτες, τα λευκά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια μετρήθηκαν με τον αυτόματο αναλυτή ολικού αίματος Cell Dyn 1700 της Abbott (Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL, USA).
2. Η μελέτη των αιμοσφαιρινών έγινε με τους ακόλουθους τρόπους:
  - A. Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των αιμοσφαιρινών A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> και F έγινε με CE-HPLC (cation-exchange high-pressure liquid-chromatography) χρησιμοποιώντας το Bio-Rad Variant Hemoglobin Testing system και το β-Thalassemia Short Program (Bio-rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Στο σύστημα αυτό τα δείγματα αίματος αναμιγνύονται από το κεντρικό σταθμό του Variant, διαλύονται με το ειδικό

ρυθμιστικό διάλυμα για αιμόλυση και πλύση και εγχύονται σε μια ειδική στήλη για την ανάλυση. Η μη πορώδης στήλη ανταλλαγής κατιόντων (διαστάσεων 3 x 0,46cm) διαχωρίζεται με έκλυση με βαθμό ροής 2mL/min από 2 φωσφορικά διαλύματα που διαφέρουν στο pH και το ιονικό δυναμικό. Τα διαχωρισμένα κλάσματα αιμοσφαιρίνης φωτομετρούνται στα 415nm ενώ ο θόρυβος περιορίζεται από τη χρήση και μια δεύτερης φωτομέτρησης στα 690nm. Τα αποτελέσματα αναλύονται από το λογισμικό του μηχανήματος και εξάγεται η χρωματογραφική έκθεση. Οι κορυφές αντιστοιχίζονται με προκαθορισμένα από τον κατασκευαστή παράθυρα τιμών (Πίνακας 6) που προέρχονται από το χρόνο έκλυσης (δηλαδή το χρόνο σε min από την έγχυση του δείγματος ως το μέγιστο διαχωρισμό του) των φυσιολογικών κλασμάτων της αιμοσφαιρίνης και των κοινών παραλλαγών της.

**Πίνακας 6:** Προκαθορισμένα παράθυρα από τον κατασκευαστή για το σύστημα Variant

όνομα κορυφής	Χρόνος έκλυσης (σε min)
παράθυρο P1	0,63–0,85
παράθυρο F	0,98–1,20
παράθυρο P2	1,24–1,40
παράθυρο P3	1,40–1,90
παράθυρο A0	1,90–3,10
παράθυρο A2	3,30–3,90
παράθυρο D	3,90–4,30
παράθυρο S	4,30–4,70
παράθυρο C	4,90–5,30

- B. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της HbA2 έγινε με ηλεκτροφόρηση σε οξική κυτταρίνη σε buffer Tris-EDTA-Borate, pH 8,9 και έκλυση του κλάσματος (ΦΤ HbA2 <3,5%) και με CE-HPLC.
- Γ. Ο προσδιορισμός της HbF έγινε με μετουσίωση με άλκαλι (ΦΤ HbF <2%) και με CE-HPLC.

### Γ. Βιοχημική μελέτη

1. Η μέτρηση του Fe έγινε με φωτομετρική μέθοδο στα 562nm (Ferrozin method της Merck, Darmstadt, Germany).
2. Η φερριτίνη μετρήθηκε με τη μέθοδο Elisa Ferritin kit- IMX System (Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL, USA).
3. Ο προσδιορισμός του κορεσμού της τρανσφερρίνης έγινε με έμμεσο τρόπο μετά από τον προσδιορισμό της ολικής σιδηροδεσμευτικής ικανότητας της τρανσφερρίνης (TIBC) (Merck, Darmstadt, Germany). Κατά τη διαδικασία αυτή αρχικά στον ορό προστίθεται περίσσεια Fe, στη συνέχεια ο αδέσμευτος Fe καθιζάνει με την προσθήκη ανθρακικού υδροξειδίου του μαγνησίου και τελικά ο Fe που απομένει (που αντιστοιχεί στην TIBC) μετριέται με φωτομετρική μέθοδο στα 562nm.
4. Η μέτρηση των επιπέδων ερυθροποιητίνης και sTfR στον ορό των ασθενών έγινε εις διπλούν με ανοσοενζυμική μέθοδο σε συνδυασμό με χημειοφωταύγεια (Nichols Institute Diagnostics, CA, USA). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί 2 μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού έναντι της ανθρώπινης ερυθροποιητίνης ή του sTfR. Το ένα μονοκλωνικό αντίσωμα συνδέεται με βιοτίνη ενώ το δεύτερο για να μπορεί να ανιχνεύεται είναι σημασμένο με έναν εστέρα ακριδίνης. Το δείγμα επωάζεται ταυτόχρονα και με τα δύο αντισώματα και με την παρουσία ερυθροποιητίνης ή sTfR δημιουργείται ένα διαλυτό σύμπλεγμα των αντισωμάτων. Μετά την αρχική επώαση προστίθενται μαγνητικά σωματίδια επικαλυμμένα με στρεπταβιδίνη και ακολουθεί δεύτερη περίοδος επώασης. Η διεργασία αυτή επιτρέπει την υψηλής ειδικότητας σύνδεση του συμπλέγματος στη στερεά φάση λόγω της υψηλής συνάφειας μεταξύ βιοτίνης και στρεπταβιδίνης. Στη συνέχεια απομακρύνεται το ποσό των ελεύθερων αντισωμάτων και το υπόλοιπο μετριέται με τη χρήση χημειοφωταύγειας. Το ποσό του δεσμευμένου και σημασμένου αντισώματος είναι ευθέως ανάλογο με της συγκέντρωσης ερυθροποιητίνης ή του sTfR στο δείγμα.
5. Ο προσδιορισμός του μη-δεσμευμένου με τρανσφερρίνη σιδήρου (NTBI) έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο που προτάθηκε από τον Jakeman (Jakeman et al, 2001) με κάποιες τροποποιήσεις, με φασματοφωτομετρία ατομικής απορροφήσεως σε φούρνο γραφίτη (GFAAS - graphite furnace atomic absorption spectrometry (A-Analyst 800, Perkin Elmer Co Analytical Instruments, Norwalk, CT, USA) και θερμοκρασίες

πυρόλυσης και ατομοποίησης 1450 και 2100°C αντίστοιχα. Συνοπτικά ο NTBI κινητοποιείται και δεσμεύεται από το χηλικό παράγοντα νιτριλοτριοξικό οξύ (NTA). Στη συνέχεια το διάλυμα υπερδιηθείται (Amicon centrifree MPS MW 30Kd) έτσι ώστε να διαχωριστεί από τον δεσμευμένο με τρανσφερρίνη Fe και τις πρωτεΐνες του ορού. Το υπερδιήθημα του ορού αραιώνεται 1:6 με διάλυμα 1% Triton, 20 mM HNO<sub>3</sub> και ο NTBI με τη μορφή συμπλόκου Fe-NTA προσδιορίζεται με φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης. Σε κάθε πειραματική διαδικασία γινόταν καμπύλη βαθμονόμησης με πρότυπα διαλύματα 0-60μg/l Fe. Για ελαχιστοποίηση της εξωγενούς επιμόλυνσης με Fe, όλα τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν (πιπέτες, φιαλίδια, κλπ.) ήταν από πλαστικό και ύψιστης καθαρότητας H<sub>2</sub>O, HNO<sub>3</sub> κτλ.

6. Η μέτρηση των συνηθισμένων βιοχημικών παραμέτρων (γλυκόζης αίματος, τρανσαμινασών, χολερυθρίνης και ορμονών) έγινε με τις κλασσικές μεθόδους από το Βιοχημικό Εργαστήριο του Νοσοκομείου Παιδών "Η Αγία Σοφία".

#### Δ. Μοριακή μελέτη

1. Ο γονοτυπικός έλεγχος για την ύπαρξη μεταλλάξεων συγγενούς αιμοχρωμάτωσης έγινε με τη χρήση του Hemochromatosis Strip Assay A (ViennaLab, Vienna, Austria). Η μέθοδος στηρίζεται στην αρχή του ανάστροφου υβριδισμού (Oberkanins and al, 2000). Μετά την εξαγωγή του DNA από τον ορό, οι αλληλουχίες των γονιδίων για τα HFE, TFR2 και FPN1 ενισχύονται ταυτόχρονα *in vitro* και σημαίνονται με βιοτίνη σε μια αντίδραση ("multiplex"). Στη συνέχεια τα προϊόντα της ενίσχυσης υβριδοποιούνται επιλεκτικά σε μια ταινία που περιέχει ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές μονιμοποιημένους σε παράλληλες γραμμές. Οι σημασμένες με βιοτίνη συνδεδεμένες αλληλουχίες ανιχνεύονται με τη χρήση στρεπταβιδίνης-αλκαλικής φωσφατάσης και χρωστικών. Με τη μέθοδο αυτή ανιχνεύονται 12 μεταλλάξεις για το HFE γονίδιο (V53M, V59M, H63D, H63H, S65C, Q127H, P160delC, E168Q, E168X, W169X, C282Y, Q283P), 4 μεταλλάξεις για το TFR2 γονίδιο (E60X, M172K, Y250X, AVAQ594-597del) και 2 για το γονίδιο της FPN1 (N144H, V162del).
2. Η μοριακή μελέτη των μεταλλάξεων των γόνων των α, β και δβ αλυσίδων έγινε στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών (Χωρέμιο Ερευνητικό Εργαστήριο). Οι

τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η ARMS-PCR, η ανάλυση με περιοριστικά ένζυμα και η ηλεκτροφόρηση σε γέλη με κλίση αποδιατακτικού (DGGE) (Newton et al, 1989; Kazazian, 1989; Myers et al, 1989).

#### Ε. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση έγινε με το στατιστικό λογισμικό SPSS (SPSS 14.0, SPSS, Chicago, IL). Οι συνεχόμενες μεταβλητές εκφράζονται ως μέση τιμή  $\pm$  τυπική απόκλιση. Η σύγκριση των μέσων τιμών ανάμεσα στις ομάδες έγινε με τη χρήση είτε του Independent-Samples T Test είτε του Mann-Whitney U test ανάλογα με το αν οι αντίστοιχες μεταβλητές ακολουθούσαν ή όχι κανονική κατανομή σύμφωνα με τον έλεγχο με το Kolmogorov-Smirnov test. Η δοκιμασία Mann-Whitney U test χρησιμοποιήθηκε για ανεύρεση σημαντικών διαφορών μεταξύ των ομάδων και οι δοκιμασίες Pearson correlation coefficient και Spearman's Rho για ανεύρεση σημαντικών συσχετίσεων. Στην περίπτωση σύγκρισης των μέσων τιμών τριών ή περισσότερων ομάδων χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση διακύμανσης Univariate Analysis of Variance. Τιμές  $p < 0,05$  θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Κλινική ταξινόμηση ασθενών

Μελετήθηκαν 70 ασθενείς με κλινική εικόνα ενδιάμεσης β-ΜΑ, 67 (95,7%) από τους οποίους είχαν δύο μεταλλάξεις για β<sup>thal</sup> ή δβ γονίδια ενώ 3 (4,3%) ήταν ετεροζυγώτες β-ΜΑ με συνύπαρξη τριπλασιασμένου α γονιδίου (aaa/aa ή aaa/aaa).

Η ταξινόμηση των ασθενών έγινε είτε με βάση τον αριθμό των μεταλλάξεων είτε με βάση τον κλινικό φαινότυπο σύμφωνα με τα κριτήρια που προαναφέρθηκαν στον Πίνακα 5.

Με βάση των αριθμό των μεταγγίσεων οι ασθενείς ταξινομήθηκαν σε 2 κατηγορίες. Στη μια εντάχθηκαν 52 ασθενείς που ήταν αμετάγγιστοι ή είχαν μεταγγιστεί μόνο ευκαιριακά ενώ στη δεύτερη περιλήφθηκαν 18 ασθενείς που είχαν μεταγγιστεί συστηματικά για κάποιο χρονικό διάστημα (Πίνακας 7).

Τα δημογραφικά στοιχεία των ασθενών, ηλικία-φύλο, αναγράφονται στον Πίνακα 7. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στις παρούσες ηλικίες των δύο ομάδων γεγονός που επιτρέπει τη γενίκευση των συγκρίσεων μεταξύ τους.

**Πίνακας 7:** Παρούσα ηλικία και ηλικία διάγνωσης των ασθενών σε σχέση με τις μεταγγίσεις

Μεταγγίσεις	Αριθμός Ασθενών (Άνδρες/Γυναίκες)	Ηλικία (σε έτη)			
		Παρούσα		Διάγνωσης	
		Μέση τιμή (εύρος)	Διάμεσος τιμή	Μέση τιμή (εύρος)	Διάμεσος τιμή
Αμετάγγιστοι	52 (27/25)	23,1±12,5 (5,0-61,0)	21,5	8,9±10,8 (0,5-50,0)	5,8
Συστηματικά Μεταγγισμένοι	18 (13/5)	28,3±8,1 (14,5-48,5)	26,5	4,4±4,6 (0,5-20,0)	3
Σύνολο	70 (40/30)	24,4±11,7 (5,0-61,0)	25,0	7,8±9,8 (0,5-50,0)	4,8
Στατιστική ανάλυση		p>0,05		p<0,05	

Αντίθετα διαφέρει η ηλικία διάγνωσης των ασθενών των δυο ομάδων. Οι μεταγγισμένοι ασθενείς διαγνώστηκαν σε μικρότερη ηλικία ( $4,4 \pm 4,6$  έτη) σε σχέση με τους αμετάγγιστους ( $8,9 \pm 10,8$  έτη). Το εύρημα θεωρείται αναμενόμενο μιας και οι μεταγγισμένοι ασθενείς είχαν σχετικά βαρύτερη κλινική εικόνα που οδήγησε σε νωρίτερο εργαστηριακό έλεγχο και διάγνωση.

Σύμφωνα με τον κλινικό φαινότυπο οι ασθενείς ταξινομήθηκαν σε 2 κατηγορίες: σε 24 ασθενείς με βαρύ κλινικό φαινότυπο και 46 ασθενείς με ήπιο (Πίνακας 8). Και σε αυτήν την περίπτωση, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στις παρούσες ηλικίες των δύο ομάδων γεγονός που επιτρέπει τη γενίκευση των συγκρίσεων μεταξύ τους. Αντίστοιχα με την προηγούμενη ταξινόμηση, διαφέρει η ηλικία διάγνωσης μιας και οι ασθενείς με βαρύ κλινικό φαινότυπο, όπως αναμενόταν, διαγνώστηκαν σε μικρότερη ηλικία ( $3,3 \pm 2,4$  έτη) σε σχέση με εκείνους που είχαν ήπιο κλινικό φαινότυπο ( $10,1 \pm 11,3$  έτη).

**Πίνακας 8:** Παρούσα ηλικία και ηλικία διάγνωσης των ασθενών σε σχέση με τον κλινικό φαινότυπο

Κλινικός Φαινότυπος	Αριθμός Ασθενών (Άνδρες/Γυναίκες)	Ηλικία (σε έτη)			
		Παρούσα		Διάγνωσης	
		Μέση τιμή (εύρος)	Διάμεσος τιμή	Μέση τιμή (εύρος)	Διάμεσος τιμή
Βαρύς (I1)	24 (27/25)	$23,3 \pm 9,5$ (5,0-39,5)	25	$3,3 \pm 2,4$ (0,5-11,0)	3,0
Ήπιος (I2)	46 (13/5)	$25,0 \pm 12,8$ (5,0-61,0)	24,8	$10,1 \pm 11,3$ (1,0-50,0)	6,5
Σύνολο	70 (40/30)	$24,4 \pm 11,7$ (5,0-61,0)	25,0	$7,8 \pm 9,8$ (0,5-50,0)	4,8
Στατιστική ανάλυση		$p > 0,05$		$p < 0,05$	

## **Μοριακή μελέτη α και β μεταλλάξεων**

Οι γονότυποι των ασθενών φαίνονται συνοπτικά και ανάλογα με τη συχνότητα των μεταγγίσεων τους στον [Πίνακα 9](#).

Βρέθηκαν 17 διαφορετικές μεταλλάξεις και 40 γονοτυπικοί συνδυασμοί μεταλλάξεων του συμπλέγματος των β-γόνων.

Σε μια ασθενή αποκαλύφθηκε η παρουσία σε ετερόζυγη κατάσταση της ασταθούς Hb Crete [ $\beta$  129 (H7) Ala→Pro] σε συνδυασμό με μια κλασσική  $\beta^0$  μετάλλαξη.

Η μοριακή ανάλυση του α γονιδίου έδειξε συνύπαρξη 4 (6,0%) φορέων α-MA (2 με γονότυπο  $-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$ , ένας με  $-\alpha^{MED}/\alpha\alpha$  και ένας με  $-\alpha^{3,7}/-\alpha^{MED}$ ) και δυο (3,0%) ασθενείς με τριπλασιασμένο α-γονίδιο (ααα/αα).

Ενδιάμεση Μεσογειακή αναιμία εμφάνισαν και 3 ετεροζυγώτες β-MA, δυο με τη συνύπαρξη τριπλασιασμένου α γονιδίου σε ετερόζυγη κατάσταση (ααα/αα) και ένας με τριπλασιασμένο α γονίδιο σε ομόζυγη κατάσταση (ααα/ααα).

Η πλειοψηφία των μεταλλάξεων 55,1% ήταν  $\beta^+$  (σιωπηρές,  $\beta^{++}$  και  $\beta^+$ ) μεταλλάξεις. Σιωπηρού τύπου μεταλλάξεις -101 (C~~TT~~) και +6 (C~~TT~~) βρέθηκαν σε ποσοστό 13,2% ενώ ποσοστό 27,9% ανήκε στην ομάδα των πολύ ήπιων μεταλλάξεων (IVSI-6 (T~~TT~~), -87 (C~~TT~~), polyA και -28 (A~~TT~~)) ([Πίνακας 9](#)).

Οι  $\beta^0$  μεταλλάξεις βρέθηκαν σε σημαντικό ποσοστό 27,1% στο σύνολο των  $\beta^{thal}$  γονιδίων, όμως ο συνδυασμός τους συνήθως με σιωπηρού τύπου και πολύ ήπιες β μεταλλάξεις δίνει κλινικό φαινότυπο ενδιάμεσης β-MA. Οι δβ μεταλλάξεις βρέθηκαν σε ποσοστό 16,2% ([Πίνακας 9](#)).



**Πίνακας 9:** Είδος και συχνότητα μεταλλάξεων στο σύμπλεγμα β γονιδίων των ασθενών της μελέτης και σύγκριση με ασθενείς με μείζονα MA\*.

Μεταλλάξεις στο β-γονίδιο	Μείζων-MA Ποσοστό Αλληλιών (%)*	Ενδιάμεση β-MA				Σύνολο n=136 (%)
		Μεταγγίσεις			Σύνολο (%)	
		Αμετάγγιστοι (%)	Συστηματικά Μεταγγισμένοι (%)			
<b><u>Σιωπηρού τύπου μεταλλάξεις</u></b> -101 [C-T] 3' UTR term+6 [C-G]	- -	11 (8,1) 6 (4,4)	0 (0,0) 1 (0,7)	11 (8,1) 7 (5,1)	<b>18 (13,2)</b>	
<b><u>Πολύ ήπιες (β<sup>++</sup>) μεταλλάξεις</u></b> IVSI-6 [T-C] -87 [C-G] polyA (AATAAA-AATGAA) -28 [A-G]	7,0 1,8 0,2 0,2	18 (13,2) 8 (5,9) 2 (1,5) 1 (0,7)	8 (5,9) 1 (0,7) 0 (0,0) 0 (0,0)	26 (19,1) 9 (6,6) 2 (1,5) 1 (0,7)	<b>38 (27,9)</b>	
<b><u>(β<sup>+</sup>) μεταλλάξεις</u></b> IVSI-110 [G-A] IVSII-745 [C-G]	44,0 5,6	12 (8,8) 2 (1,5)	5 (3,7) 0 (0,0)	17 (12,5) 2 (1,5)	<b>19 (14,0)</b>	
<b><u>(β<sup>0</sup>) μεταλλάξεις</u></b> CD39 [C-T] IVSI-1 [G-A] IVSII-1 [G-A] CD6 [-A] IVSI-130	16,5 12,2 2,7 2,3 -	8 (5,9) 10 (7,3) 5 (3,7) 3 (2,2) 1 (0,7)	1 (0,7) 3 (2,2) 2 (1,5) 4 (2,9) 0 (0,0)	9 (6,6) 13 (9,5) 7 (5,2) 7 (5,1) 1 (0,7)	<b>37 (27,1)</b>	
<b><u>δβ μεταλλάξεις</u></b> δ <sup>0</sup> β <sup>+</sup> Corfu δβ Lepore (δβ) <sup>0</sup> Sicilian (δβ) <sup>0</sup> Macedonia	1,1 2,1	4 (2,9) 2 (1,5) 5 (3,7) 1 (0,7)	4 (2,9) 2 (1,5) 3 (2,2) 1 (0,7)	8 (5,9) 4 (2,9) 8 (5,9) 2 (1,5)	<b>22 (16,2)</b>	
<b><u>Άγνωστη</u></b>	-	1 (0,7)	1 (0,7)	2 (0,7)	<b>2 (1,5)</b>	

\* Κατπάμης Χ. (2004) Διαχρονική εξέλιξη της μελέτης και αντιμετώπισης της μεσογειακής αναιμίας. Δελτ Α' Παιδιατρ Κλιν Πανεπ Αθηνών. 51(3): 229-239.

## **Αιματολογικός έλεγχος ασθενών στη διάγνωση**

Στους Πίνακες 10 και 11 αποτυπώνονται τα συνοπτικά αιματολογικά ευρήματα στο σύνολο των 70 ασθενών με βάση τις μεταγγίσεις (10) και τον κλινικό φαινότυπο (11). Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη μέση τιμή αιμοσφαιρίνης, αιματοκρίτη και ερυθροκυτταρικών δεικτών μεταξύ των μεταγγισμένων και αμετάγγιστων ασθενών. Αντίθετα ανευρίσκεται στατιστικά σημαντική διαφορά στα ποσοστά της HbF και της HbA. Στους αμετάγγιστους η μέση τιμή της HbF ήταν σαφώς χαμηλότερη  $39,3 \pm 33,3\%$  σε σχέση με τους μεταγγισμένους  $69,7 \pm 29,0\%$  ( $p < 0,01$ ) ενώ η HbA αντίστοιχα σαφώς υψηλότερη  $55,1 \pm 31,3\%$  σε σχέση με  $26,0 \pm 27,7\%$  ( $p < 0,01$ ).

Ως προς τον κλινικό φαινότυπο, οριακή στατιστικά σημαντική διαφορά ανευρίσκεται στα ποσοστά HbF, HbA και HbA2. Οι ασθενείς με βαρύ κλινικό φαινότυπο παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα HbF ( $59,9 \pm 35,0\%$  έναντι  $41,3 \pm 33,5\%$ ) και χαμηλότερα HbA2 ( $3,7 \pm 1,9\%$  έναντι  $5,2 \pm 3,1\%$ ) σε σχέση με εκείνους με ήπιο κλινικό φαινότυπο.

Τα επιμέρους ποσοστά των αιμοσφαιρινών σε σχέση με τους αιματολογικούς φαινότυπους καταγράφονται στον Πίνακα 12. Οι διαφορές στα ποσοστά της HbF καταδεικνύουν τη σημασία που έχει για την οξυγόνωση το είδος της αιμοσφαιρίνης. Έτσι ασθενείς που είχαν σε μεγαλύτερο ποσοστό HbF η οποία έχει μεγαλύτερη συγγένεια με το O<sub>2</sub> παρουσίασαν σε υψηλότερο ποσοστό υποξία και χρειάστηκε σε κάποιο χρονικό διάστημα της ζωής τους να μεταγγιστούν σε σχέση με αυτούς που διέθεταν υψηλότερα επίπεδα HbA.

Πίνακας 10: Αιματολογικός έλεγχος των ασθενών σε σχέση με τις μεταγγίσεις.

Ασθενείς	Αριθμός ασθενών	Αιματολογικός έλεγχος				
		Hb σε gr/dl (Εύρος)	Ht % (Εύρος)	HbF % (Εύρος)	HbA <sub>2</sub> % (Εύρος)	HbA % (Εύρος)
Αμετάγγιστοι	52	9,0±1,7 (5,4-14,8)	29,5±5,1 (18,0-43,0)	39,3±33,3 (2,5-100,0)	5,3±3,0 (0,0-15,1)	55,1±31,3 (0,0-91,6)
Συστηματικά Μεταγγισμένοι	18	8,8±1,6 (6,5-12,0)	28,8±4,4 (23,0-38,0)	69,7±29,0 (6,0-98,0)	3,2±1,8 (0,0-7,2)	26,0±27,7 (0,0-86,8)
Σύνολο	70	8,9±1,7 (5,4-14,8)	29,3±4,9 (18,0-43,0)	47,1±34,7 (2,5-100,0)	4,7±2,8 (0,0-15,1)	47,6±32,8 (0,0-91,6)
Στατιστική ανάλυση		p>0,05	p>0,05	p<0,01	p<0,01	p<0,01

Πίνακας 11: Αιματολογικός έλεγχος των ασθενών σε σχέση με τον κλινικό φαινότυπο.

Κλινικός Φαινότυπος	Αριθμός ασθενών	Αιματολογικός έλεγχος				
		Hb σε gr/dl (Εύρος)	Ht % (Εύρος)	HbF % (Εύρος)	HbA <sub>2</sub> % (Εύρος)	HbA % (Εύρος)
Βαρύς (I1)	24	8,6±1,5 (7,0-12,0)	28,3±4,4 (21,0-38,0)	59,9±35,0 (2,5-98,0)	3,7±1,9 (0,0-7,2)	35,5±33,7 (0,0-91,6)
Ήπιος (I2)	46	9,1±1,7 (5,4-14,8)	29,8±5,0 (18,0-43,0)	41,3±33,5 (3,5-100,0)	5,2±3,1 (0,0-15,1)	53,1±31,3 (0,0-91,2)
Σύνολο	70	8,9±1,7 (5,4-14,8)	29,3±4,9 (18,0-43,0)	47,1±34,7 (2,5-100,0)	4,7±2,8 (0,0-15,1)	47,6±32,8 (0,0-91,6)
Στατιστική ανάλυση		p>0,05	p>0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05

**Πίνακας 12:** Ποσοστά HbF, HbA και HbA<sub>2</sub> ανά αιματολογικό φαινότυπο των ασθενών

<b>Αιματολογικός φαινότυπος</b>	<b>Αριθμός Ασθενών</b>	<b>Hb F % (εύρος)</b>	<b>Hb A % (εύρος)</b>	<b>Hb A<sub>2</sub> % (εύρος)</b>
$\beta^{sil} / \beta^0$ ή $\beta^+$	18	11,7±7,5 (3,5-34,7)	81,5±7,4 (60,0-90,9)	6,8±2,3 (2,9-14,5)
$\beta^{++} / \beta^{++}$	11	30,5±19,0 (8,7-61,9)	63,1±18,7 (31,6-84,1)	6,4±1,1 (4,2-8,6)
$\beta^{++} / \beta^+$	8	57,6±15,8 (26,2-82,1)	38,5±14,6 (15,3-66,8)	3,9±1,6 (1,7-7,0)
$\beta^{++} / \beta^0$	5	50,6±25,3 (10,1-76,9)	43,3±20,5 (20,8-74,8)	6,1±5,1 (2,3-15,1)
$\beta^+ / \beta^0$	3	82,9±5,7 (76,5-87,4)	13,5±4,9 (9,9-19,0)	3,7±0,9 (2,7-4,5)
$\beta^0 / \beta^0$	1	97,7	0	2,3
$\beta^{thal} / \delta\beta$	19	86,8±14,3 (54,5-100,0)	9,8±11,8 (0,0-42,6)	1,9±1,5 (0,0-5,9)
$\beta^0 /$ Άγνωστη	1	20,2	75,3	4,5
$\beta^0 /$ Hb Crete	1	15,0	71,3	6,1
<b>Σύνολο</b>	<b>67</b>	<b>49,1±34,1 (3,5-100,0)</b>	<b>45,6±32,2 (0,0-90,9)</b>	<b>4,7±2,9 (0-15,1)</b>
$\beta^0 /$ A & ααα/αα ή ααα/ααα	3	3,1±0,7 (2,5-3,8)	91,5±0,2 (91,2-91,6)	5,5±0,5 (5,0-5,9)

\*  $\beta^{sil}$ : σιωπηρού τύπου γονίδιο,  $\beta^{thal}$ :  $\beta^0$  ή  $\beta^+$  ή  $\beta^{++}$

## **Κλινικά Ευρήματα**

Τα βασικά κλινικά ευρήματα και οι επιπλοκές της ενδιάμεσης Μεσογειακής αναιμίας στο σύνολο και στις δυο ομάδες των ασθενών που μελετήθηκαν συνοψίζονται στον [Πίνακα 13](#).

Από τις κλινικές εκδηλώσεις και επιπλοκές στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ αμετάγγιστων και μεταγγισμένων ασθενών βρέθηκαν στις οστικές αλλοιώσεις, συχνότερες και βαρύτερες στους μεταγγισμένους, στην εξωμυελική αιμοποίηση και στη συχνότητα σπληνεκτομής.

Αντίθετα δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη βαρύτητα του ικτέρου, στη συχνότητα της χολολιθίασης και τη χολοκυστεκτομή όπως και στη διαταραχή της αύξησης. Και στις δύο ομάδες το ποσοστό των ασθενών κάτω από την 3<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση είναι χαμηλό (4-5%) σε σχέση με τη μείζονα β-ΜΑ.

**Πίνακας 13:** Συνοπτική καταγραφή κλινικών ευρημάτων στους ασθενείς της μελέτης

Κλινικά ευρήματα	Σύνολο	Αμετάγγιστοι	Μεταγγισμένοι	Στατιστική ανάλυση
<b>Σπληνομεγαλία<sup>1</sup></b>				
Όχι	2/41 (4,9%)	2/38 (5,3%)	0/3 (0,0%)	p>0,05
+	8/41 (19,5%)	7/38 (18,4%)	1/3 (33,3%)	
++	8/41 (19,5%)	8/38 (21,1%)	0/3 (0,0%)	
+++	23/41 (56,1%)	21/38 (55,3%)	2/3 (66,7%)	
Σπληνεκτομή	29 (41,4%)	14 (26,9%)	15 (83,3%)	p<0,001
Μέση ηλικία σπληνεκτομής (εύρος)	16,3±8,3 έτη (6 -46,0)	17,4±10,4 έτη (7 -46,0)	15,3±5,9 έτη (6-27,0)	p>0,05
<b>Οστικές Αλλοιώσεις<sup>2</sup></b>				
Όχι	8 (11,4%)	8 (15,4%)	0 (0,0%)	p<0,05
Ήπιες	27 (38,6%)	20 (38,5%)	7 (38,9%)	
Μέτριες	29 (41,4%)	22 (42,3%)	7 (38,9%)	
Βαριές	6 (8,6%)	2 (3,8%)	4 (22,2%)	
Εξωμυελική αιμοποίηση	11 (15,7%)	5 (9,6%)	6 (33,3%)	p<0,01
Χολολιθίαση	29 (41,4%)	20 (38,5%)	9 (50,0%)	p>0,05
Χολοκυστεκτομή	37 (52,9%)	25 (48,1%)	12 (66,7%)	p>0,05
Έλκη κάτω άκρων	3 (4,3%)	2 (3,8%)	1 (5,6)	p>0,05
Διαταραχή αύξησης (Ύψος<3 <sup>η</sup> ΕΘ) <sup>3</sup>	3 (4,2%)	2 (3,8%)	1 (5,2%)	p>0,05
Καρδιακή ανεπάρκεια (EF<55%) <sup>4</sup>	3/52 (5,8%)	2/35 (5,7%)	1/17 (5,9%)	p>0,05

## Παρατηρήσεις Πίνακα 13

- <sup>1</sup> Το μέγεθος του σπλήνα μελετήθηκε υπερηχογραφικά. Εκτιμήθηκε ο επιμήκης άξονας του οργάνου και η προσθοπίσθια διάμετρος στο επίπεδο της πύλης του σπλήνα. Η σπληνομεγαλία χαρακτηρίστηκε ως ήπια (+) όταν τουλάχιστον δύο μετρήσεις έδωσαν τιμές μέχρι 2 cm μεγαλύτερες από την ανώτερη φυσιολογική τιμή για την ηλικία του ασθενούς (Rosenberg et al, 1991), ως μέτρια (++) όταν η διαφορά ήταν λιγότερη από 3 cm και ως βαριά (+++) όταν ήταν μεγαλύτερη από 3-4 cm. Κατά την περίοδο της υπερηχογραφικής εκτίμησης του μεγέθους του σπλήνα 30/71 (42,3%) ασθενείς είχαν ήδη υποβληθεί σε σπληνεκτομή.
- <sup>2</sup> Προκειμένου να εκτιμηθούν οι οστικές αλλοιώσεις των ασθενών έγινε ακτινογραφία πλαγία κρανίου και μακρών οστών. Η οστεοπόρωση χαρακτηρίστηκε ως ήπια όταν τα οστά του κρανίου παρουσίαζαν μικροκηλιδώδη υφή, ως μέτρια όταν επιπρόσθετα υπήρχε και πάχυνση της διπλής και ως βαριά όταν στα οστά του κρανίου υπήρχε ψηκτροειδής παρυφή.
- <sup>3</sup> Μετρήθηκε το ύψος των ασθενών και καταγράφηκε στις καμπύλες του ΠΟΥ για το ύψος ως προς την ηλικία και το φύλο (de Onis et al, WHO, 2007)
- <sup>4</sup> Οι ασθενείς ηλικίας >12 ετών μελετήθηκαν με ηχοκαρδιογράφημα M-mode και Doppler. Εκτιμήθηκαν: το κλάσμα βράχυνσης (SF), και το κλάσμα εξώθησης (EF). Ως καρδιακή ανεπάρκεια θεωρήθηκε η διαταραχή της συσταλτικότητας της αριστερής κοιλίας που ορίστηκε ως τιμή του κλάσματος εξώθησης <55% ή του κλάσματος βράχυνσης <30%.



## **Μεταγγίσεις**

Οι ασθενείς στην πλειοψηφία τους 52/70 (74,3%) δεν υποβλήθηκαν σε συστηματικές μεταγγίσεις (Πίνακας 14). Στην κατηγορία των αμετάγγιστων ασθενών συμπεριελήφθησαν και 27 ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε περιορισμένο αριθμό ευκαιριακών μεταγγίσεων (1-10) στα πλαίσια χειρουργικών επεμβάσεων (σπληνεκτομή, χολοκυστεκτομή, σκωληκοειδεκτομή, γυναικολογικές επεμβάσεις).

Σε πρόγραμμα συστηματικών μεταγγίσεων εντάχθηκαν συνολικά 18 από τους 70 ασθενείς (25,7%). Οι ενδείξεις για έναρξη συστηματικών μεταγγίσεων ήταν η χαμηλή τιμή αιμοσφαιρίνης, οι σοβαρές οστικές αλλοιώσεις και η παραμόρφωση στα οστά του προσώπου που έδιναν χαρακτηριστικό προσωπίο, η αναστολή της ανάπτυξης, η εξωμυελική αιμοποίηση και η χρόνια κούραση. Για την ομάδα των μεταγγισμένων ασθενών η μέση ηλικία της πρώτης μετάγγισης ήταν  $7,0 \pm 4,0$  έτη, η μέση ηλικία έναρξης συστηματικών μεταγγίσεων ήταν  $7,1 \pm 4,1$  έτη και η μέση διάρκειά τους  $11,9 \pm 6,1$  έτη. Από τη στατιστική ανάλυση προέκυψε ότι η συχνότητα των μεταγγίσεων συσχετίζεται με τον αιματολογικό φαινότυπο σε βαθμό στατιστικά σημαντικό ( $p < 0,05$ ) (Πίνακας 14). Η συσχέτιση των μεταγγίσεων με το γονότυπο των ασθενών φαίνεται στον Πίνακα 15.

Από τους 19 ασθενείς οι περισσότεροι (15) έχουν σήμερα διακόψει τις συστηματικές μεταγγίσεις κυρίως μετά τη διενέργεια σπληνεκτομής ενώ συνεχίζουν να μεταγγίζονται 4 ασθενείς.

Από το σύνολο των 46 ασθενών που υποβλήθηκαν σε ποικίλο αριθμό μεταγγίσεων, αλλοανοσοποίηση παρουσίασαν 4 (8,7%).

**Πίνακας 14:** Συσχέτιση μεταγγίσεων με τον αιματολογικό φαινότυπο των ασθενών της μελέτης.

Αιματολογικός φαινότυπος	Αριθμός Ασθενών	Μεταγγίσεις	
		Αμετάγγιστοι	Μεταγγισμένοι
$\beta^{sil} / \beta^0$ ή $\beta^+$	18	17 (94,4%)	1 (5,6%)
$\beta^{++} / \beta^{++}$	11	9 (81,8%)	2 (18,2%)
$\beta^{++} / \beta^+$	8	7 (87,5%)	1 (12,5%)
$\beta^{++} / \beta^0$	5	3 (60,0%)	2 (40,0%)
$\beta^+ / \beta^0$	3	0 (0,0%)	3 (100,0%)
$\beta^0 / \beta^0$	1	1 (100,0%)	0 (0,0%)
$\beta^{thal} / \delta\beta$	19	10 (52,6%)	9 (47,4%)
$\beta^0$ ή $\delta\beta / ?$	1	1 (100,0%)	0 (0,0%)
$\beta^0 / \text{Hb Crete}$	1	1 (100,0%)	0 (0,0%)
$\beta^0 / A \ \& \ \alpha\alpha/\alpha\alpha$ ή $\alpha\alpha/\alpha\alpha$	3	3 (100,0%)	0 (0,0%)
<b>Σύνολο</b>	<b>70</b>	<b>52 (74,3%)</b>	<b>18 (25,7%)</b>
Στατιστική ανάλυση		p<0,05	

\*  $\beta^{sil}$ : σιωπηρού τύπου γονίδιο,  $\beta^{thal}$ :  $\beta^0$  ή  $\beta^+$  ή  $\beta^{++}$

Πίνακας 15: Συσχέτιση μεταγγίσεων με το γονότυπο των ασθενών.

	<b>Αμετάγγιστοι</b>	<b>N</b>	<b>Μεταγγισμένοι</b>	<b>N</b>
<b>Γονότυπος</b>	-101 / CD39	5	-87 / δβ Lepore	1
	-101 / IVS1-1	4	(δβ)0 Sicilian / ?	1
	-101 / IVS1-130	1	CD39 / (δβ)0 Macedonia	1
	-101 / IVS1-110	1	IVS1-1 / 3' UTR term+6	1
	-87 / -87	1	IVS1-110 / CD6	2
	-87 / -87 & aaa/aa	1	IVS1-110 / IVS1-6	1
	(δβ)0 Sicilian / (δβ)0 Sicilian	1	IVS1-110 / IVS2-1	1
	CD39 / 3' UTR term+6	1	IVS1-110 / δβ Lepore	1
	CD39 / A & aaa/aa	2	IVS1-6 / (δβ)0 Sicilian	1
	CD6 [-A] / ?	1	IVS1-6 / CD6	1
	IVS1-1 / 3' UTR term+6	1	IVS1-6 / IVS1-1	1
	IVS1-1 / A & aaa/aa	1	IVS1-6 / IVS1-6	2
	IVS1-1 / Hb Crete	1	IVS2-1 / (δβ)0 Sicilian	1
	IVS1-110 / -87 & aaa/aa	1	δ0β+ Corfu / CD6	1
	IVS1-110 / (δβ)0 Macedonia	1	δ0β+ Corfu / IVS2-1	1
	IVS1-110 / (δβ)0 Sicilian & --MED/aa	1	δ0β+ Corfu / δ0β+ Corfu	1
	IVS1-110 / 3' UTR term+6	3		
	IVS1-110 / AATAAA-AATGAA (polyA) & -a/aa	1		
	IVS1-110 [G-A] / δβ Lepore	1		
	IVS1-110 / IVS1-6	3		
	IVS1-6 / -28	1		
	IVS1-6 / -87	3		
	IVS1-6 / CD6	1		
	IVS1-6 / IVS1-1 & -a/aa	1		
	IVS1-6 / IVS1-1 & -a/-MED	1		
	IVS1-6 / IVS1-6	3		
	IVS1-6 / IVS2-745	2		
	IVS2-1 / (δβ)0 Sicilian	2		
	IVS2-1 / CD6	1		
	polyA / δβ Lepore	1		
	δ0β+ Corfu / IVS2-1	2		
	δ0β+ Corfu / δ0β+ Corfu	1		
	IVS1-1 / 3' UTR term+6	1		

## **Βιοχημικός έλεγχος αιμοσιδήρωσης**

Ο βαθμός αιμοσιδήρωσης εκτιμήθηκε με τη μέτρηση των παρακάτω παραμέτρων στον ορό των ασθενών:

1. Φερριτίνη
2. Σίδηρος ορού
3. Ολική σιδηροδεσμευτική ικανότητα
4. Κορεσμό τρανσφερρίνης
5. Μη δεσμευμένος με τρανσφερρίνη σίδηρος

Στους Πίνακες 16 και 17 αναγράφονται οι μέση τιμή, η σταθερή απόκλιση και το εύρος των τιμών των παραπάνω παραμέτρων στο σύνολο των ασθενών και συγκριτικά με βάση τις μεταγγίσεις (16) και με βάση τον κλινικό φαινότυπο (17).

Είναι χαρακτηριστικό ότι όλοι οι δείκτες αιμοσιδήρωσης βρέθηκαν σημαντικά αυξημένοι στο σύνολο των ασθενών με ενδιάμεση β-ΜΑ, με υψηλές μέσες τιμές αλλά και ευρύτατες διακυμάνσεις. Χαρακτηριστικό είναι επίσης πως ορισμένοι δείκτες (φερριτίνη, σίδηρος, κορεσμός τρανσφερρίνης και NTBI) βρέθηκαν σε φυσιολογικά επίπεδα σε μικρό αριθμό ασθενών. Αξιοσημείωτες είναι οι στατιστικά σημαντικές διαφορές στις μέσες τιμές της φερριτίνης, του σιδήρου, του κορεσμού τρανσφερρίνης και του NTBI στην ομάδα των μεταγγισμένων ασθενών σε σχέση με τους μη μεταγγισμένους αλλά και σε αυτή με βαρύ κλινικό φαινότυπο έναντι αυτής με ήπιο. Η σημασία των μεταγγίσεων στην επιβάρυνση των ασθενών με σίδηρο φαίνεται και από τη σύγκριση των δεικτών αιμοσιδήρωσης μεταξύ των 25 ασθενών που δεν έχουν καθόλου μεταγγιστεί και των 27 ασθενών με περιστασιακές μεταγγίσεις (1-10).

**Πίνακας 16:** Επίπεδα φερριτίνης, σιδήρου, ολικής σιδηροδεσμευτικής ικανότητας (ΤΙΒC) κορεσμού τρανσφερρίνης και NTBI των ασθενών της μελέτης σε σχέση με τις μεταγγίσεις

Μεταγγίσεις		Αριθμός Ασθενών ν	Φερριτίνη (εύρος) (σε µg/L)	Σίδηρος (εύρος) (σε µg/dl)	Ολική Σιδηροδεσμευτική Ικανότητα (εύρος) (σε µg/dl)	Κορεσμός Τρανσφερρίνης (εύρος) (%)	NTBI* (εύρος) (σε µmol/L)
<b>Αμετάγγιστοι</b>	<b>Καμία μετάγγιση</b>	25	196,2 ± 276,8 (19,0-1183)	122,2 ± 50,8 (44,0-232,8)	258,8 ± 46,8 (154,8-334,8)	49,3 ± 23,0 (16,3-98,0)	1,4 ± 1,6 (0,0-5,2)
	<b>Περιστασιακές μεταγγίσεις</b>	27	555,7 ± 667,2 (39,0-2496,0)	151,5 ± 55,7 (60,0-277,0)	251,2 ± 55,0 (180,0-428,4)	62,0 ± 23,3 (27,2-97,1)	2,4 ± 2,1 (0,0-6,6)
	Σύνολο	52	382,9 ± 544,0 (19,0-2496,0)	137,4 ± 54,9 (44,0-277,0)	254,9 ± 50,9 (154,8-428,4)	55,9 ± 23,8 (16,3-98,0)	1,9 ± 2,0 (0,0-6,6)
	Στατιστική ανάλυση Αμετάγγιστων (καμία – περιστασιακές)			p<0,05	p<0,05	p>0,05	p>0,05
<b>Μεταγγισμένοι</b>		18	1248,9 ± 835,5 (540,0-3495,0)	213,7 ± 47,2 (136,8-290,4)	268,5 ± 58,5 (165,6-381,6)	79,9 ± 9,5 (66,1-98,0)	4,6 ± 0,8 (3,2-5,9)
Σύνολο		<b>70</b>	<b>605,6 ± 732,1 (19,0-3495,0)</b>	<b>157,0 ± 62,5 (44,0-290,4)</b>	<b>258,4 ± 52,8 (154,8-428,4)</b>	<b>62,1 ± 23,56 (16,3-98,0)</b>	<b>2,7 ± 2,1 (0,0-6,6)</b>
Στατιστική ανάλυση (Αμετάγγιστων-Μεταγγισμένων)			p<0,001	p<0,001	p>0,05	p<0,001	p<0,001

\* Ο NTBI μετρήθηκε σε 65 ασθενείς (46 αμετάγγιστους και 19 μεταγγισμένους)

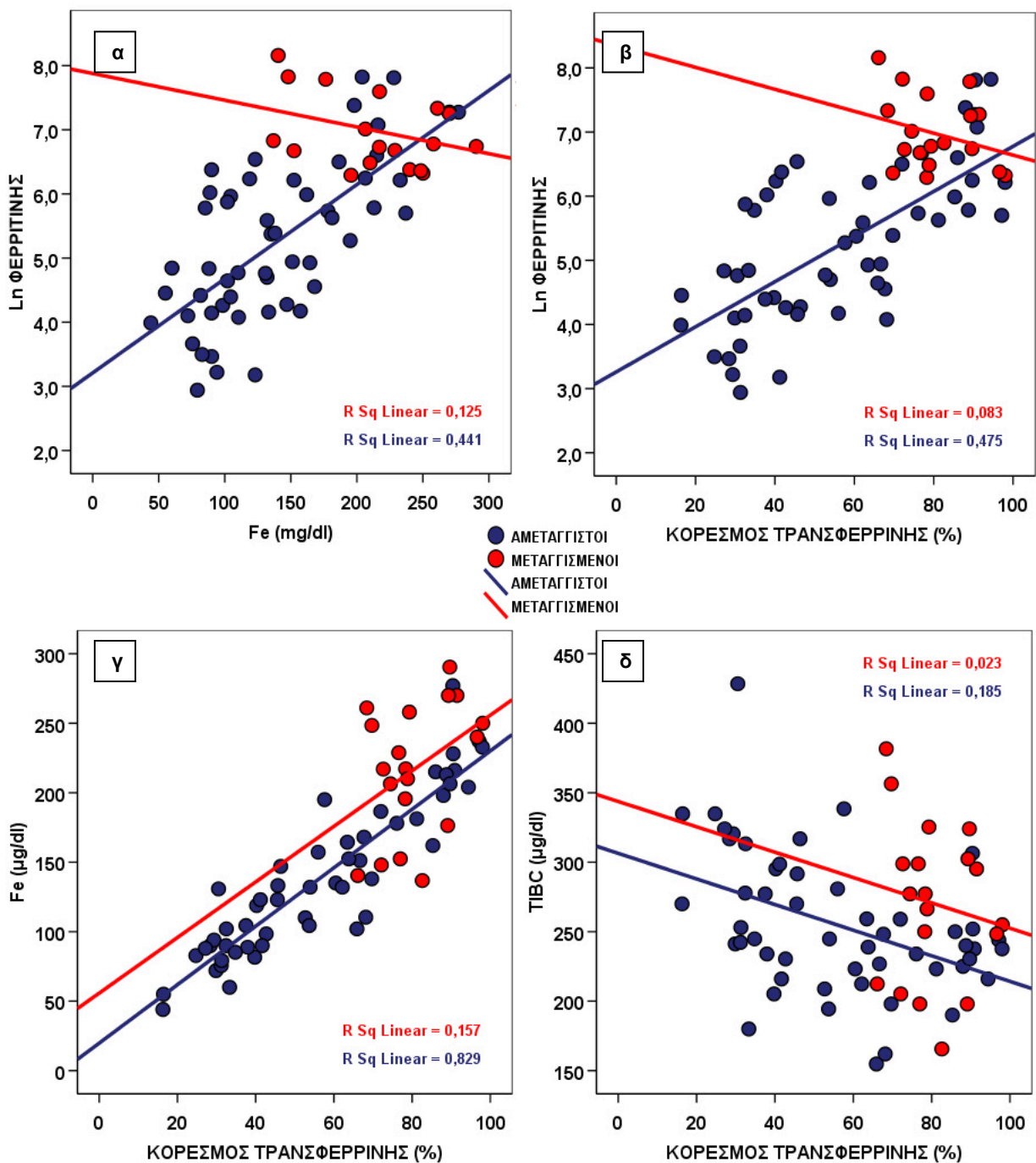
**Πίνακας 17:** Επίπεδα φερριτίνης, σιδήρου, ολικής σιδηροδεσμευτικής ικανότητας (ΤΙΒC) κορεσμού τρανσφερρίνης και NTBI των ασθενών της μελέτης σε σχέση με τον κλινικό φαινότυπο

Κλινικός φαινότυπος	Αριθμός Ασθενών	Φερριτίνη (εύρος) (σε µg/L)	Σίδηρος (εύρος) (σε µg/dl)	Ολική Σιδηροδεσμευτική Ικανότητα (εύρος) (σε µg/dl)	Κορεσμός Τρανσφερρίνης (εύρος) (%)	NTBI* (εύρος) (σε µmol/L)
Βαρύς (I1)	24	1015,9 ± 880,6 (59,0-3495,0)	190,6 ± 62,8 (72,0-290,4)	263,2 ± 55,3 (165,6-381,6)	72,1 ± 18,3 (29,9-98,0)	4,2 ± 1,4 (0,7-6,6)
Ήπιος (I2)	46	391,5 ± 537,4 (19,0-2496,0)	139,5 ± 55,3 (44,0-277,0)	255,9 ± 52,0 (154,8-428,4)	56,8 ± 24,4 (16,3-98,0)	1,8 ± 1,9 (0,0-5,6)
Σύνολο	70	605,6 ± 732,1 (19,0-3495,0)	157,0 ± 62,5 (44,0-290,4)	258,4 ± 52,8 (154,8-428,4)	62,1 ± 23,56 (16,3-98,0)	2,7 ± 2,1 (0,0-6,6)
Στατιστική ανάλυση		p<0,001	p<0,001	p>0,05	p<0,01	p<0,0001

\* Ο NTBI μετρήθηκε σε 65 ασθενείς (23 I1 και 41 I2)

Στη συνέχεια αναζητήθηκε η πιθανή συσχέτιση των παραπάνω παραγόντων μεταξύ τους. Στην ομάδα των αμετάγγιστων ασθενών ανευρίσκεται στατιστικώς λίαν σημαντική συσχέτιση μεταξύ των τιμών φερριτίνης, σιδήρου, κορεσμού τρανσφερρίνης και NTBI.

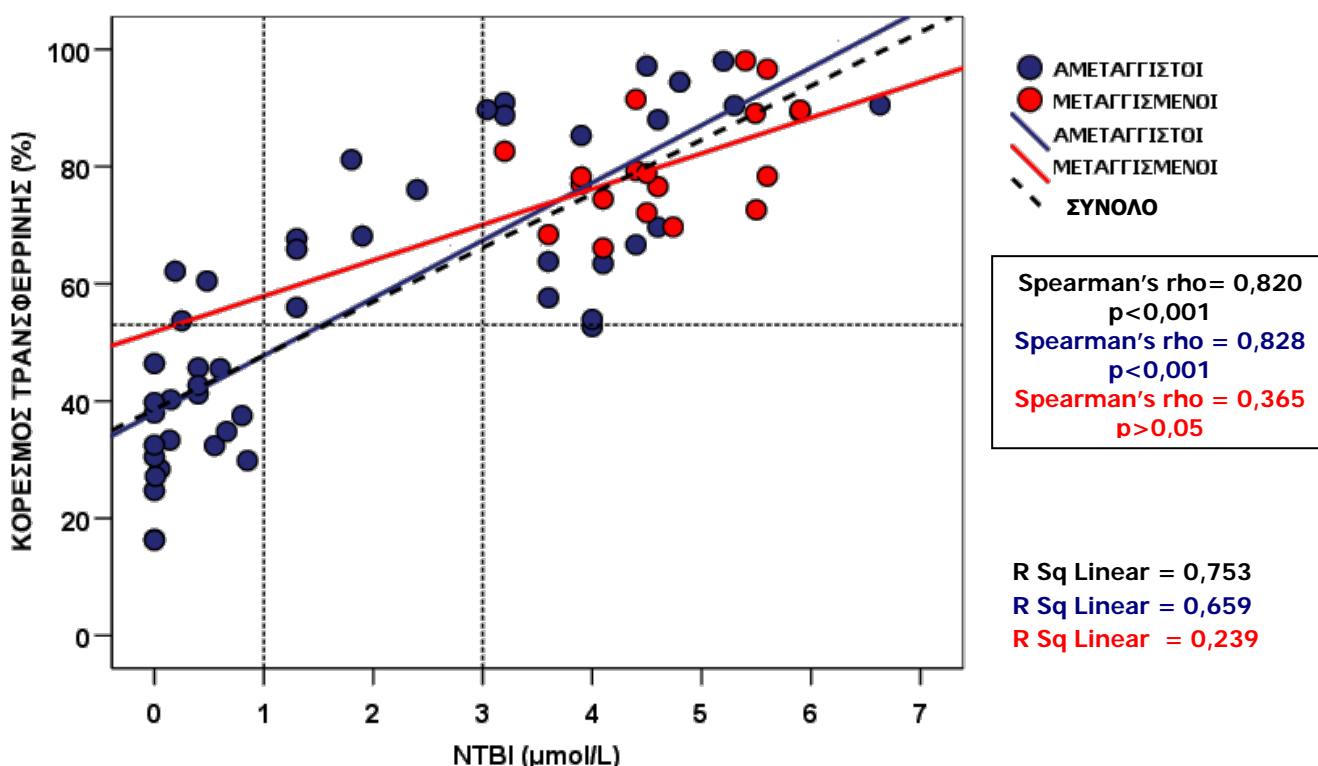
**Διάγραμμα 1:** Γραμμική συσχέτιση παραμέτρων αιμοσιδήρωσης σε σχέση με τις μεταγγίσεις σε ασθενείς με ΕΜΑ.



Συγκεκριμένα ο φυσικός λογάριθμος της τιμής της φερριτίνης συσχετίζεται πολύ ισχυρά με την τιμή του σιδήρου (Διάγραμμα 1α, Pearson=0,664,  $p=0,00000008$ ) και τον κορεσμό της τρανσφερρίνης (Διάγραμμα 1β, Pearson=0,689,  $p=0,000000016$ ). Ακόμη ισχυρότερη είναι η συσχέτιση του σιδήρου με τον κορεσμό της τρανσφερρίνης (Διάγραμμα 1γ, Pearson=0,911,  $p=0,000000001$ ). Η τιμή της ολικής σιδηροδεσμευτικής ικανότητας παρουσιάζει αντίστροφη συσχέτιση σε επίπεδο λίαν σημαντικό μόνο με τον κορεσμό της τρανσφερρίνης (Διάγραμμα 1δ, Pearson=-0,431,  $p=0,0014$ ).

Ο NTBI εμφανίζεται στον ορό όταν ο κορεσμός της τρανσφερρίνης είναι υψηλός. Όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 2 τιμές NTBI >1μmol/L βρέθηκαν σε περιπτώσεις όπου ο κορεσμός τρανσφερρίνης ήταν >55-60%.

**Διάγραμμα 2:** Γραμμική συσχέτιση του NTBI και του κορεσμού τρανσφερρίνης



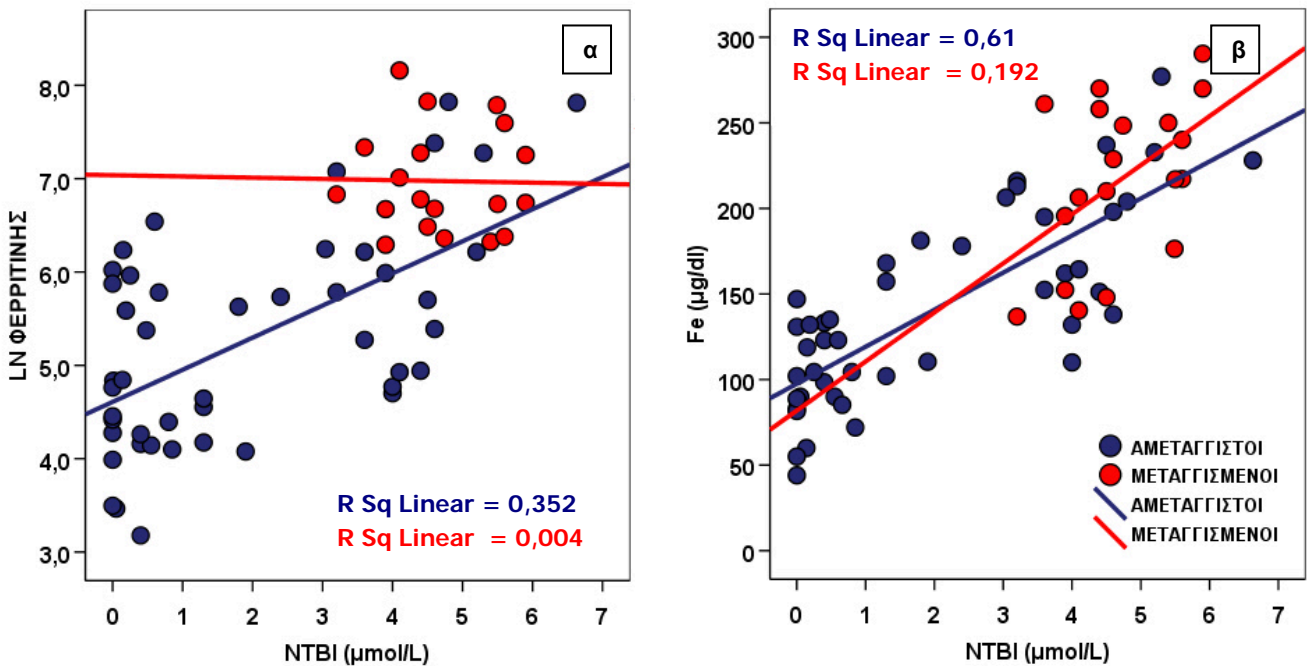
Στην ομάδα των αμετάγγιστων ασθενών το 50% παρουσίαζε τιμές NTBI <1μmol/L ενώ σε ένα ποσοστό 37% οι τιμές ήταν >3 μmol/L. Αντίθετα όλοι οι μεταγγισμένοι ασθενείς παρουσίαζαν τιμές NTBI >3μmol/L. Όπως προαναφέρθηκε η συσχέτιση μεταξύ τους για την ομάδα των αμετάγγιστων ασθενών ήταν λίαν σημαντική



(Spearman  $\rho=0,828$ ,  $p<0,000001$ ) ενώ δεν βρέθηκε συσχέτιση στην ομάδα των μεταγγισμένων ασθενών (Spearman  $\rho=0,365$ ,  $p>0,05$ ).

Ανάλογα ισχυρή ήταν η συσχέτιση των επιπέδων του NTBI με τον λογάριθμο της φερριτίνης (Διάγραμμα 3α, Spearman's  $\rho=0,495$ ,  $p=0,00047$ ) αλλά και την τιμή του σιδήρου (Διάγραμμα 3β, Spearman's  $\rho=0,764$ ,  $p<0,000001$ ) στους αμετάγγιστους ασθενείς.

**Διάγραμμα 3:** Γραμμική συσχέτιση του NTBI με: α) τον φυσικό λογάριθμο (Ln) της φερριτίνης και β) το σίδηρο, σε σχέση με τις μεταγγίσεις σε ασθενείς με EMA.



## Έλεγχος αιμοσιδήρωσης με μαγνητική τομογραφία

Ο βαθμός αιμοσιδήρωσης των ασθενών ελέγχθηκε και με μαγνητική τομογραφία ήπατος και μυοκαρδίου. Ο έλεγχος έγινε σε επιλεγμένο δείγμα ασθενών με κύριο κριτήριο την υψηλή τιμή φερριτίνης.

Συγκεκριμένα ελέγχθηκαν 12 αμετάγγιστοι ασθενείς με EMA και 11 μεταγγισμένοι. Όλοι οι ασθενείς αμετάγγιστοι και μεταγγισμένοι είχαν τιμή φερριτίνης >400 µg/L.

Μετρήθηκαν οι παράμετροι ηπατικό και καρδιακό T2\*, υπολογίστηκε η συγκέντρωση σιδήρου στο ήπαρ (LIC) και το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας (LVEF). Τα συνοπτικά αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 18.

**Πίνακας 18:** Επίπεδα φερριτίνης, ηπατικού και μυοκαρδιακού T2\*, LIC και LVEF των ασθενών σε σχέση με τις μεταγγίσεις

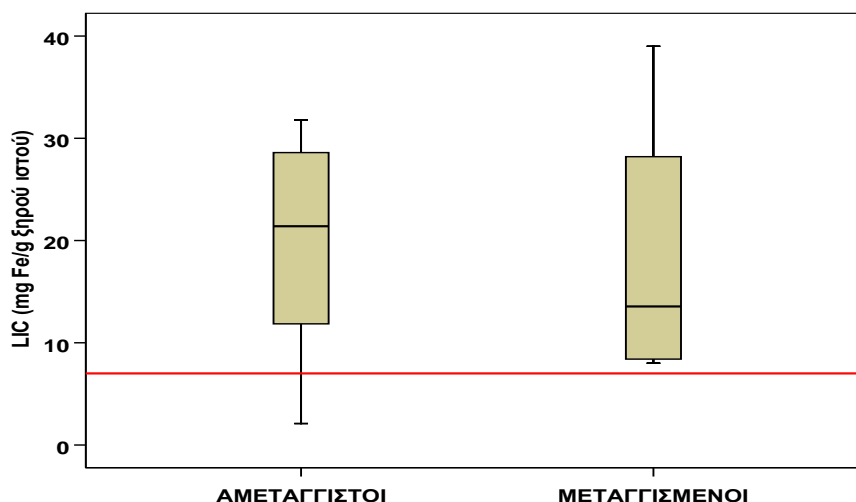
	Αμετάγγιστοι	Μεταγγισμένοι	Συνολικά
Αριθμός Ασθενών	12	11	23
Φερριτίνη (εύρος) (σε µg/L)	1579,9 ± 1076,8 (527,0-4086,0)	1393,5 ± 896,8 (427,0-3031,0)	1490,8 ± 976,9 (427,0-4086,0)
Ηπατικό T2* (εύρος) (σε msec)	2,6 ± 3,5 (0,8-13,2)	1,5 ± 0,9 (0,7-3,2)	2,1 ± 2,7 (0,7-13,2)
LIC (εύρος) (σε mg Fe/g ξηρού ιστού)	19,5 ± 10,6 (2,1-31,8)	18,5 ± 12,5 (8,0-39,0)	19,2 ± 10,9 (2,1-39,0)
Μυοκαρδιακό T2* (εύρος) (σε msec)	34,6 ± 3,3 (28,9-40,2)	35,9 ± 3,3 (30,3-41,8)	35,2 ± 3,3 (28,9-41,8)
LVEF (εύρος) (%)	66,2 ± 5,2 (57,0-73,3)	67,6 ± 4,9 (62,3-79,4)	66,9 ± 5,0 (57,0-79,4)

## Ηπατικός σίδηρος

Η περιεκτικότητα του ηπατικού ιστού σε σίδηρο υπολογίστηκε με μαγνητική τομογραφία και μέτρηση του T2 και κυρίως του T2\*. Τιμές ηπατικού T2\* <6,3 msec υποδηλώνουν ηπατική αιμοσιδήρωση, που ανάλογα με την τιμή T2\* διακρίνεται σε ήπια (6,3-2,7 msec), μέτρια (2,6-1,4 msec) και βαριά (<1,4 msec). Παράλληλα τιμές >7 mg Fe/g ξηρού ιστού έχουν συσχετιστεί με αυξημένη νοσηρότητα και θνητότητα.

Οι τιμές του ηπατικού T2\* στους ασθενείς της μελέτης κυμάνθηκαν μεταξύ 0,7 και 13,2 msec (διάμεσος 1,2 msec) και του LIC μεταξύ 2,1 και 39,0 mg Fe/g ξηρού ιστού (διάμεσος 19,7 mg Fe/g ξηρού ιστού) (Πίνακας 18). Στο σύνολο των αμετάγγιστων ασθενών 2 (16,7%) είχαν ήπια, 2 (16,7%) μέτρια, και 7 (66,6%) βαριά ηπατική αιμοσιδήρωση με βάση την τιμή του ηπατικού T2\*. Τα αντίστοιχα ποσοστά για τους μεταγγισμένους ασθενείς ήταν: 2 (18,2%) ήπια, 1 (9,1%) μέτρια, και 8 (72,7%) βαριά. Σύμφωνα με τις μετρήσεις 81,8% των αμετάγγιστων και 100% των μεταγγισμένων ασθενών είχαν συγκέντρωση σιδήρου στο ήπαρ >7 mg Fe/g ξηρού ιστού. Το εύρος τιμών του ηπατικού T2\* ήταν σαφώς μεγαλύτερο στους αμετάγγιστους ασθενείς σε σχέση με τους μεταγγισμένους αλλά με σχεδόν όμοια διάμεση τιμή (1,25 msec έναντι 1,20 msec). Αντίθετα το εύρος τιμών του LIC ήταν παρόμοιο στις δυο ομάδες αλλά με σαφώς υψηλότερη διάμεση τιμή στους αμετάγγιστους (21,4 έναντι 13,6 mg Fe/g ξηρού ιστού) (Διάγραμμα 4).

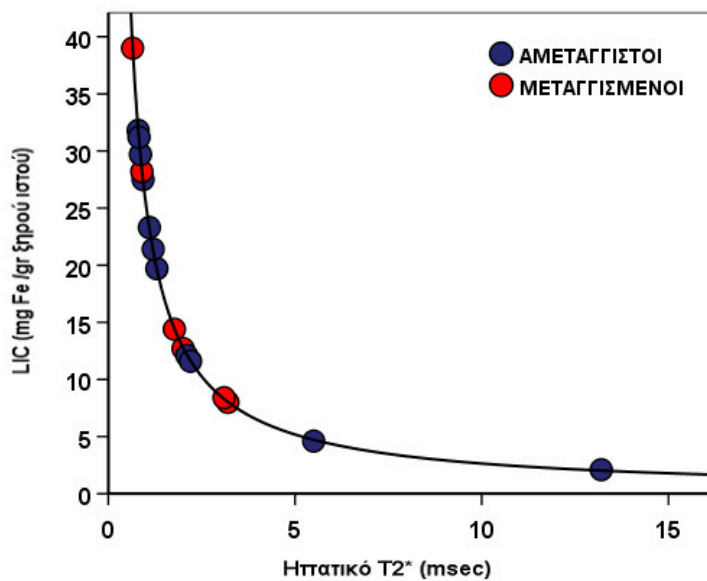
**Διάγραμμα 4:** Box plot του LIC ανάλογα με τις μεταγγίσεις



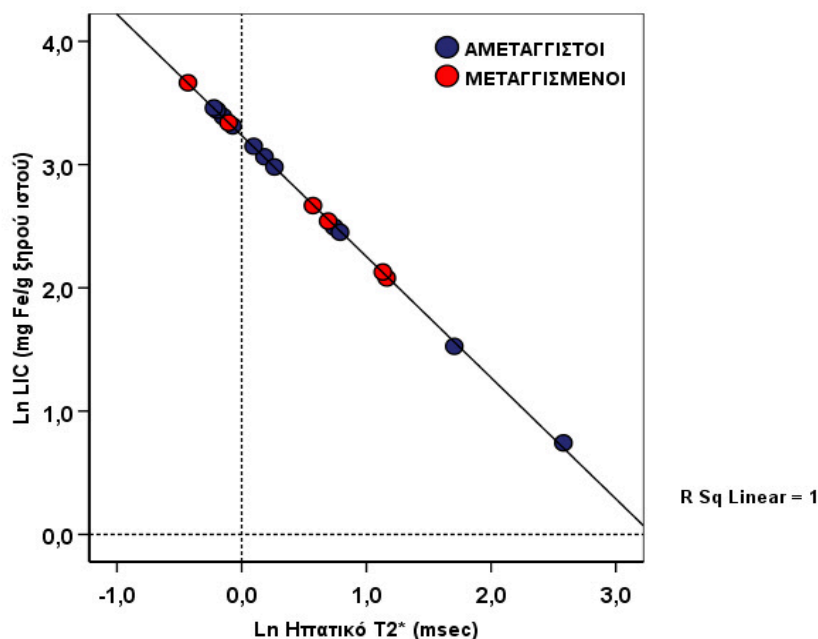
Κατά την αναζήτηση συσχετίσεων μεταξύ των παραμέτρων βρέθηκε:

1) σημαντική ανάστροφη καμπύλη συσχέτιση μεταξύ του ηπατικού T2\* και της συγκέντρωσης σιδήρου στο ήπαρ (Διάγραμμα 5). Η λογαριθμική μετατροπή τους αποδίδει απόλυτη γραμμική συσχέτιση (Διάγραμμα 6) με συντελεστή συσχέτισης Pearson και Spearman = -1,0,  $p < 0,0000001$ ). Πρακτικά αυτό σημαίνει ότι η αύξηση κατά μια μονάδα του ln ( $\log_e$ ) του ηπατικού T2\* σχετίζεται με μείωση κατά μια μονάδα του ln LIC (95% όρια

Διάγραμμα 5: Καμπύλη συσχέτισης ηπατικού T2\* και LIC



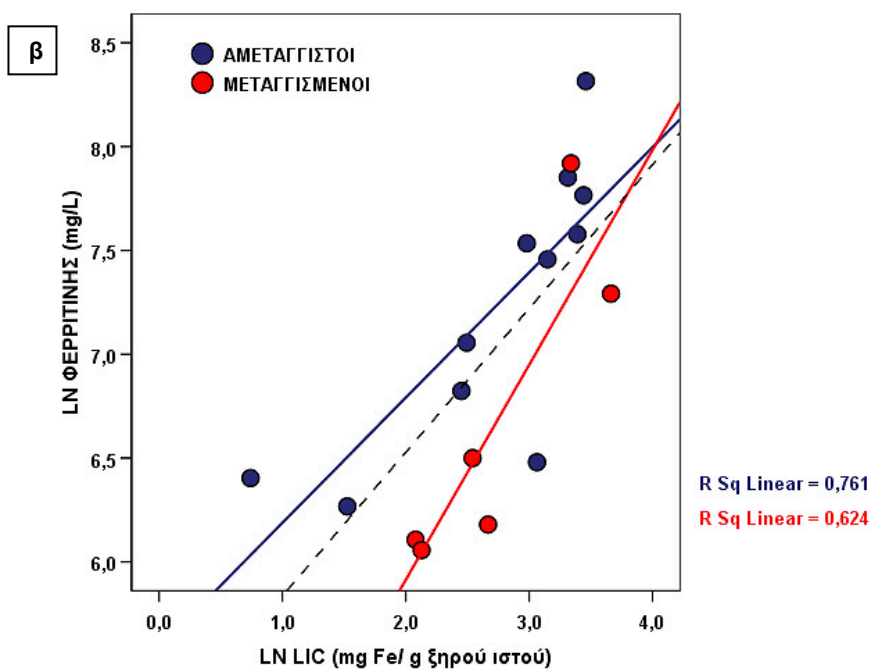
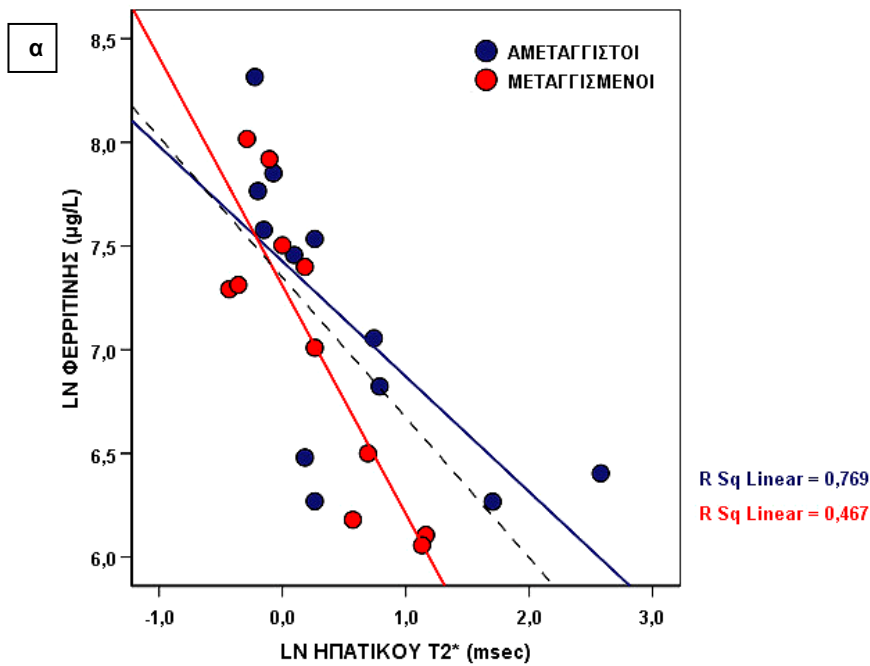
Διάγραμμα 6: Γραμμική συσχέτιση ηπατικού T2\* και LIC



αξιοπιστίας -1,04 ως -1,02). Σημειώνεται ότι η παραπάνω συσχέτιση δεν διαφοροποιείται καθόλου είτε πρόκειται για αμετάγγιστους είτε για μεταγγισμένους ασθενείς.

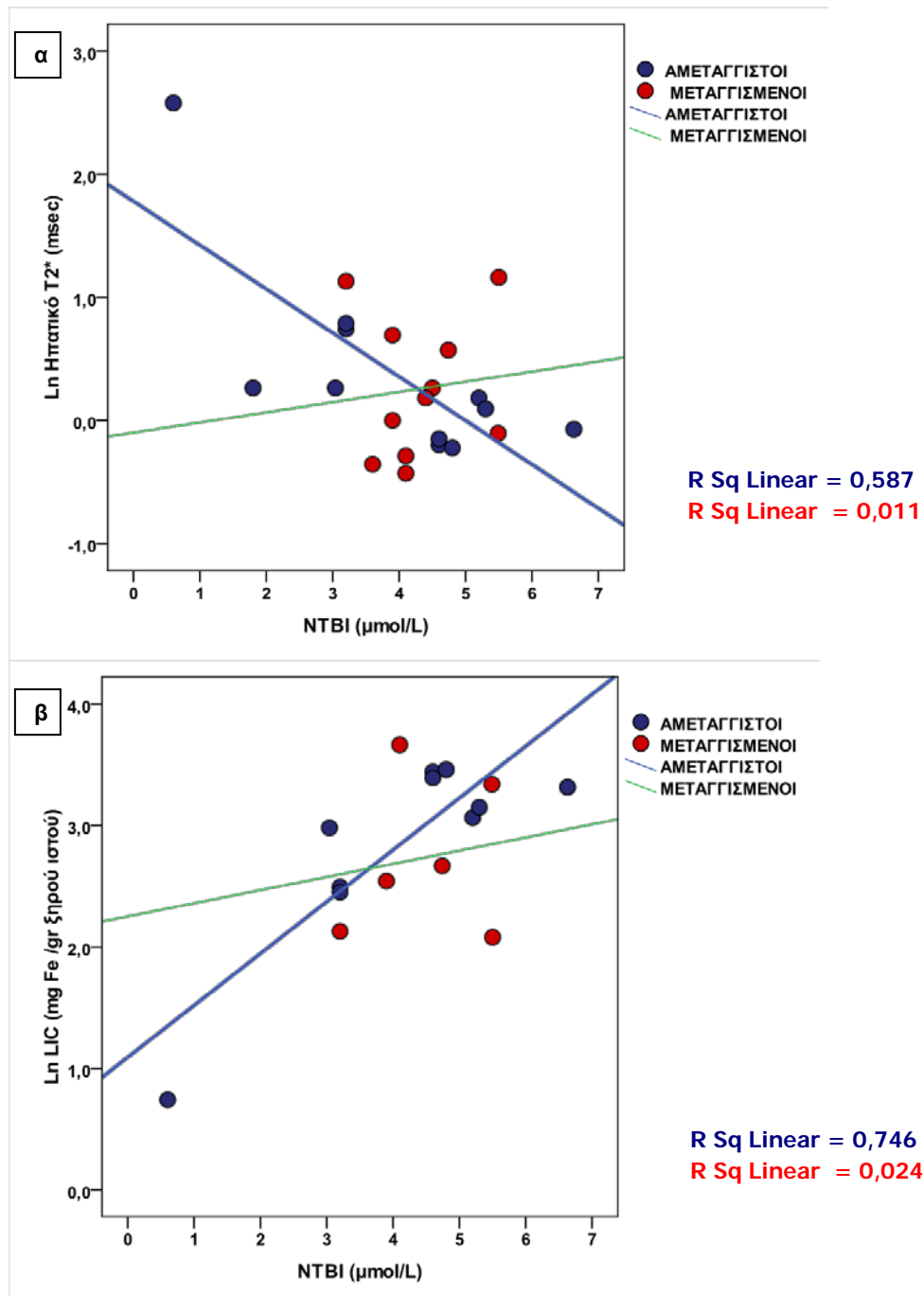
2) ισχυρή συσχέτιση του λογαρίθμου (ln) της φερριτίνης τόσο με το λογάριθμο της τιμής του ηπατικού T2\* (Pearson= -0,59,  $p=0,033$ , [Διάγραμμα 7α](#)) όσο και με τη συγκέντρωση σιδήρου στο ήπαρ (ln LIC) (Pearson=0,62,  $p=0,032$ , [Διάγραμμα 7β](#)).

**Διάγραμμα 7:** Γραμμική συσχέτιση φερριτίνης και α) ηπατικού T2\* και β) LIC



Διερευνήθηκε επίσης η πιθανή συσχέτιση του NTBI με τις παραμέτρους ηπατικό T2\* και LIC που προσδιορίζονται με την μαγνητική τομογραφία ήπατος. Βρέθηκαν ισχυρή συσχέτιση του NTBI τόσο με το λογάριθμο της τιμής του ηπατικού T2\* (Pearson= -0,77,  $p=0,006$ , [Διάγραμμα 8α](#)) όσο και με τη συγκέντρωση σιδήρου στο ήπαρ (ln LIC) (Pearson=0,86,  $p=0,001$ , [Διάγραμμα 8β](#)) σε μη μεταγγισμένους ασθενείς.

**Διάγραμμα 8:** Γραμμική συσχέτιση NTBI και α) Ηπατικού T2\* και β) LIC

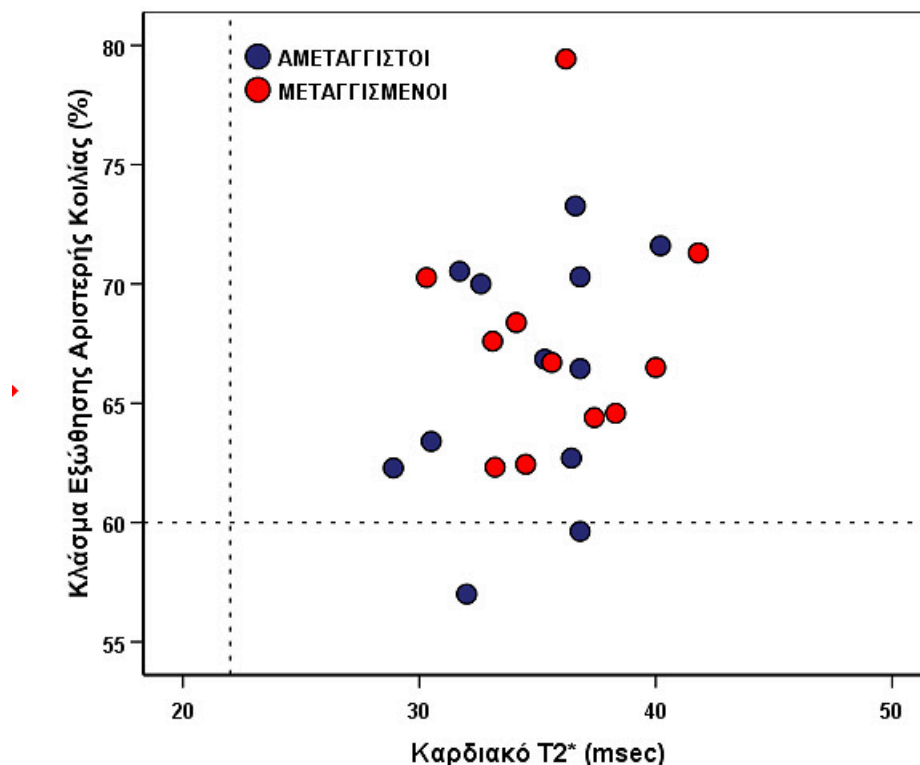


## Καρδιακός σίδηρος

Το καρδιακό T2\* θεωρείται διεθνώς ενδεικτικό υπερφόρτωσης με Fe όταν η τιμή του είναι <22 msec. Μάλιστα ο βαθμός αιμοσιδήρωσης βαθμολογείται με τις τιμές του καρδιακού T2\* σε: α) ήπια (14-21 msec), β) μέτρια (8-14 msec) και γ) βαριά (<8 msec). Στους ασθενείς της μελέτης βρέθηκαν τιμές καρδιακού T2\* από 28,9 msec ως 41,8 msec (διάμεση 35,6 msec). Μεταξύ των δυο ομάδων δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά και οι τιμές κυμάνθηκαν σε φυσιολογικά επίπεδα (αμετάγγιστοι 28,9-40,2 msec με διάμεσο 35,9 msec έναντι των μεταγγισμένων 30,3-41,8 msec με διάμεσο 35,6%).

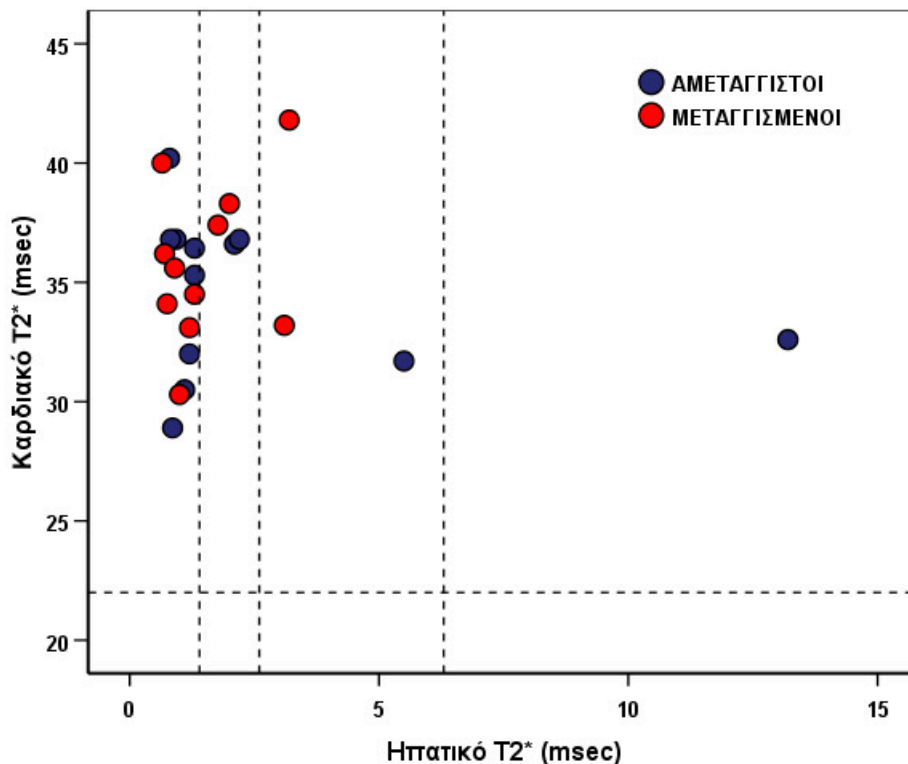
Από πλευράς καρδιακής λειτουργίας δεν ανευρίσκεται συσχέτιση μεταξύ του κλάσματος εξώθησης της αριστερής κοιλίας και του καρδιακού T2\* σε καμία από τις δυο ομάδες (αμετάγγιστοι  $r=0,23$ ,  $p>0,05$  και μεταγγισμένοι  $r=0,82$ ,  $p>0,05$ , [Διάγραμμα 9](#)). Όπως φαίνεται στους 2 ασθενείς με EF<60% η τιμή του καρδιακού T2\* ήταν φυσιολογική.

**Διάγραμμα 9:** Συσχέτιση καρδιακού T2\* με το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας (LVEF)



Όμοια δεν ανευρίσκεται σε καμία ομάδα ασθενών στατιστικά σημαντική συσχέτιση του καρδιακού T2\* με το ηπατικό T2\* (αμετάγγιστοι rho= -0,25, p>0,05 και μεταγγισμένοι rho= -0,10, p>0,05, [Διάγραμμα 10](#)) και με τη συγκέντρωση Fe στο ήπαρ (αμετάγγιστοι r= 0,28, p>0,05 και μεταγγισμένοι r= 0,10, p>0,05). Όπως φαίνεται χαρακτηριστικά στο [Διάγραμμα 10](#) η πλειονότητα των ασθενών έχουν βαριά προς μέτρια υπερφόρτωση του ήπατος με σίδηρο αλλά φυσιολογικό φορτίο σιδήρου στο μυοκάρδιο. Επίσης δεν ανευρίσκεται καμία συσχέτιση της τιμής της φερριτίνης με το καρδιακό T2\* (αμετάγγιστοι r= -0,35, p>0,05 και μεταγγισμένο r= -0,20, p>0,05).

**Διάγραμμα 10:** Συσχέτιση καρδιακού T2\* και ηπατικού T2\*





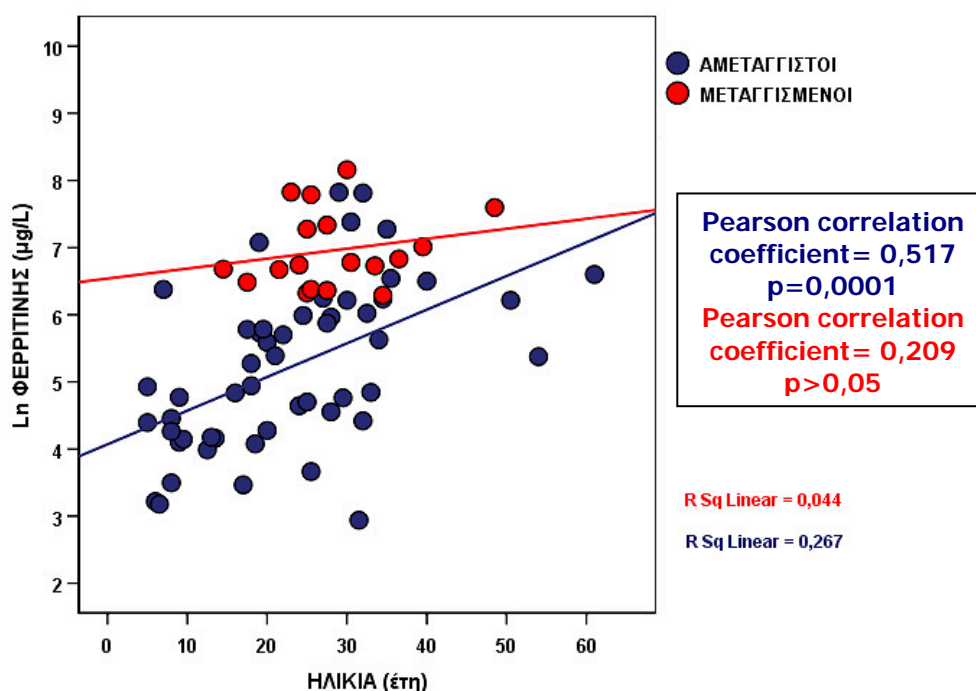
## Τροποποιητικοί παράγοντες

Εκτός του προφανούς παράγοντα των μεταγγίσεων μελετήθηκαν και άλλοι παράγοντες οι οποίοι μπορεί να επηρεάσουν θετικά ή αρνητικά το ισοζύγιο σιδήρου στους ασθενείς με ΕΜΑ. Για τη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε κυρίως η ομάδα των αμετάγγιστων ασθενών.

### Α. Ηλικία

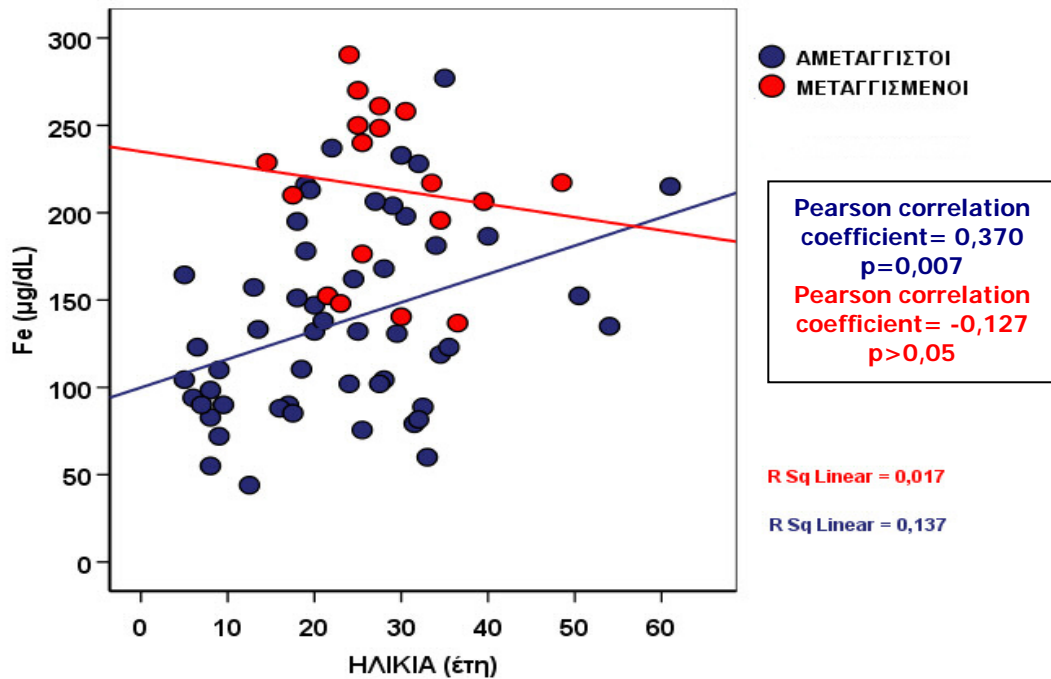
Η τιμή της φερριτίνης (χρησιμοποιήθηκε ο φυσικός λογάριθμός της Ln) των αμετάγγιστων ασθενών με ΕΜΑ παρουσιάζει ισχυρή συσχέτιση με την ηλικία (Pearson correlation coefficient  $r=0,517$ ,  $p=0,0001$ , [Διάγραμμα 11](#) ).

**Διάγραμμα 11:** Γραμμική συσχέτιση της τιμής φερριτίνης και της ηλικίας των ασθενών

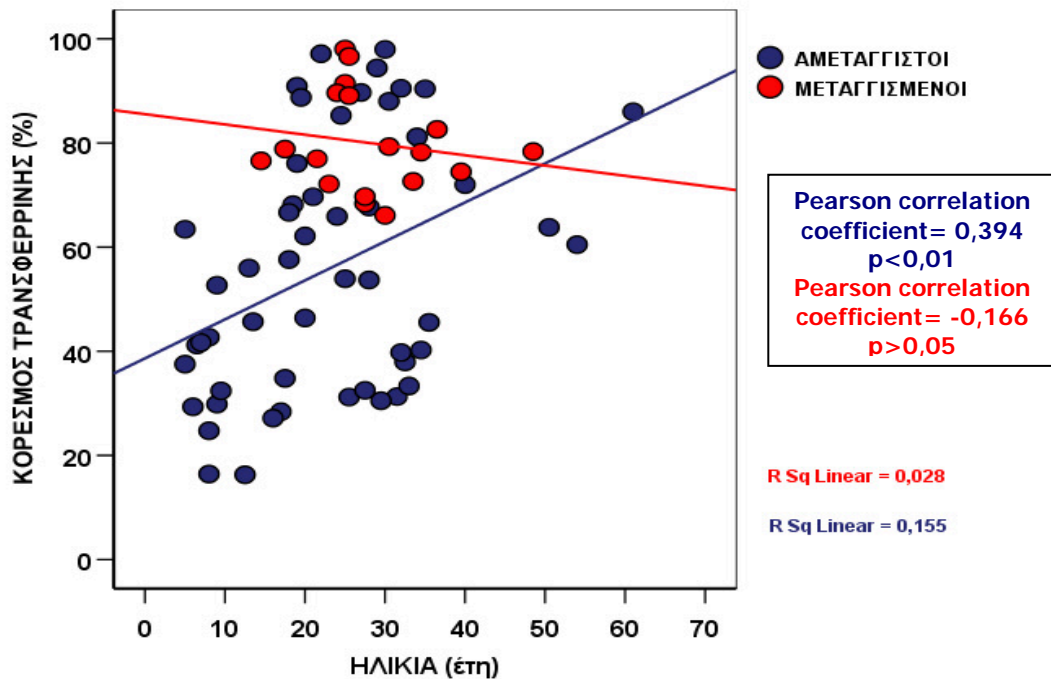


Ανάλογη γραμμική συσχέτιση ανευρίσκεται στους αμετάγγιστους ασθενείς ανάμεσα στην ηλικία και τις τιμές του σιδήρου στον ορό ( $r=0,370$ ,  $p=0,007$ , [Διάγραμμα 12](#)) και του κορεσμού τρανσφερρίνης ( $r=0,394$ ,  $p=0,004$ , [Διάγραμμα 13](#)). Σημειώνεται ότι δεν ανευρίσκεται συσχέτιση της ηλικίας με την ολική σιδηροδεσμευτική ικανότητα και το NTBI των ασθενών.

**Διάγραμμα 12:** Γραμμική συσχέτιση της τιμής σιδήρου και της ηλικίας των ασθενών



**Διάγραμμα 13:** Γραμμική συσχέτιση του κορεσμού τρανσφερίνης και της ηλικίας των ασθενών



Επίσης δεν ανευρίσκεται καμιά μορφή συσχέτιση μεταξύ της ηλικίας των ασθενών και των τιμών ερυθροποιητίνης και sTfR.

## **B. Γονότυπος – Αιματολογικός φαινότυπος**

Ο γονότυπος αποτελεί σημαντικό παράγοντα της βαρύτητας ενός ασθενούς με EMA. Γι' αυτό εκτιμήθηκε ο γονότυπος και ο αιματολογικός φαινότυπος σε σχέση με το βαθμό της αιμοσιδήρωσης. Η εκτίμηση της επίδρασης του γονότυπου στην αιμοσιδήρωση των ασθενών με EMA διερευνήθηκε με τη μελέτη των παραμέτρων μεταβολισμού Fe και τα συνοπτικά αποτελέσματα αποτυπώνονται στον [Πίνακα 19](#). Λόγω του μικρού πληθυσμού ανά ομάδα ελήφθη η διάμεση τιμή και το εύρος κατανομής τιμών.

Η συνολική στατιστική ανάλυση κατά Kruskal Wallis δείχνει ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στους διαφορετικούς αιματολογικούς φαινότυπους ως προς το σίδηρο ( $p=0,016$ ), την TIBC ( $p=0,031$ ), τον κορεσμό τρανσφερρίνης ( $p=0,007$ ) και το NTBI ( $p=0,024$ ). Η επιμέρους ανάλυση ανά ζεύγη κατά Mann-Whitney δείχνει ότι οι διαφορές αυτές αφορούν κατά κύριο λόγο τους αμετάγγιστοι ασθενείς με μια  $\beta^{sil}$  ή μια  $\delta\beta$  μετάλλαξη. Συγκεκριμένα οι ασθενείς με μια  $\beta^{sil}$  μετάλλαξη έχουν υψηλότερες τιμές TIBC από τους  $\beta^{++}/\beta^{++}$  ασθενείς ( $p=0,016$ ), χαμηλότερες τιμές φερριτίνης ( $p=0,004$ ), σιδήρου ( $p=0,013$ ), κορεσμού τρανσφερρίνης ( $p=0,009$ ) και NTBI ( $p=0,003$ ) από τους  $\beta^{++}/\beta^{+}$  ασθενείς, υψηλότερες τιμές TIBC ( $p=0,012$ ) και χαμηλότερες τιμές NTBI ( $p=0,021$ ) από τους  $\beta^{++}/\beta^0$  ασθενείς και τέλος χαμηλότερες τιμές σιδήρου ( $p=0,011$ ) και κορεσμού τρανσφερρίνης ( $p=0,003$ ) και χαμηλότερες τιμές NTBI ( $p=0,007$ ) από τους ασθενείς με φαινότυπο  $\beta^{thal}/\delta\beta$ . Σημειώνεται ότι δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά ως προς την ηλικία των ασθενών ( $p>0,05$ ).

**Πίνακας 19:** Παράμετροι υπερφόρτωσης σιδήρου σε σχέση με τον αιματολογικό φαινότυπο σε αμετάγγιστους ασθενείς με EMA

<b>Αιματολογικός Φαινότυπος</b>	<b>n</b>	<b>Φερριτίνη διάμεσος, εύρος (σε µg/L)</b>	<b>Fe διάμεσος, εύρος (σε µg/dl)</b>	<b>TIBC διάμεσος, εύρος (σε µg/dl)</b>	<b>TfSat διάμεσος, εύρος (%)</b>	<b>NTBI διάμεσος, εύρος (σε µmol/L)</b>	<b>sTfR διάμεσος, εύρος (σε mg/L)</b>	<b>EPO διάμεσος, εύρος (σε IU/L)</b>
<b><math>\beta^{sil} / \beta^0</math> ή <math>\beta</math></b>	17	72,0 25,0-730,0	98,4 44,0-215,0	277,8 205,2-428,4	39,8 16,3-86,0	0,1 0,0-4,0	14,5 5,1-26,3	75,4 10,1-328,1
<b><math>\beta^{++} / \beta^{++}</math></b>	9	195,0 19,0-1605,0	110,0 60,0-198,0	225,0 180,0-338,4	53,7 31,3-88,0	0,9 0,0-4,6	21,0 8,4-30,9	158,0 47,8-325,0
<b><math>\beta^{++} / \beta^+</math></b>	7	267,0 81,0-1443,0	164,4 104,4-277,0	237,6 212,4-306,4	66,7 37,5-98,0	4,1 0,19-5,3	11,9 1,7-32,5	218,7 66,7-477,6
<b><math>\beta^{++} / \beta^0</math></b>	3	219,0 104,0-500,0	138,0 102,0-152,4	198,0 154,8-238,9	65,9 63,8-69,7	3,6 1,3-4,6	22,1 12,3-24,8	250,0 78,3-348,1
<b><math>\beta^0 / \beta^0</math></b>	1	399,0	162,0	190,0	85,3	3,9	12,8	85,0
<b><math>\beta^{thal} / \delta\beta</math></b>	10	340,5 24-2496,0	180,6 102,0-237,0	248,0 162,0-313,2	78,5 32,5-97,1	2,6 0,0-6,6	13,2 6,4-34,7	178,4 58,9-287,6
<b><math>\beta^0 / A</math> &amp; <b>ααα/αα ή ααα/ααα</b></b>	3	324,0 39,0-588,0	85,2 75,6-90,0	242,3 216,0-244,8	34,8 31,2-41,7	0,7	16,8 9,4-23,1	100,7 39,3-194,6

## Γ. Σπληνεκτομή

Μέχρι να ολοκληρωθεί η μελέτη υποβλήθηκαν σε σπληνεκτομή 30 ασθενείς, ποσοστό 42,3%. Η μέση ηλικία σπληνεκτομής ήταν  $16,2 \pm 8,2$  έτη (εύρος 6-46 έτη) (Πίνακας 12). Διαπιστώνεται ότι οι μεταγγισμένοι ασθενείς υποβλήθηκαν σε σπληνεκτομή συχνότερα (επίπεδο στατιστικά λίαν σημαντικό  $p < 0,001$ ) από τους αμετάγγιστους ασθενείς.

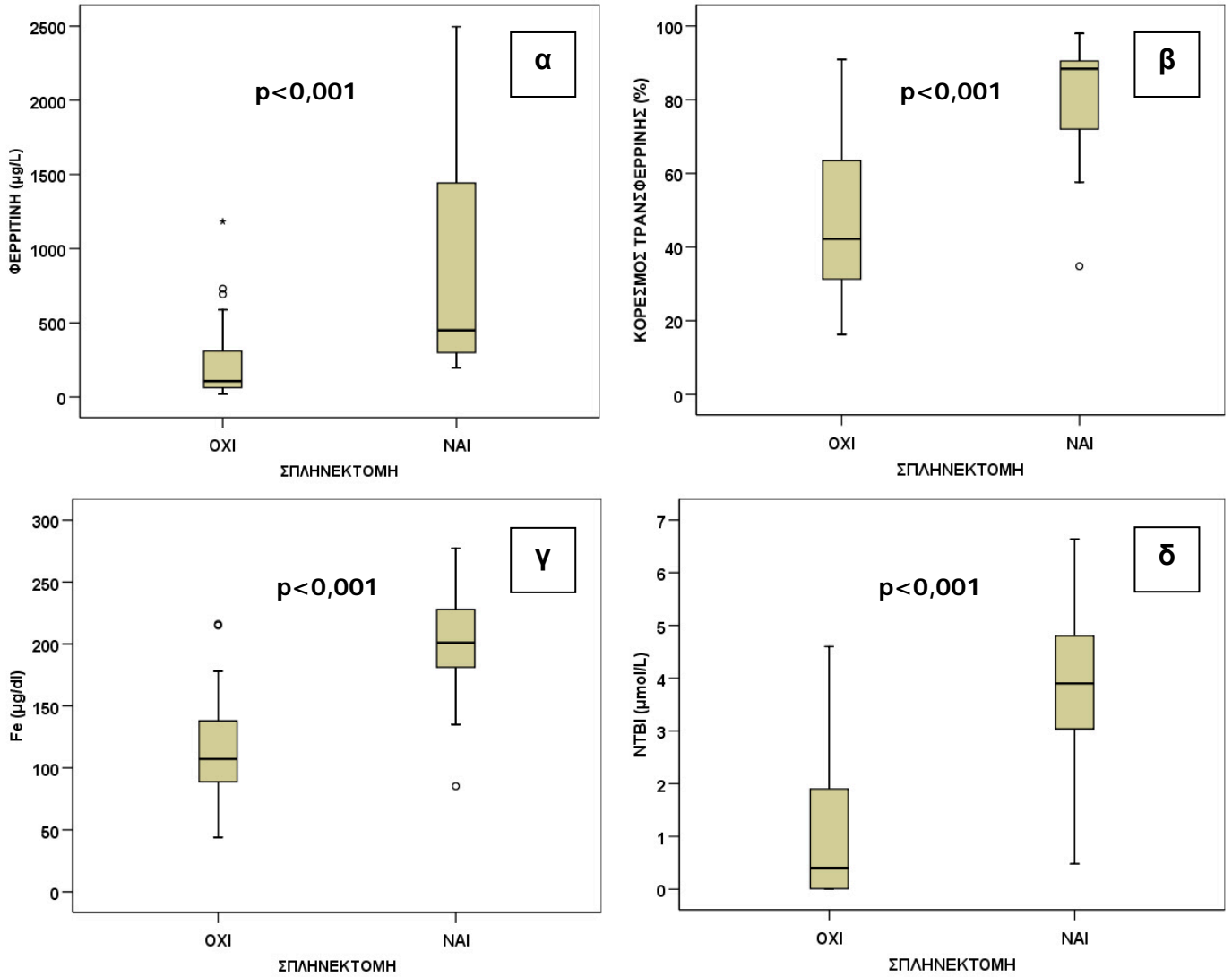
Η σπληνεκτομή φαίνεται ότι οδηγεί σε αυξημένο φορτίο Fe στους αμετάγγιστους ασθενείς με EMA (Πίνακας 20). Από τη στατιστική ανάλυση των παρακάτω παραμέτρων προκύπτει ιδιαίτερα ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των τιμών της φερριτίνης ( $p = 0,000014$ ), του σιδήρου ( $p = 0,00000016$ ), του κορεσμού της τρανσφερρίνης ( $p = 0,0000004$ ) και του NTBI ( $p = 0,00024$ ) με τη διενέργεια σπληνεκτομής (Διάγραμμα 14). Σημειώνεται ότι κατά την ανάλυση της τιμής της φερριτίνης χρησιμοποιείται ο φυσικός λογάριθμος (ln) αυτής. Η σπληνεκτομή στους αμετάγγιστους ασθενείς σχετίζεται επίσης με βαρύτερη ηπατική αιμοσιδήρωση (χαμηλότερες τιμές T2\*,  $p = 0,03$ ) ενώ δεν επηρεάζεται η τιμή του μυοκαρδιακού T2\* ( $p > 0,5$ ). Οι τιμές συγκέντρωσης σιδήρου στο ήπαρ (LIC) ήταν μεν σαφώς υψηλότερες στους σπληνεκτομημένους ασθενείς χωρίς όμως η διαφορά να φθάνει σε στατιστικά σημαντικά επίπεδα. Η σπληνεκτομή δεν φαίνεται να επηρεάζει καθόλου τις τιμές του sTfR και της ερυθροποιητίνης.

Στην ομάδα των μεταγγισμένων ασθενών δεν αναδεικνύεται στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ κάποιας από τις παραμέτρους υπερφόρτωσης Fe και της διενέργειας σπληνεκτομής.

**Πίνακας 20:** Παράμετροι υπερφόρτωσης σιδήρου σε σχέση με τη διενέργεια σπληνεκτομής σε αμετάγγιστους ασθενείς με EMA

Ασθενείς	Μη Σπληνεκτομημένοι		Σπληνεκτομημένοι	
	Αμετάγγιστοι	Μεταγγισμένοι	Αμετάγγιστοι	Μεταγγισμένοι
n	38	3	14	15
Φερριτίνη (µg/L)	214,7 ± 252,9 εύρος= 19,0-1183,0 διάμεσος= 107	1654,7 ± 796,5 εύρος= 926-2505 διάμεσος=1533,0	839,3 ± 819,6 εύρος= 195-2496 διάμεσος= 449,5	1167,7 ± 845,3 εύρος= 540,0-3495,0 διάμεσος= 836,0
Σίδηρος (µg/dl)	115,9 ± 40,2 εύρος= 44,0-216,0 διάμεσος= 107,2	181,9 ± 68,7 εύρος= 136,8-261,0 διάμεσος=148	195,8 ± 46,9 εύρος= 85,2 -277,0 διάμεσος= 201,0	220,1 ± 42,1 εύρος= 140,4-290,4 διάμεσος= 217,2
TIBC (µg/dl)	258,5 ± 55,0 εύρος= 154,8-428,4 διάμεσος= 249,1	250,8 ± 115,0 εύρος= 165,6-381,6 διάμεσος=205,2	245,0 ± 37,5 εύρος= 190,0-338,4 διάμεσος= 238,8	272,1 ± 46,7 εύρος= 198,0-356,4 διάμεσος=277,2
Κορεσμός Τρανσφερρίνης (%)	46,8 ± 18,6 εύρος= 16,3-90,9 διάμεσος= 42,2	74,4 ± 7,4 εύρος= 68,4-82,6 διάμεσος= 72,1	80,6 ± 18,2 εύρος= 34,8-98,0 διάμεσος= 88,4	81,1 ± 9,7 εύρος= 66,1-98,0 διάμεσος= 78,4
NTBI (µmol/L)	1,2 ± 1,6 εύρος= 0,0-4,6 διάμεσος= 0,4	3,8 ± 0,7 εύρος= 3,2-4,5 διάμεσος=3,6	3,7 ± 1,8 εύρος= 0,5-6,6 διάμεσος= 3,9	4,8 ± 0,7 εύρος= 3,9-5,9 διάμεσος=4,6
sTfR (mg/L)	16,7 ± 8,6 εύρος= 1,7-34,7 διάμεσος= 16,5	14,0 ± 4,0 εύρος= 10,5-18,4 διάμεσος=13,2	17,4 ± 5,9 εύρος= 9,6-28,0 διάμεσος= 15,7	21,0 ± 8,0 εύρος= 8,2-36,1 διάμεσος= 21,2
EPO (IU/L)	153,7 ± 113,1 εύρος= 10,1-477,6 διάμεσος= 136,9	187,6 ± 94,5 εύρος= 96,3-285,0 διάμεσος=181,4	164,1 ± 82,6 εύρος= 50,5-325,0 διάμεσος= 166,1	247,0 ± 145,2 εύρος= 40,8-527,0 διάμεσος=254,5
Ηπατικό T2* (msec)	8,8 ± 8,8 εύρος= 0,8-19,0 διάμεσος= 7,7	1,7 ± 1,2 εύρος= 0,7-3,1 διάμεσος= 1,3	1,7 ± 1,5 εύρος= 0,8-5,5 διάμεσος= 1,2	1,4 ± 0,9 εύρος= 0,7-3,2 διάμεσος= 1,1
LIC (mg Fe/g ξηρού ιστού)	11,7 ± 13,9 εύρος= 1,5-31,2 διάμεσος= 7,1	8,4 ± 0,0 εύρος= 8,4-8,4 διάμεσος= 8,4	21,2 ± 9,2 εύρος= 4,6-31,8 διάμεσος= 22,3	20,5 ± 12,8 εύρος= 8,0-39,0 διάμεσος= 14,4
Μυοκαρδιακό T2* (msec)	35,4 ± 1,9 εύρος= 32,6-36,8 διάμεσος= 36,1	34,6 ± 1,5 εύρος= 33,2-36,2 διάμεσος= 34,5	34,3 ± 3,7 εύρος= 28,9-40,2 διάμεσος= 35,3	36,3 ± 3,8 εύρος= 30,3-41,8 διάμεσος= 36,5

**Διάγραμμα 14:** box plot α) φερριτίνης, β) κορεσμού τρανσφερρίνης γ) σιδήρου και δ) NTBI σε σχέση με τη διενέργεια σπληνεκτομής σε αμετάγγιστους ασθενείς με ΕΜΑ.



## Δ. Ερυθροποίηση

Στα πλαίσια της μελέτης του βαθμού αναιμίας και υποξίας διερευνήθηκε η ερυθροποιητική δραστηριότητα των ασθενών με τον προσδιορισμό των τιμών της ερυθροποιητίνης (EPO) και του διαλυτού υποδοχέα της τρανσφερρίνης (sTfR), που συνοψίζονται στον Πίνακα 21.

Πίνακας 21: Επίπεδα sTfR και EPO των ασθενών σε σχέση με τις μεταγγίσεις.

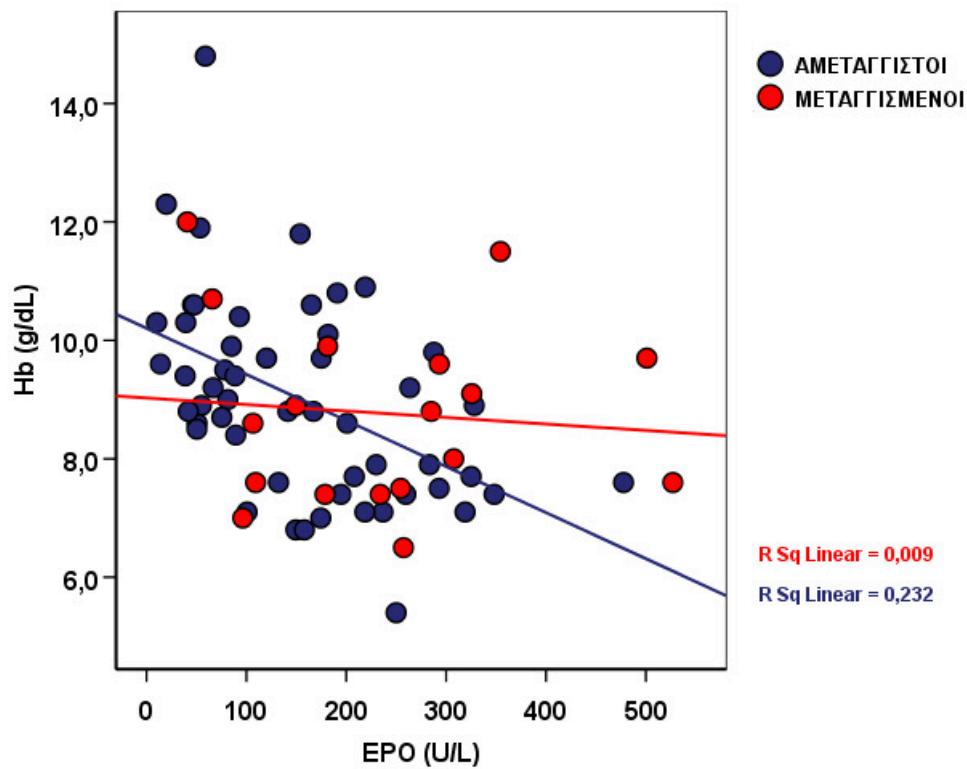
Μεταγγίσεις	Αριθμός Ασθενών	sTfR (mg/L)	EPO (IU/L)
Αμετάγγιστοι	52	16,9 ± 7,9 (1,7-34,7)	156,5 ± 105,1 (10,1-477,6)
Μεταγγισμένοι	18	19,8 ± 7,9 (8,2-36,1)	237,1 ± 137,6 (40,8-527,0)
Σύνολο	70	17,6 ± 8,0 (1,7-36,1)	177,2 ± 118,7 (10,1-527,0)
Στατιστική ανάλυση		p>0,05	p=0,012

Όπως αναμενόταν διαπιστώθηκαν σημαντικά αυξημένες τιμές sTfR και EPO στους ασθενείς σε σχέση με τα φυσιολογικά άτομα, με σχετικά υψηλότερες τιμές sTfR και EPO στους μεταγγισμένους σε σχέση με τους αμετάγγιστους ασθενείς.

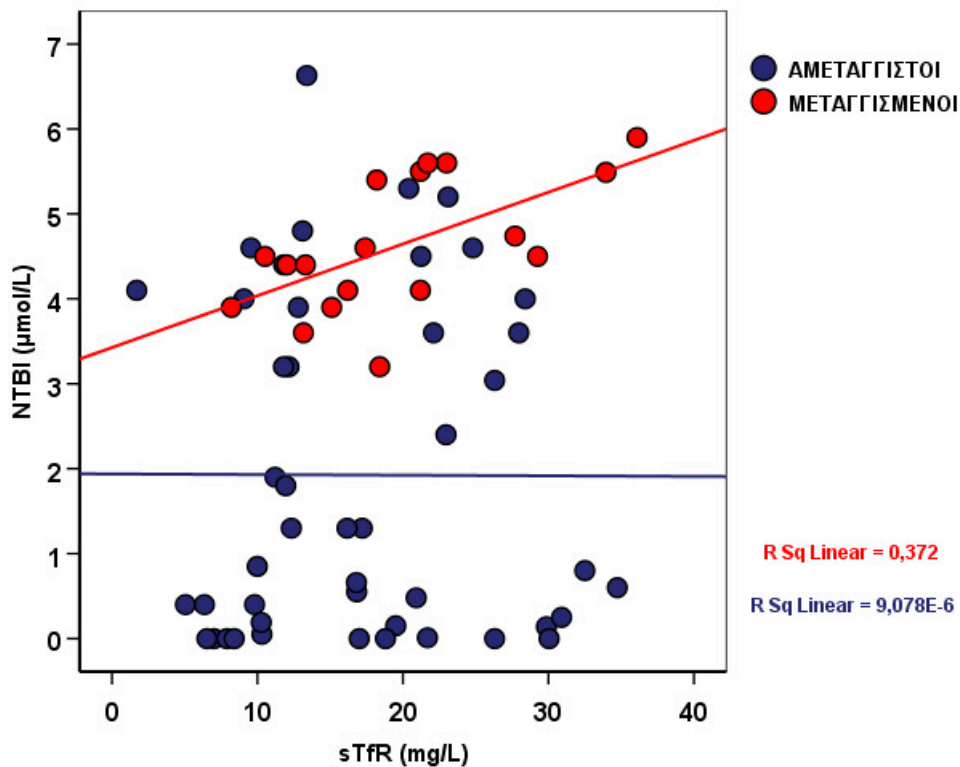
Η EPO παρουσίαζε επίσης ισχυρή αρνητική συσχέτιση με την αιμοσφαιρίνη (Spearman's rho= -0,49 , p=0,0002) στους αμετάγγιστους ασθενείς (Διάγραμμα 15) ενώ στην ομάδα των μεταγγισμένων ασθενών βρέθηκε σημαντική γραμμική συσχέτιση των τιμών του NTBI και του sTfR (r=0,61 , p=0,007 Διάγραμμα 16).



**Διάγραμμα 15:** Γραμμική συσχέτιση ερυθροποιητίνης και αιμοσφαιρίνης σε αμετάγγιστους ασθενείς με ΕΜΑ.



**Διάγραμμα 16** Γραμμική συσχέτιση sTfR και NTBI σε μεταγγισμένους ασθενείς με ΕΜΑ.

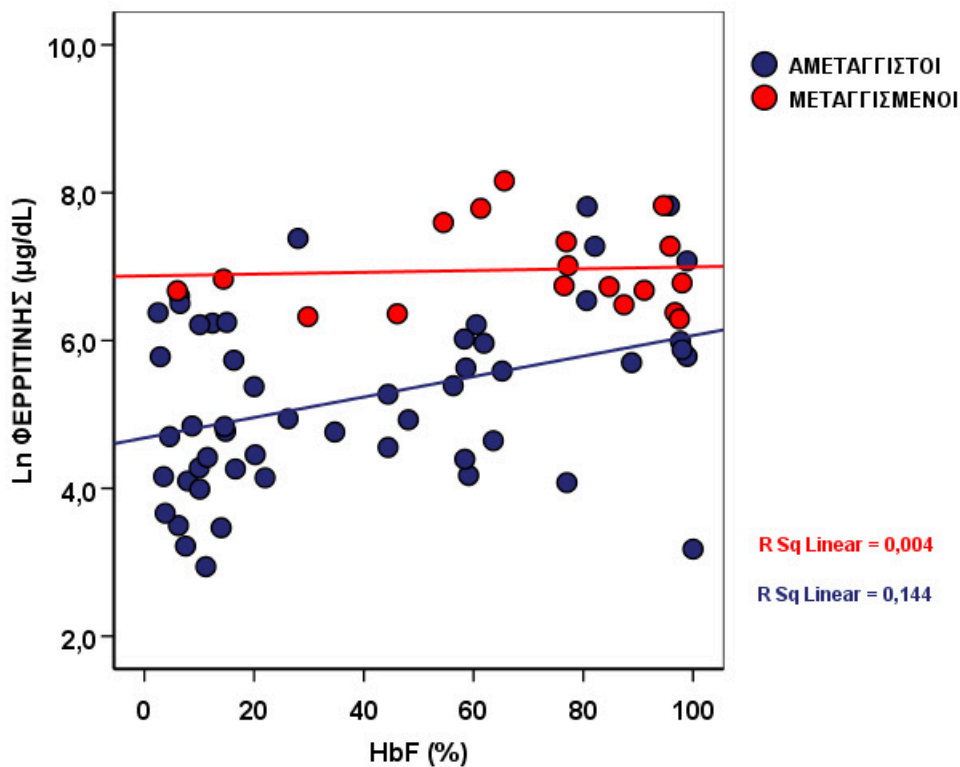


## E. HbF

Εκτός της αναιμίας, τα υψηλά επίπεδα HbF αποτελούν ένα πρόσθετο ερέθισμα για αύξηση της ερυθροποίησης λόγω της υψηλής χημικής συγγένειάς της με το οξυγόνο.

Στους αμετάγγιστους ασθενείς το ποσοστό της HbF συσχετίζεται οριακά με το φυσικό λογάριθμο της φερριτίνης (Ln) όπως φαίνεται στο [Διάγραμμα 17](#) (Spearman's rho=0,313, p=0,024). Στην ίδια ομάδα η συσχέτιση είναι ισχυρότερη με την τιμή του Fe στον ορό (Spearman's rho=0,471, p=0,00043) και τον κορεσμό της τρανσφερρίνης (Spearman's rho=0,498, p=0,00017) ενώ με την τιμή του NTBI η σχέση είναι επίσης οριακή (Spearman's rho=0,363, p=0,013).

**Διάγραμμα 17:** Γραμμική συσχέτιση φερριτίνης και HbF.



## ΣΤ. Συγγενής αιμοχρωμάτωση

Με σκοπό τη διερεύνηση πιθανής συνύπαρξης συγγενούς αιμοχρωμάτωσης ελέγχθηκαν 12 μεταλλάξεις για το HFE γονίδιο (V53M, V59M, H63D, H63H, S65C, Q127H, P160delC, E168Q, E168X, W169X, C282Y, Q283P), 4 μεταλλάξεις για το TFR2 γονίδιο (E60X, M172K, Y250X, AVAQ594-597del) και 2 για το γονίδιο της FPN1 (N144H, V162del). Ο έλεγχος έγινε σε 31 αμετάγγιστους και σε 11 μεταγγισμένους ασθενείς με EMA.

Από τον έλεγχο προέκυψε ότι 12 ασθενείς (11 αμετάγγιστοι και 1 μεταγγισμένος) είχαν μεταλλάξεις για το γονίδιο HFE ενώ δεν βρέθηκε κανένας με μετάλλαξη των γονιδίων TFR2 και FPN1. Από τους 12 αυτούς ασθενείς οι 9 ήταν ετεροζυγώτες (8 αμετάγγιστοι και 1 μεταγγισμένος) και ο ένας ομοζυγώτης για τη μετάλλαξη H63D ενώ ακόμα ένας ασθενής ήταν ετεροζυγώτης της μετάλλαξης S65C.

**Πίνακας 22:** Τιμές παραμέτρων αιμοσιδήρωσης σε σχέση με την ύπαρξη HFE μεταλλάξεων σε ασθενείς ηλικίας  $\leq 30$  ετών

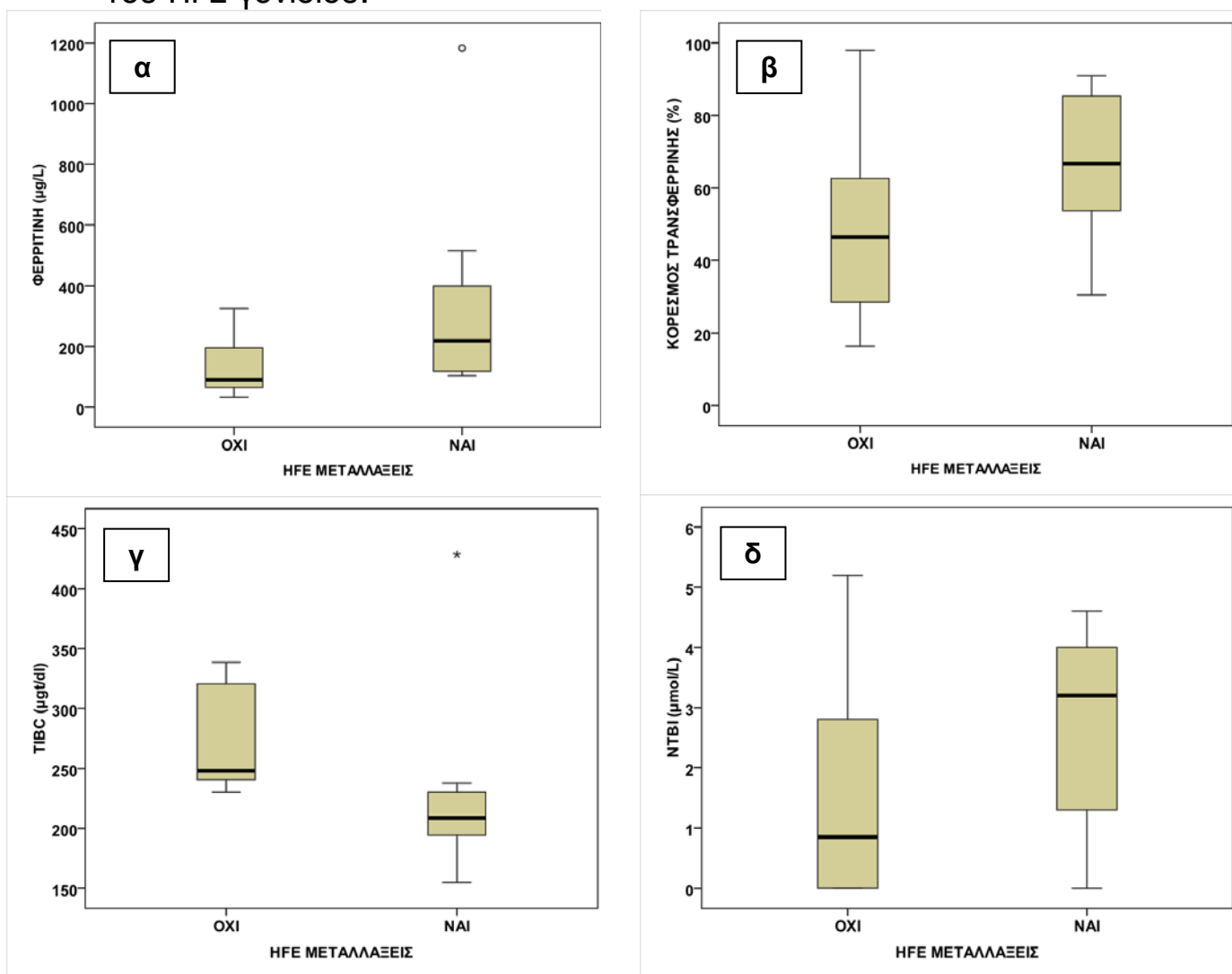
	Ασθενείς χωρίς HFE μετάλλαξη	Ασθενείς με HFE μετάλλαξη	p
n	15	9	
Ηλικία (έτη)	17,5 8-30	24,0 9-29,5	>0,05
Φερριτίνη (μg/L)	95 33,0-500,0	219,0 104,0-1183,0	0,025
Σίδηρος (μg/dl)	132,0 44,0-232,8	138,0 102,0-216,0	>0,05
TIBC (μg/dl)	248,2 230,4-338,4	208,8 154,8-428,4	0,002
Κορεσμός τρανσφερρίνης (%)	46,4 16,3-98,0	66,7 30,5-90,9	>0,05
NTBI (μmol/L)	0,9 0,0-5,2	3,2 0,0-4,6	>0,05
sTfR (mg/L)	16,8 7,0-30,0	24,8 11,8-30,9	>0,05
EPO (IU/L)	89,3 10,1-263,7	153,8 75,4-348,1	>0,05

\*<sup>1</sup> : οι τιμές των παραμέτρων εκφράζονται ως διάμεσος και εύρος τιμών

\*<sup>2</sup> : για τη στατιστική ανάλυση της φερριτίνης χρησιμοποιήθηκε ο φυσικός λογάριθμος της (Ln)

Στην προσπάθεια να εξαιρεθεί η επίδραση του παράγοντα ηλικία κατά τη διερεύνηση της επίδρασης των γονιδίων συγγενούς αιμοχρωμάτωσης στην ανάπτυξη αιμοσιδήρωσης έγινε περαιτέρω ανάλυση μόνο των αμετάγγιστων ασθενών με ηλικία μικρότερη ή ίση των 30 ετών (Πίνακας 22). Η ανάλυση αυτή έδειξε σημαντική διαφορά στη μέση τιμή της φερριτίνης ( $p=0,025$ ) και της ολικής σιδηροδεσμευτικής ικανότητας ( $p=0,002$ ) μεταξύ των ασθενών που είχαν μια HFE μετάλλαξη σε σχέση με εκείνους που δεν είχαν (Διάγραμμα 18). Αξιόλογη αριθμητική διαφορά υπήρχε και στις μέσες τιμές του κορεσμού της τρανσφερρίνης και του NTBI ανάμεσα στις δύο ομάδες χωρίς όμως αυτή να φθάνει σε επίπεδα στατιστικά σημαντικά.

**Διάγραμμα 18:** box plot α) φερριτίνης, β) κορεσμού τρανσφερρίνης γ) TIBC και δ) NTBI σε σχέση με τις μεταλλάξεις του HFE γονιδίου.



## Θεραπεία

Σε 15 ασθενείς με τιμές φερριτίνης >450 µg/l μετά από ενημέρωση και λήψη συγκατάθεσης δοκιμάστηκε η αποτελεσματικότητα της χηλικής ουσίας Deferasirox. Η Deferasirox είναι νεώτερος χηλικός παράγοντας ο οποίος χορηγείται μια φορά την ημέρα από το στόμα. Το γεγονός αυτό οδηγεί σε σημαντικά καλύτερη συμμόρφωση των ασθενών στη συνέχιση της θεραπευτικής αγωγής. Η αποτελεσματικότητά του έχει κυρίως δοκιμαστεί σε ασθενείς με μείζονα M.A. και μέτρια ως βαριά μεταγγισιακή αιμοσιδήρωση.

Στην κλινική δοκιμή μετείχαν 8 αμετάγγιστοι και 7 μεταγγιζόμενοι ασθενείς με EMA. Η δόση του φαρμάκου ήταν ανάλογη με το βαθμό αιμοσιδήρωσης. Ασθενείς με φερριτίνη <1000 µg/L έλαβαν 10 mg/kg βάρους σώματος ενώ ασθενείς με φερριτίνη >1000 µg/L έλαβαν 20 mg/kg βάρους σώματος.

Κριτήρια επιτυχίας της θεραπείας θεωρήθηκαν τα εξής:

- Στατιστικά σημαντική μείωση της τιμής φερριτίνης μετά από διάστημα ενός έτους
- Μείωση του επιπέδου LIC <7mg Fe/g ξηρού ιστού ή κατά 3mg Fe/g ξηρού ιστού σε διάστημα ενός έτους

Στα πλαίσια ελέγχου της ασφάλειας χορήγησης του φαρμάκου προ της έναρξης και κατά τη διάρκεια της αγωγής παρακολουθήθηκαν:

- 1) τα επίπεδα κρεατινίνης προς αποκλεισμό νεφρικής βλάβης,
- 2) τα επίπεδα SGOT, SGPT, αλκαλικής φωσφατάσης και χολερυθρίνης προς αποκλεισμό ηπατικής βλάβης
- 3) γενική αίματος προς αποκλεισμό εμφάνισης κυτταροπενίας.

Στο χρονικό διάστημα της μελέτης κανένας από τους ασθενείς δεν παρουσίασε παρενέργειες ή επιπλοκή που να οδηγήσει στη διακοπή της αγωγής.

Η αποτελεσματικότητα της θεραπείας παρακολουθήθηκε με περιοδική μέτρηση της φερριτίνης και διενέργεια μαγνητικής τομογραφίας ήπατος και καρδιάς πριν την έναρξη της αγωγής και μετά από 12 και 24 μήνες χορήγησης Deferasirox ([Πίνακας 23](#)) για τον έλεγχο της περιεκτικότητας σε σίδηρο.

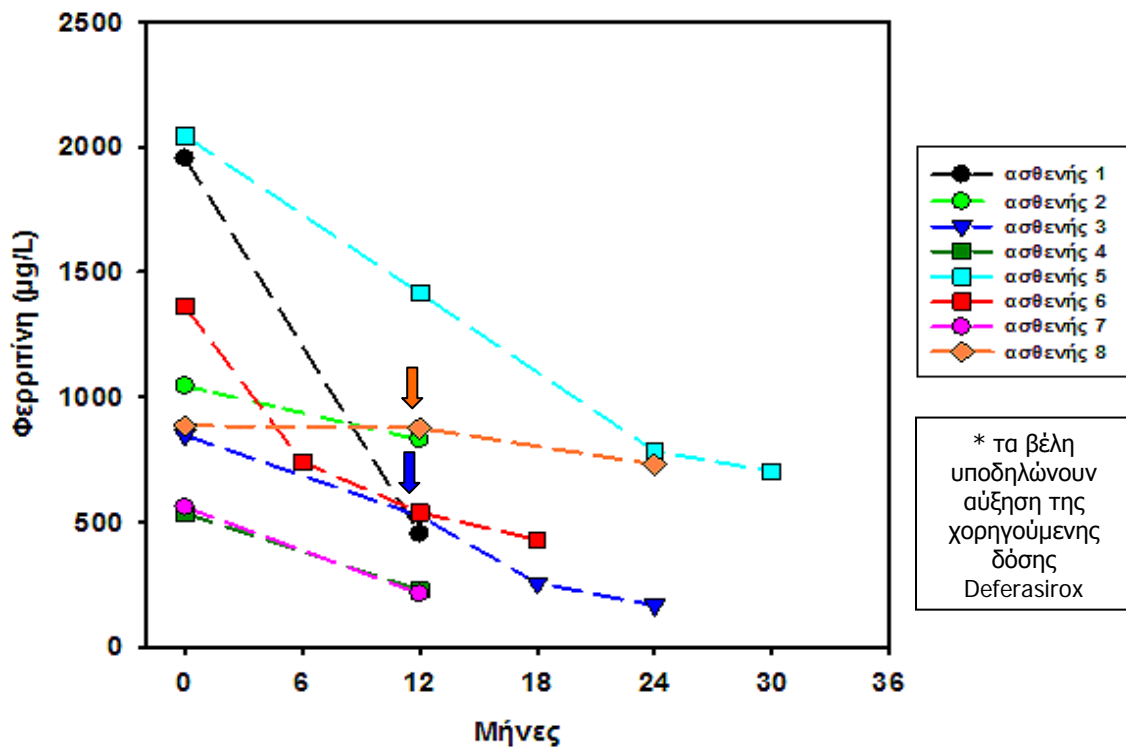
**Πίνακας 23:** Παράμετροι αιμοσιδήρωσης πριν και μετά από τη χορήγηση Deferasirox

	Αρχική	Μετά 12 μήνες	Μετά 24 μήνες
<b>Αμετάγγιστοι</b>			
Φερριτίνη (μg/L)	1154,0 ± 584,2 (536,0-2044,0)	634,5 ± 396,9 (213,0-1415,0)	560,3 ± 341,7 (167,0-784,0)
LIC (mg Fe/ g ξηρού ιστού)	19,8 ± 8,1 (12,0-31,0)	9,7 ± 5,4 (1,2-16,0)	10,1 ± 7,4 (2,4-17,1)
Ηπατικό T2* (msec)	2,9 ± 4,2 (0,8-13,2)	5,7 ± 7,8 (1,6-24,5)	5,2 ± 5,7 (1,5-11,8)
Καρδιακό T2* (msec)	34,7 ± 2,8 (28,9-36,8)	38,9 ± 2,1 (36,2-42,5)	34,6 ± 6,9 (26,6-38,8)
LVEF (%)	64,8 ± 4,4 (59,6- 73,3)	64,6 ± 7,1 (50-63-73,3)	63,8 ± 3,6 (61,08-67,9)
<b>Μεταγγισμένοι</b>			
Φερριτίνη (μg/L)	1750,3 ± 914,4 (477,0-3031)	951,3 ± 649,2 (206,0-1973,0)	608,2 ± 426,2 (144,0-1058,0)
LIC (mg Fe/ g ξηρού ιστού)	26,7 ± 13,1 (13,0-39,0)	15,5 ± 9,9 (2,6-29,0)	12,1 ± 6,4 (4,7-16,1)
Ηπατικό T2* (msec)	1,1 ± 0,6 (0,7-2,2)	3,4 ± 4,1 (0,9-10,6)	3,0 ± 2,4 (1,6-5,7)
Καρδιακό T2* (msec)	35,1 ± 3,7 (30,3-40,0)	36,4 ± 1,8 (33,7-38,8)	35,6 ± 5,4 (30,0-40,8)
LVEF (%)	67,2 ± 1,9 (64,6-70,3)	69,9 ± 5,4 (64,0-75,5)	72,6 ± 0,8 (72,0-73,2)

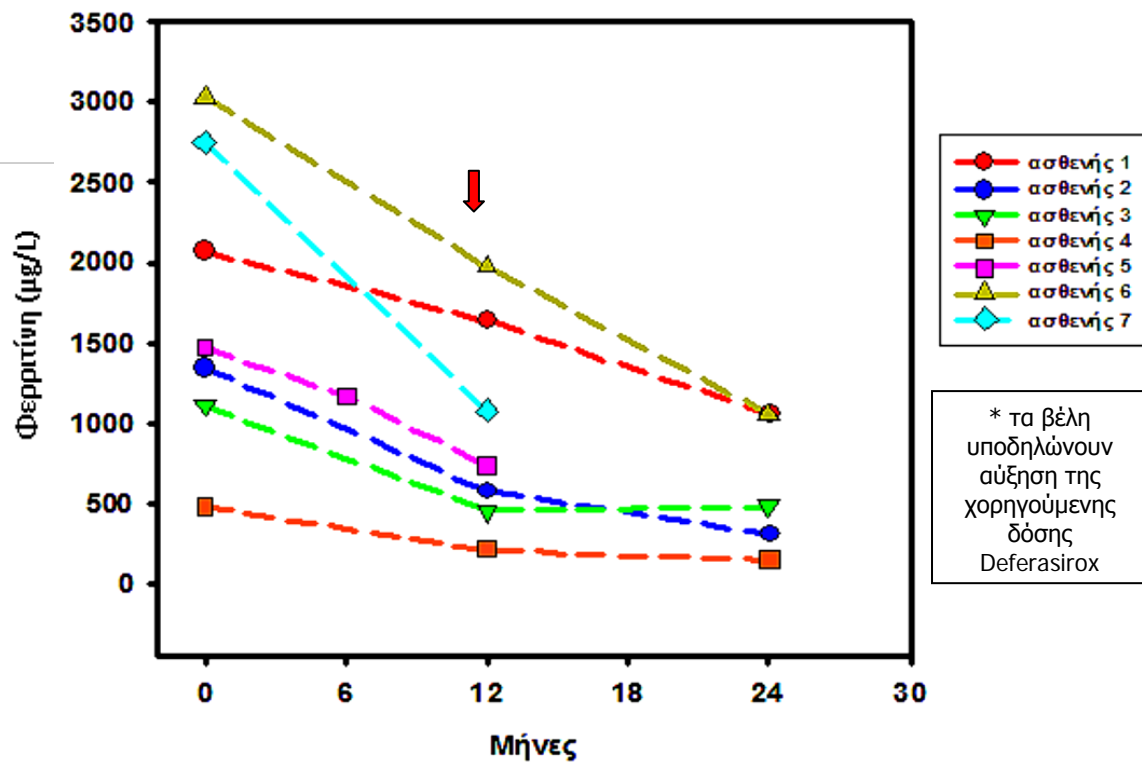
Σε όλους τους ασθενείς, αμετάγγιστους και μεταγγισμένους παρατηρήθηκε πτωτική πορεία της τιμής της φερριτίνης σε συνάρτηση με τον χρόνο (Διαγράμματα 19 και 20). Στους αμετάγγιστους ασθενείς η μεταβολή της μέσης τιμής της φερριτίνης ήταν στατιστικά σημαντική ( $p=0,016$ ) μετά από 12 μήνες θεραπείας αλλά όχι και μετά από 24 μήνες ( $p=0,115$ ). Αντίστοιχα στατιστικά σημαντική αλλά σε μεγαλύτερο βαθμό ήταν στους μεταγγισμένους ασθενείς ( $p=0,004$ ) μετά από 12 μήνες αγωγής και όχι μετά από 24 μήνες ( $p=0,107$ ).

Από την ομάδα των αμετάγγιστων ασθενών, αποφασίστηκε μετά το έτος η αύξηση της δόσης σε δυο ασθενείς με σκοπό την περαιτέρω μείωση του φορτίου σιδήρου. Έτσι 24 μήνες μετά την έναρξη της αγωγής στον ένα ασθενή βελτιώθηκε το θεραπευτικό αποτέλεσμα ενώ στον άλλο δεν απαιτείται προς το παρόν συνέχιση της αποσιδήρωσης. Αύξηση της χορηγούμενης δόσης απαιτήθηκε και σε έναν από τους μεταγγισμένους ασθενείς με σκοπό και πάλι την περαιτέρω μείωση του φορτίου σιδήρου.

**Διάγραμμα 19:** Διαχρονικές τιμές φερριτίνης αμετάγγιστων ασθενών με EMA μετά από θεραπεία με Deferasirox.



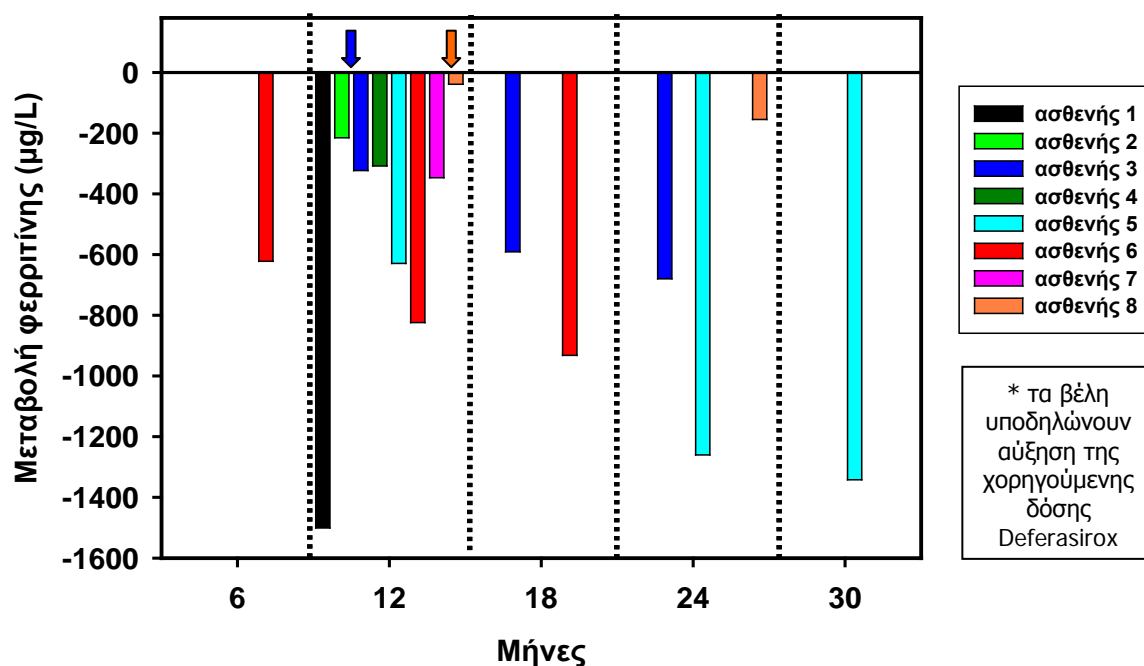
**Διάγραμμα 20:** Διαχρονικές τιμές φερριτίνης μεταγγισμένων ασθενών με EMA μετά από θεραπεία με Deferasirox.





Παρατηρώντας το συνοπτικό [διάγραμμα 21](#) φαίνεται ότι μέσα στο πρώτο 12μηνο θεραπείας όλοι οι αμετάγγιστοι ασθενείς με EMA παρουσίασαν σημαντική μείωση της τιμής της φερριτίνης κατά  $519,5 \pm 468,2 \mu\text{g/l}$  (διάμεσος= 335,0, εύρος= 9,0-1501,0). Για τους ασθενείς που υπάρχουν περισσότερες μετρήσεις από τη συνέχιση της θεραπείας για 24 μήνες φαίνεται ότι προοδευτικά έχουμε και περαιτέρω πτώση της φερριτίνης που έφθασε τα  $698,3 \pm 552,7 \mu\text{g/l}$  (διάμεσος= 680,0, εύρος= 155,0-1260,0). Αντίστοιχα καλά ήταν τα αποτελέσματα της θεραπείας και στους μεταγγισμένους ασθενείς όπου η μείωση της τιμής της φερριτίνης στους 12 μήνες από την έναρξη της αγωγής ήταν  $799,0 \pm 459,8 \mu\text{g/l}$  (διάμεσος= 733,0, εύρος= 271,0-1671,0) και στους 24 μήνες  $998,6 \pm 619,2 \mu\text{g/l}$  (διάμεσος= 1011,0, εύρος= 333,0-1975,0).

[Διάγραμμα 21](#): Διαχρονική μεταβολή της τιμής της φερριτίνης σε αμετάγγιστους ασθενείς με EMA μετά από θεραπεία με Deferasirox.

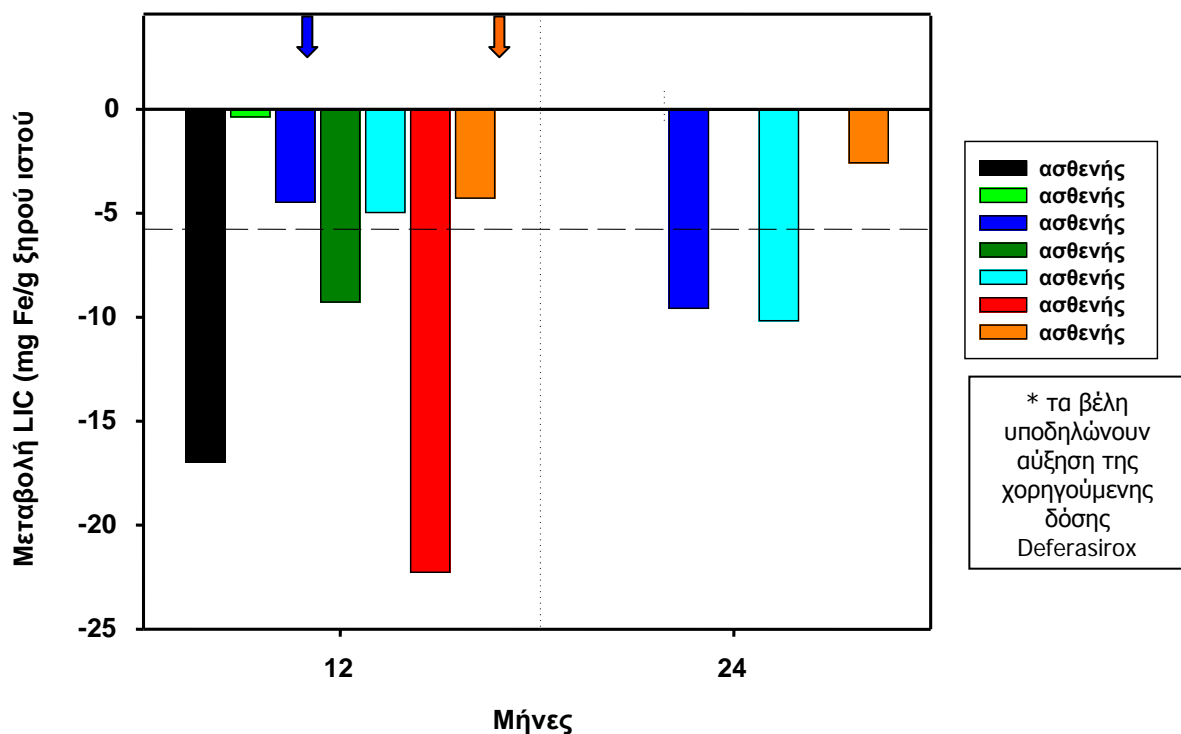


Το αποτέλεσμα της θεραπείας στους αμετάγγιστους ασθενείς φαίνεται ότι είναι δόσοεξαρτώμενο. Οι αμετάγγιστοι ασθενείς που έλαβαν δόση 10 mg/kg ΒΣ παρουσίασαν μετά από ένα έτος πτώση της τιμής της φερριτίνης κατά  $213,8 \pm 144,6 \mu\text{g/l}$  (διάμεσος= 261,5, εύρος= 9,0-323,0) ενώ σε αυτούς που έλαβαν δόση 20 mg/kg ΒΣ η μείωση της τιμής της φερριτίνης έφθασε τα  $825,3 \pm 491,2 \mu\text{g/l}$  (διάμεσος= 726,5, εύρος= 347,0-1501,0). Η διαφορά μεταξύ των δυο παραπάνω ομάδων είναι στατιστικά σημαντική

( $p=0,021$ ). Αντίθετα στην ομάδα των μεταγγισμένων ασθενών, η πτώση της τιμής της φερριτίνης μετά από ένα έτος για όσους έλαβαν δόση 10 mg/kg ΒΣ ήταν  $958,0 \pm 641,1$   $\mu\text{g/l}$  (διάμεσος= $774,0$ , εύρος= $429,0-1671,0$ ) ενώ για αυτούς που πήραν 20 mg/kg ΒΣ ήταν  $679,8 \pm 323,3$   $\mu\text{g/l}$  (διάμεσος= $695,0$ , εύρος= $271,0-1058,0$ ). Η διαφορά μεταξύ των 2 ομάδων μεταγγισμένων ασθενών είναι σαφώς μη στατιστικά σημαντική ( $p>0,05$ ).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η βασική παράμετρος εκτίμησης της αποτελεσματικότητας της θεραπείας αποσιδήρωσης με Deferasirox είναι η μεταβολή του LIC. Στην ομάδα των αμετάγγιστων ασθενών, η πτώση της τιμής του LIC μετά από 1 χρόνο από την έναρξη της αγωγής ήταν  $>3\text{mg Fe/g}$  ξηρού ιστού σε όλους εκτός από έναν (Διάγραμμα 22).

**Διάγραμμα 22:** Διαχρονική μεταβολή της τιμής του LIC σε αμετάγγιστους ασθενείς με EMA μετά από θεραπεία με Deferasirox.



Συγκεκριμένα η πτώση του LIC βρέθηκε ίση με  $9,0 \pm 7,9$  mg Fe/g ξηρού ιστού (διάμεσος= $5,0$ , εύρος= $0,4-22,3$ ). Ο συγκεκριμένος ασθενής όπου παρατηρήθηκε αποτυχία της αγωγής είναι ετεροζυγώτης για το γονίδιο H63D και βέβαια υποψήφιος για αύξηση της χορηγούμενης δόσης. Στους μεταγγισμένους ασθενείς η μείωση του LIC κυμάνθηκε σε ανάλογα επίπεδα και ήταν  $15,7 \pm$

7,5 mg Fe/g ξηρού ιστού (διάμεσος=15,7, εύρος= 10,4-21,0). Στους αμετάγγιστους ασθενείς η μεταβολή της μέσης τιμής του LIC μέσα στους πρώτους 12 μήνες αγωγής είναι στατιστικώς σημαντική ( $p=0,024$ ) ενώ δε συμβαίνει το ίδιο με τους μεταγγισμένους ασθενείς ( $p=0,2$ ). Στα [Διαγράμματα 23](#) και [24](#) απεικονίζονται αντίστοιχα οι διαχρονικές τιμές LIC των αμετάγγιστων και των μεταγγισμένων ασθενών μετά από τη χορήγηση Deferasirox.

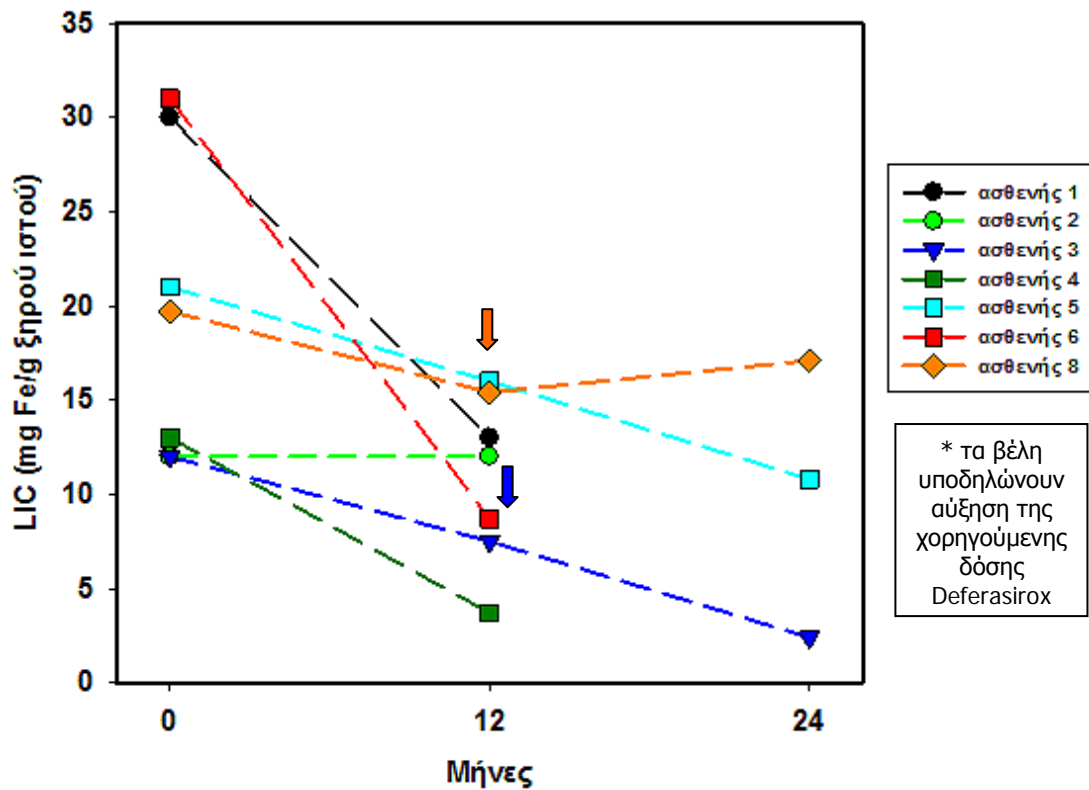
Η συσχέτιση της μείωσης του LIC με τη χορηγούμενη δόση φαρμάκου στους αμετάγγιστους ασθενείς δε φαίνεται να είναι στατιστικά σημαντική χωρίς όμως και να απέχει πάρα πολύ ( $p=0,077$ ). Σημειώνεται ότι η μείωση του LIC στους αμετάγγιστους ασθενείς που έλαβαν δόση 10 mg/kg ΒΣ ήταν  $4,6 \pm 3,6$  mg Fe/g ξηρού ιστού (διάμεσος= 4,4 , εύρος= 0,4-9,3) και σε αυτούς που έλαβαν δόση 20 mg/kg ΒΣ ήταν  $14,8 \pm 8,9$  mg Fe/g ξηρού ιστού (διάμεσος= 17,0 , εύρος= 5,0-22,3). Στους μεταγγισμένους ασθενείς όπως και για τη φερριτίνη δε βρέθηκε καμία συσχέτιση με τη χορηγούμενη δόση φαρμάκου.

Εκτός της LIC, σημαντική βελτίωση επήλθε με τη θεραπεία των αμετάγγιστων ασθενών και στην άλλη παράμετρο προσδιορισμού της ηπατικής υπερφόρτωσης με σίδηρο που είναι το ηπατικό T2\* ([Διάγραμμα 25](#)). Παρότι αυτό δεν αντικατοπτρίζεται στην οριακά μη στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p=0,08$ ) στις μέσες τιμές πριν και ένα χρόνο μετά τη θεραπεία είναι εμφανές στη σύγκριση των ομάδων βαρύτητας.

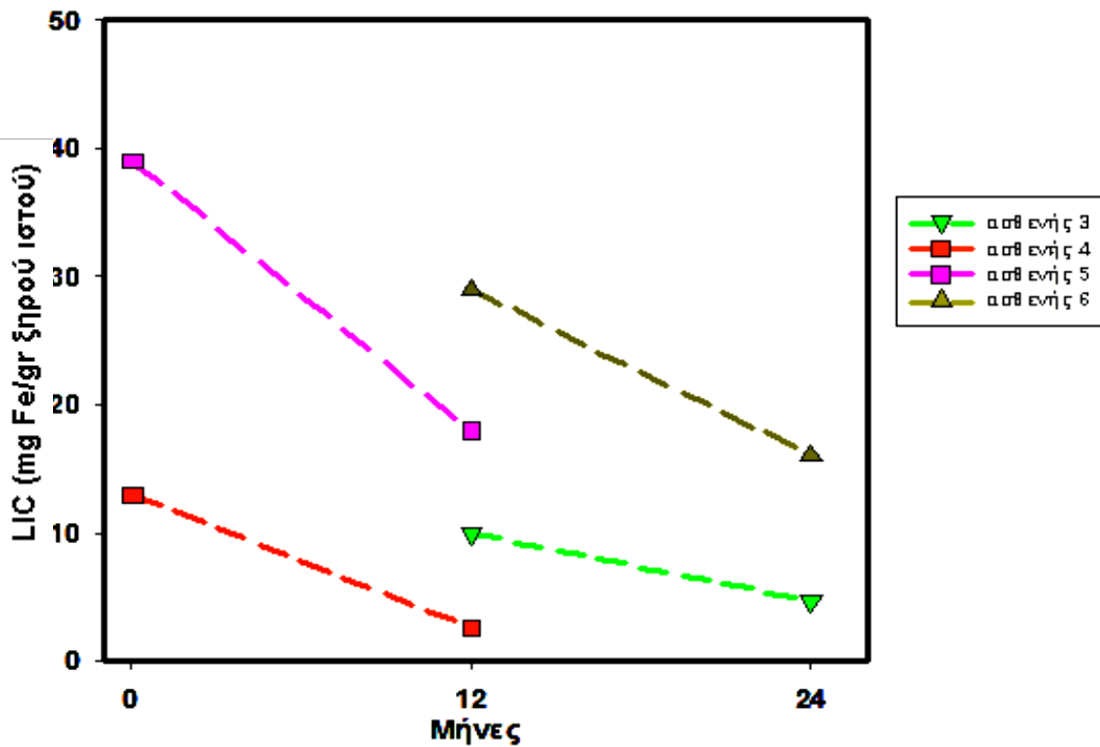
Πριν την έναρξη της θεραπείας από τους 8 αμετάγγιστους ασθενείς οι 4 είχαν βαριά ηπατική υπερφόρτωση με σίδηρο ( $T2^* < 1,4$  msec), οι 3 μέτρια ( $T2^* = 2,6-1,4$  msec) και ο ένας δεν παρουσίαζε καθόλου ( $T2^* > 6,4$  msec). Μετά από 12 μήνες θεραπείας κανένας ασθενής δεν είχε πλέον βαριά ηπατική υπερφόρτωση με σίδηρο, 4 είχαν μέτρια, 2 ήπια ( $T2^* = 6,3-2,7$  msec) και σε 2 οι τιμές του T2\* ήταν πάνω από το όριο των 6,4 msec.

Στην ομάδα των μεταγγισμένων ασθενών τα αποτελέσματα είναι σαφώς χειρότερα ([Διάγραμμα 26](#)). Πριν την έναρξη της αγωγής από τους 6 μεταγγισμένους ασθενείς οι 4 παρουσίαζαν βαριά ηπατική υπερφόρτωση με σίδηρο και 2 μέτρια. Μετά από ένα έτος αποσιδήρωσης βαριά υπερφόρτωση παρουσίαζε ένας ασθενής, 4 είχαν μέτρια και 1 ήταν φυσιολογικός. Ομοίως οι μέσες τιμές ηπατικού T2\* δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά πριν και μετά την αγωγή ( $p=0,28$ ).

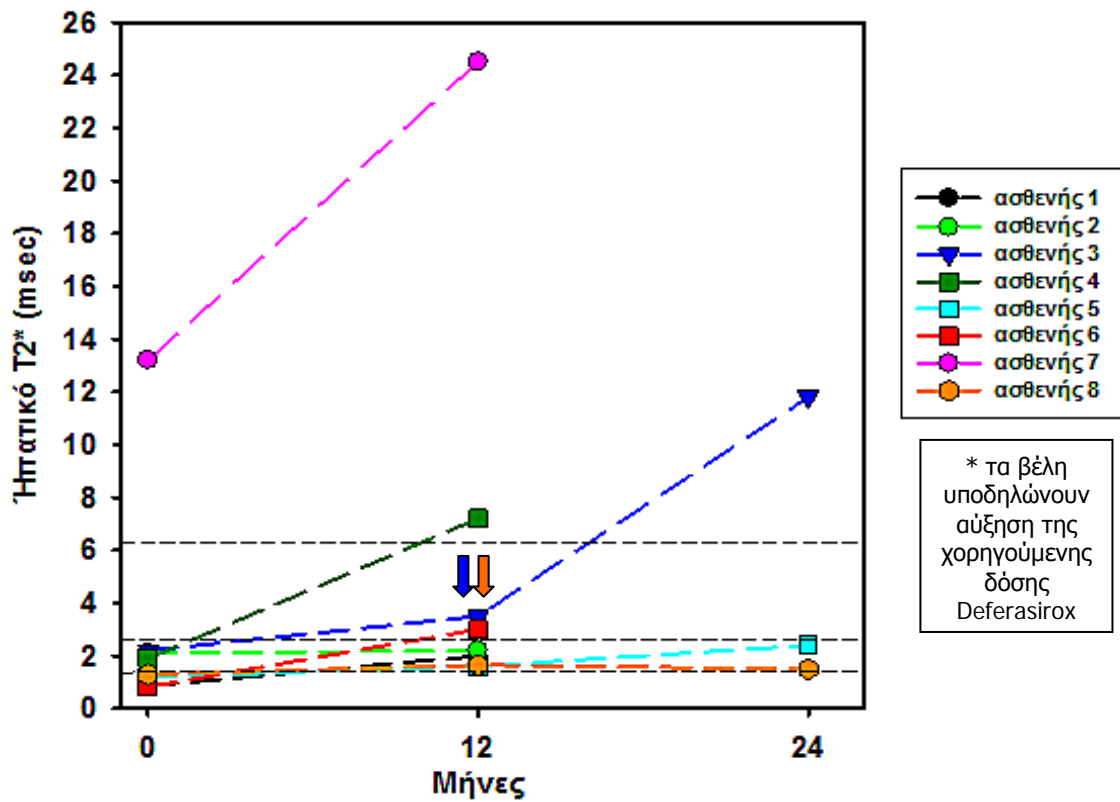
**Διάγραμμα 23:** Διαχρονικές τιμές LIC αμετάγγιστων ασθενών με EMA μετά από θεραπεία με Deferasirox.



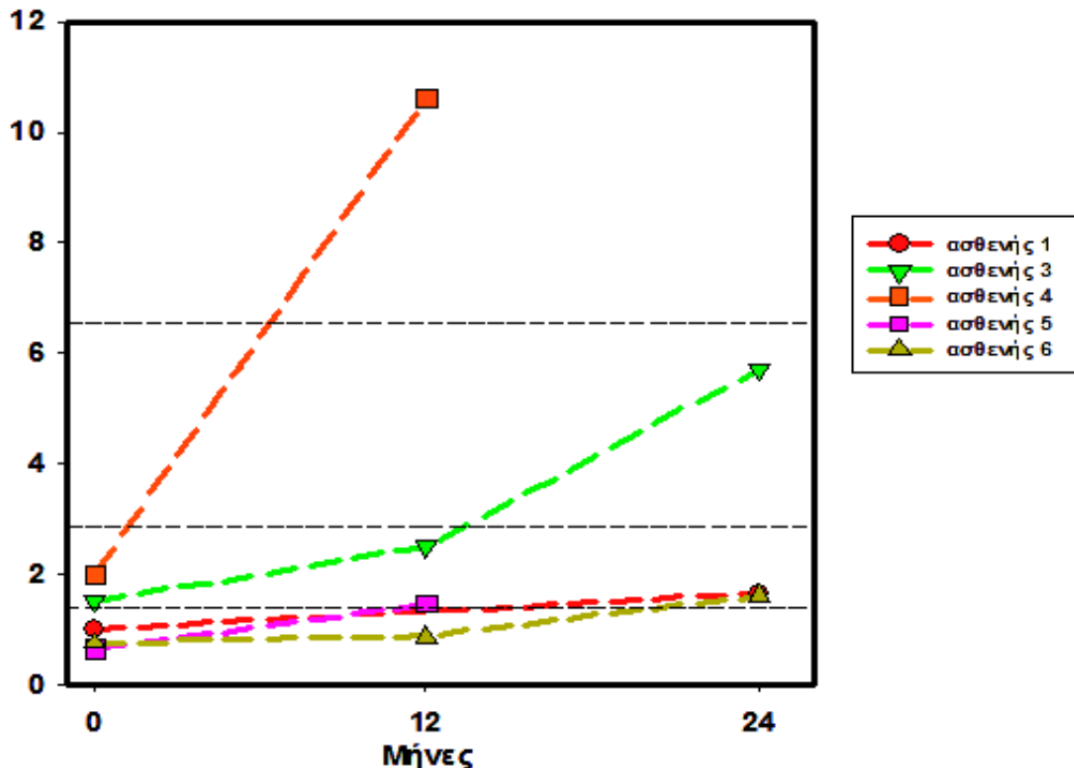
**Διάγραμμα 24:** Διαχρονικές τιμές LIC μεταγγισμένων ασθενών με EMA μετά από θεραπεία με Deferasirox.



**Διάγραμμα 25:** Διαχρονικές τιμές ηπατικού T2\* αμετάγγιστων ασθενών με EMA μετά από θεραπεία με Deferasirox.



**Διάγραμμα 26:** Διαχρονικές τιμές ηπατικού T2\* μεταγγισμένων ασθενών με EMA μετά από θεραπεία με Deferasirox.

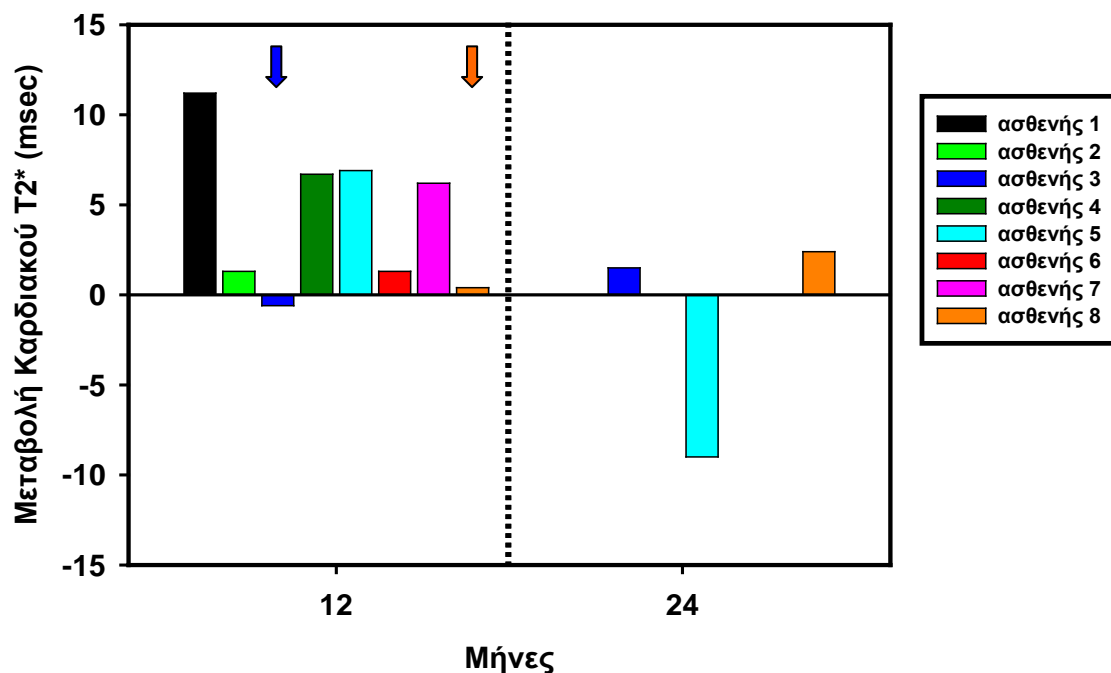


Για την περίπτωση υπερφόρτωσης της καρδιάς με σίδηρό ελέγχθηκε η διακύμανση του καρδιακού T2\* και του LVEF πριν και μετά τη θεραπεία με Deferasirox.

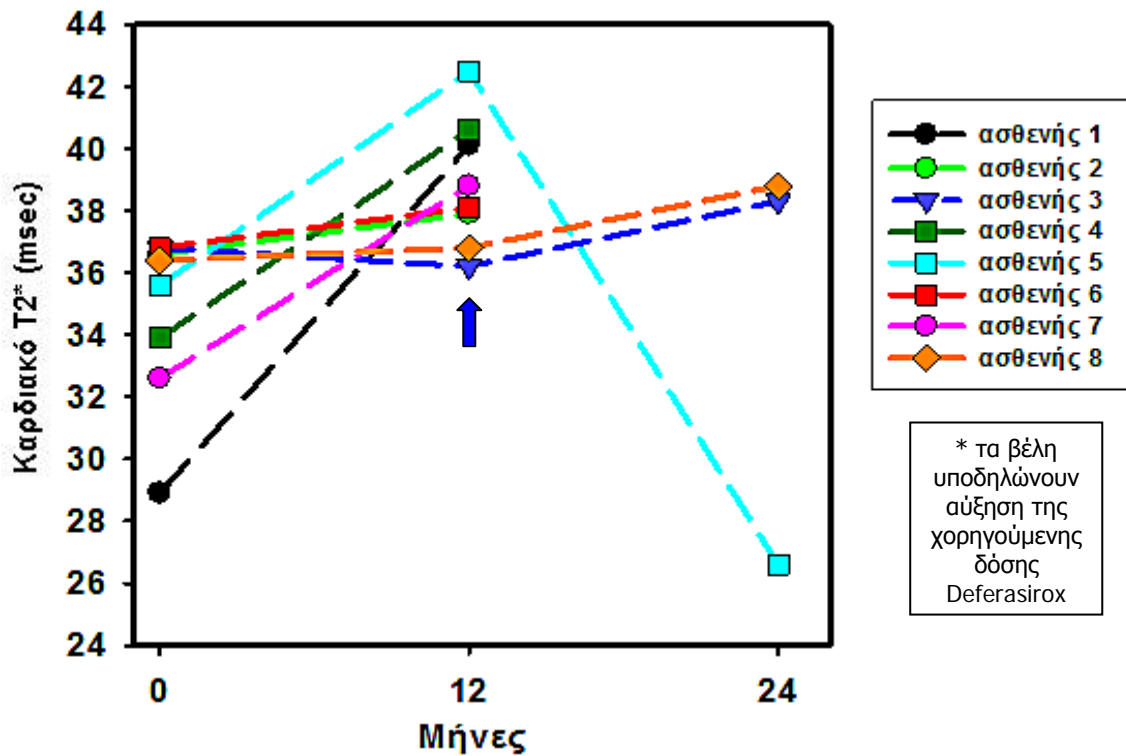
Καταρχήν κανένας από τους ασθενείς μεταγγισμένους ή μη δεν παρουσίασε αρχική τιμή καρδιακού T2\* <20 msec που συνδυάζεται με αυξημένη υπερφόρτωση σιδήρου (Διαγράμματα 28 και 29)

Μέσα στο πρώτο 12μηνο θεραπείας όλοι εκτός από έναν οι αμετάγγιστοι ασθενείς παρουσίασαν ικανοποιητική αύξηση της τιμής του καρδιακού T2\* κατά  $4,2 \pm 4,2$  msec (διάμεσος= 3,8, εύρος= -0,6-11,2) (Διάγραμμα 27). Η μεταβολή της μέσης τιμής του καρδιακού T2\* ήταν στατιστικά σημαντική ( $p=0,025$ ) μετά από 12 μήνες θεραπείας αλλά όχι και μετά από 24 μήνες ( $p=0,68$ ). Παράλληλα από την ανάλυση των στοιχείων για την συγκεκριμένη ομάδα αμετάγγιστων ασθενών δεν προέκυψε ότι το αποτέλεσμα της θεραπείας ήταν δόσοεξαρτώμενο.

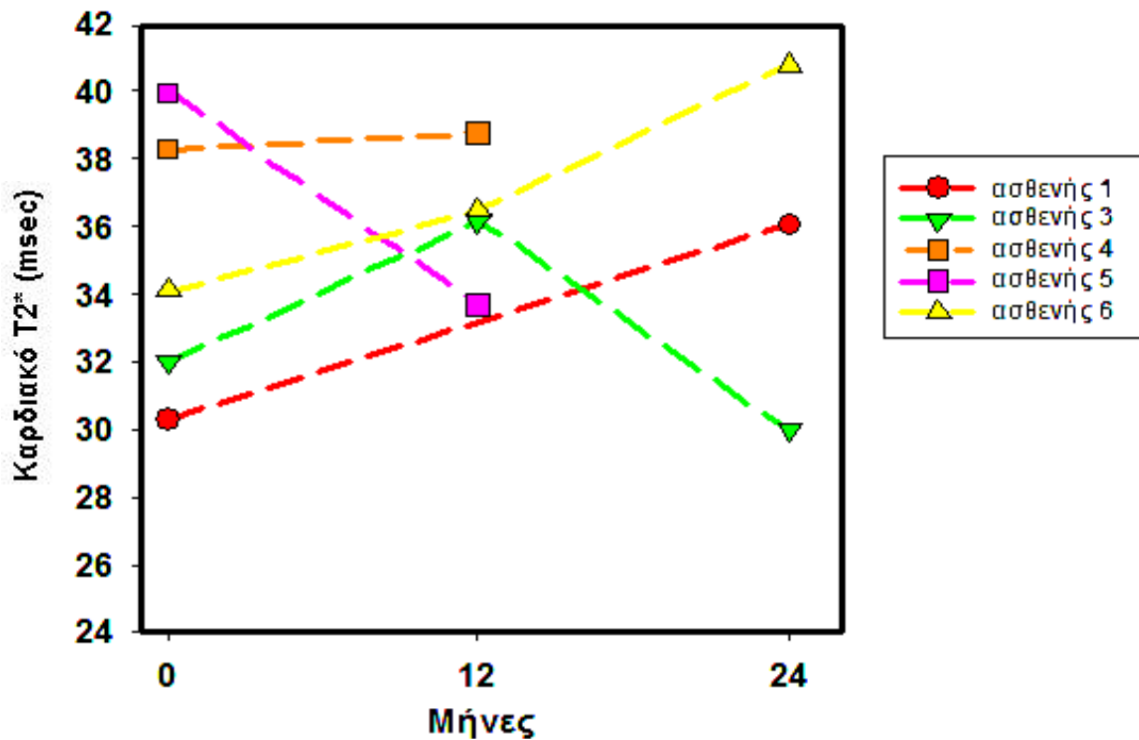
**Διάγραμμα 27:** Διαχρονική μεταβολή της τιμής του καρδιακού T2\* σε αμετάγγιστους ασθενείς μετά από θεραπεία με Deferasirox.



**Διάγραμμα 28:** Εξέλιξη καρδιακού T2\* αμετάγγιστων ασθενών με EMA μετά από θεραπεία με Deferasirox.



**Διάγραμμα 29:** Εξέλιξη καρδιακού T2\* μεταγγισμένων ασθενών με EMA μετά από θεραπεία με Deferasirox.



Από τους μεταγγισμένους ασθενείς μέσα στον πρώτο χρόνο θεραπείας η τιμή του καρδιακού T2\* παρουσίασε αύξηση σε όλους εκτός από έναν. Η αύξηση αυτή κυμάνθηκε στα επίπεδα του  $1,5 \pm 4,6$  msec (διάμεσος= 1,5, εύρος= -6,3- 4,2) και ήταν αναλογικά μικρότερη από αυτή που διαπιστώθηκε στους αμετάγγιστους ασθενείς. Σημειώνεται ότι δε διαπιστώθηκε κάποιο δοσοεξαρτώμενο αποτέλεσμα στη θεραπεία και η διαφορά της μέσης τιμής του καρδιακού T2\* στους μεταγγισμένους ασθενείς δεν ήταν στατιστικά σημαντική ούτε μετά από 12 μήνες ( $p=0,94$ ) αλλά και ούτε μετά από 24 μήνες ( $p=0,33$ ) αποσιδήρωσης.

Τέλος εκτιμήθηκε και το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας προ και μετά τη θεραπευτική αγωγή και τα αποτελέσματα παραθέτονται στα Διαγράμματα 30 και 31. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι όπως και στην περίπτωση του καρδιακού T2\* κατά την έναρξη της αγωγής κανένας ασθενής, μεταγγισμένος ή μη δεν παρουσίαζε τιμή LVEF <55%.

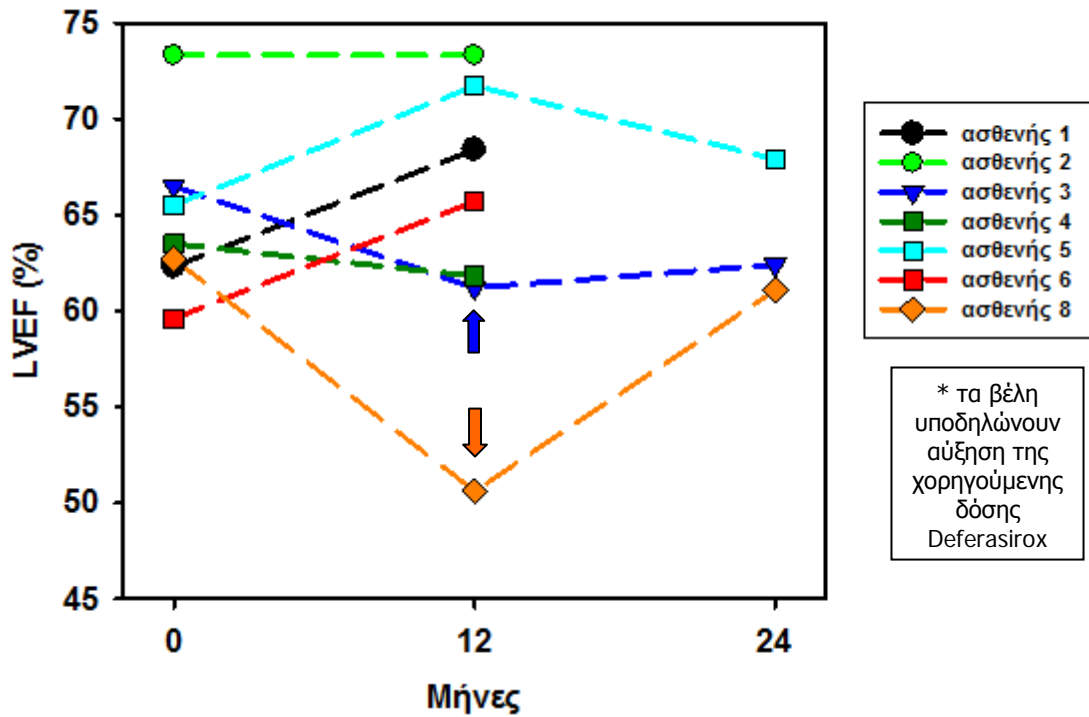
Στην ομάδα των αμετάγγιστων ασθενών μετά από 12 μήνες αποσιδήρωση 3 παρουσίασαν άνοδο του LVEF, 3 πτώση και ένας παρέμεινε στο ίδιο επίπεδο. Μόνο σε έναν από τους 3 ασθενείς η πτώση ήταν σημαντική και έφθασε την τιμή LVEF=50,6%. Η συγκεκριμένη ασθενής ήταν ετεροζυγώτης της μετάλλαξης H63D του HFE γονιδίου και μετά από αύξηση της δόσης του Deferasirox ένα χρόνο μετά η τιμή του LVEF επανήλθε στα φυσιολογικά επίπεδα (LVEF=61,3%).

Αντίστοιχα στην ομάδα των μεταγγισμένων ασθενών μετά από ένα χρόνο αγωγής η τιμή του LVEF παρουσίασε σε 3 άνοδο και σε 3 πτώση η οποία όμως δεν αξιολογείται καθώς πάντοτε το επίπεδο ήταν πολύ υψηλότερο του κατώτερου φυσιολογικού ορίου.

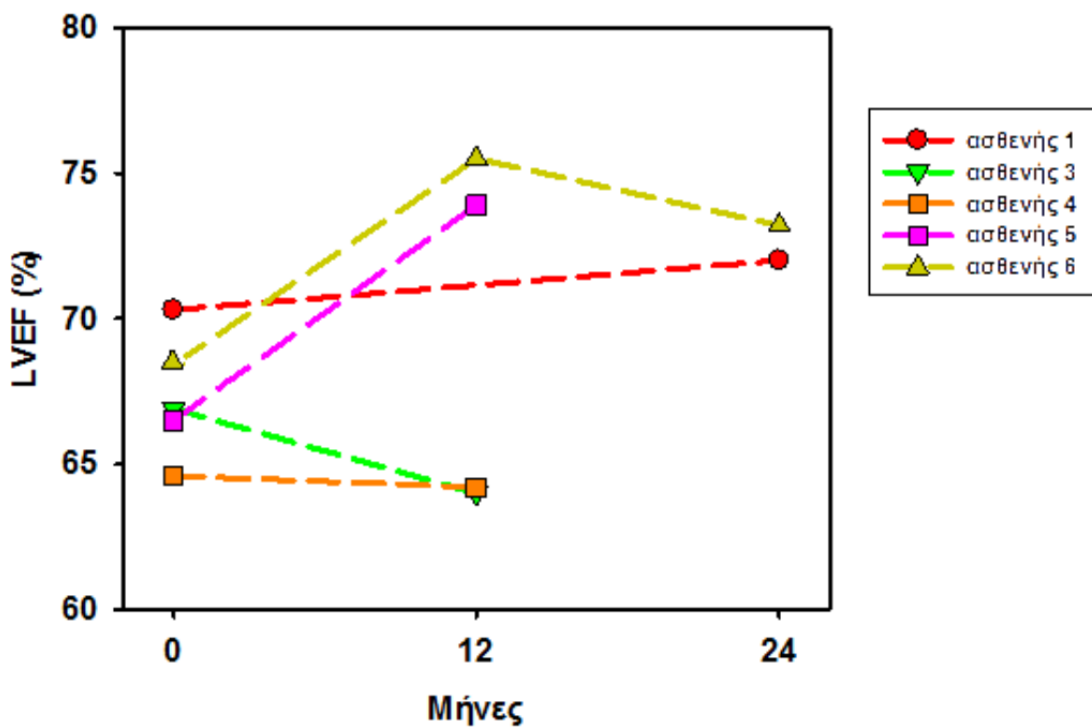
Από τη στατιστική ανάλυση των ευρημάτων δεν προέκυψε στατιστικώς σημαντική μεταβολή των μέσων τιμών του LVEF μετά από ένα χρόνο θεραπείας σε καμία από τις δυο ομάδες ασθενών (αμετάγγιστοι  $p=0,97$  και μεταγγισμένοι  $p=0,36$ ).



**Διάγραμμα 30:** Εξέλιξη LVEF αμετάγγιστων ασθενών με EMA μετά από θεραπεία με Deferasirox.



**Διάγραμμα 31:** Εξέλιξη LVEF μεταγγισμένων ασθενών με EMA μετά από θεραπεία με Deferasirox.



## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα σύνδρομα β-MA χαρακτηρίζονται από σημαντική ποικιλομορφία στη βαρύτητα του φαινότυπου. Ο όρος EMA προτάθηκε αρχικά με σκοπό να περιγράψει ασθενείς με ηπιότερη αναιμία από αυτούς με μείζονα β-MA, που αναγνωρίζονται κλινικά σε μεγαλύτερη ηλικία και οι οποίοι παραμένουν σε μεγάλο βαθμό αμετάγγιστοι. Με την πάροδο των χρόνων όμως διαπιστώθηκε ότι η διάγνωση της EMA καλύπτει ένα ευρύ φάσμα βαρύτητας και συνοδεύεται από υψηλότερη νοσηρότητα από ότι νομίζαμε στο παρελθόν (Taher et al, 2009a).

Ένα κοινό χαρακτηριστικό των μελετών στην ενδιάμεση μεσογειακή αναιμία είναι το γεγονός ότι συνήθως αφορούν μικρό αριθμό ασθενών με συνέπεια τα αποτελέσματα να είναι ενδεικτικά και όχι αποδεικτικά. Αυτό σημαίνει ότι η ύπαρξη περισσότερων μελετών που επιβεβαιώνουν ευρήματα άλλων είναι ένα σημαντικό βήμα για την αποδοχή των ευρημάτων. Ένα άλλο χαρακτηριστικό των μελετών αυτών είναι η ποικιλομορφία της σύνθεσης του υπό μελέτη πληθυσμού μιας και παρατηρείται γεωγραφική διαφοροποίηση στην κατανομή των μεταλλάξεων που καθορίζουν τον γονότυπο των ασθενών.

Η συγκεκριμένη μελέτη αποτελεί μια από τις μεγαλύτερες που εξετάζει την υπερφόρτωση με σίδηρο ασθενών με EMA στον Ελληνικό πληθυσμό. Στη συγκεκριμένη σειρά περιλαμβάνονται ασθενείς με αντιπροσωπευτικές μεταλλάξεις από τον Ελληνικό χώρο και κλινική εικόνα που εκτείνεται από ιδιαίτερα ήπια (στα όρια του στίγματος) έως αρκετά βαριά (στα όρια της μείζονος MA).

Οι ασθενείς με ήπιο κλινικό φαινότυπο, που αποτελούν και την πλειονότητα αντιστοιχούν σε 26 γονότυπους που προκύπτουν κυρίως από το συνδυασμό β σιωπηρών μεταλλάξεων (-101 και +6 σε ποσοστό 13,2%) ή β++ μεταλλάξεων (-87, IVSI-6, poly A και -28 σε ποσοστό 27,9%) με β0 ή β+ μεταλλάξεις. Στις περιπτώσεις με βαρύ κλινικό φαινότυπο συναντάμε 17 γονότυπους που συχνότερα προκύπτουν από το συνδυασμό β<sup>0</sup> με δβ<sup>0</sup>, δ<sup>0</sup>β<sup>+</sup> Corfu. Εντύπωση ίσως προκαλεί η παρουσία στη μελέτη ενός ομοζυγώτη β0/β0 και 3 διπλών ετεροζυγωτών β+/β0 όμως οι ασθενείς αυτοί εντάχθηκαν γιατί πληρούσαν τα προαναφερθέντα κριτήρια. Στο σύνολο των μεταλλάξεων συχνότερη ήταν η πολύ ήπια IVSI-6 (T-C) που βρέθηκε σε 26/136 βthal γονίδια (19,1%). Δεύτερη σε συχνότητα ήταν η β+ μετάλλαξη IVSI-110 (G-A) σε 17/136 βthal γονίδια (12,5%). Έπονται οι μεταλλάξεις IVSI-1 (G-A) (9,5%),

-101 (C-T) (8,1%), CD39 (C-T) (6,6%), -87 (C-T) (6,6%), και ακολουθούν από 5,9% οι μεταλλάξεις δ0β+ Corfu και (δβ)0 Sicilian. Η συχνότερη σιωπηρού τύπου μετάλλαξη ήταν η -101 (C-T) η οποία βρέθηκε σε 11 από τα 18 σιωπηρού τύπου βthal γονίδια. Σημαντική είναι και η παρουσία της β0 IVSII-1 μετάλλαξης σε ασθενείς με ενδιάμεση β-MA σε ποσοστό 5,2%.

Στην εξέλιξη της EMA κυριαρχούν τρεις βασικοί παράγοντες: η μη αποτελεσματική ερυθροποίηση, η χρόνια αναιμία και η υπερφόρτωση με σίδηρο. Ο συνδυασμός της μη αποτελεσματικής ερυθροποίησης και η χρόνια αναιμία οδηγούν σε καταστολή της εψιδίνης, αυξημένη απορρόφηση σιδήρου από το έντερο και αυξημένη απελευθέρωση του ανακυκλωμένου σιδήρου από το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα. Αυτό οδηγεί σε εξάντληση του σιδήρου στα μακροφάγα, σχετικά χαμηλά επίπεδα φερριτίνης ορού, αποθήκευση και υπερφόρτωση σιδήρου στο ήπαρ και απελευθέρωση τοξικών παραγώγων σιδήρου, όπως NTBI στην κυκλοφορία (Origa et al, 2007; Taher et al 2008; Taher et al, 2009a; Taher et al, 2009b). Υπερφόρτωση με σίδηρο μπορεί επίσης να προέλθει μετά από μεταγγίσεις οι οποίες μπορεί να κριθούν αναγκαίες για να μπορέσουν να αντιμετωπιστούν ορισμένες επιπλοκές (Aessopos et al, 2007b). Ακόμη αλλαγές στην προσαρμογή του μυελού των οστών στην αναιμία που σχετίζονται με την ηλικία, σε συνδυασμό με τη δυσκολία να διατηρηθεί υψηλή παροχή με τη φυσιολογική γήρανση του αγγειακού συστήματος, μπορεί να καταστήσουν ορισμένους ασθενείς με EMA από μεταγγισοανεξάρτητους σε μεταγγισοεξαρτώμενους με την πάροδο του χρόνου (O'Donnell et al, 2007; Taher et al, 2010b).

Στην προσπάθεια να προσδιοριστεί η υπερφόρτωση σιδήρου σε ασθενείς με EMA, μετρήθηκαν η φερριτίνη, ο σίδηρος, η συνολική σιδηροδεσμευτική ικανότητα, ο κορεσμός τρανσφερρίνης, ο NTBI, ο sTfR, η ερυθροποιητίνη αλλά και δείκτες όπως ο T2\* στην καρδιά και το ήπαρ και ο LIC. Σε πολλούς από τους ασθενείς της μελέτης οι παραπάνω παράμετροι αιμοσιδήρωσης βρέθηκαν σημαντικά υψηλότερες από τις φυσιολογικές τιμές. Επίσης η σύγκριση με βάση τον κλινικό φαινότυπο κατέδειξε στατιστικά σημαντικά υψηλότερες τιμές φερριτίνης ( $p < 0,001$ ), σιδήρου ( $p < 0,001$ ), κορεσμού τρανσφερρίνης ( $p < 0,01$ ) και NTBI ( $p < 0,0001$ ) στους ασθενείς με βαρύ κλινικό φαινότυπο.

Για πολλά χρόνια η τιμή της φερριτίνης χρησίμευε ευρέως σαν αποκλειστική παράμετρος αξιολόγησης της υπερφόρτωσης με

σιδήρο ασθενών με μείζονα β-MA και ως οδηγός για την έναρξη αποσιδήρωσης. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης συμφωνούν με ευρήματα από άλλες πρόσφατες μελέτες τόσο σε ασθενείς με β-MA όσο και σε ασθενείς με EMA όπου φαίνεται ότι η τιμή της φερριτίνης δεν αποτελεί αξιόπιστο κλινικό δείκτη του ολικού φορτίου σιδήρου στον οργανισμό όπως θεωρείτο παλαιότερα (Angelucci et al, 2000; Taher et al 2009a; Kolnagou et al, 2013) αλλά θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους. Η χρήση του MRI T2\* στη μελέτη μας όπως και σε άλλες καταδεικνύει ότι και στους ασθενείς με EMA η εναπόθεση σιδήρου δεν είναι ομοιογενής στα διάφορα όργανα. Στους ασθενείς με EMA έχουμε αυξημένη απορρόφηση σιδήρου από το πεπτικό που οδηγεί σε μέτρια υπερφόρτωση με σίδηρο σε σχέση με την αυξημένη υπερφόρτωση στους μεταγγισοεξαρτώμενους ασθενείς με β-MA. Σύμφωνα με τις μετρήσεις του ηπατικού T2\* οι περισσότεροι ασθενείς της μελέτης, τόσο οι μεταγγισμένοι (81,8%) όπως αναμενόταν όσο και οι αμετάγγιστοι (83,3%), παρουσιάζουν μέτρια ή βαριά υπερφόρτωση του ήπατος με σίδηρο. Το εύρημα αυτό όμως δεν συνδυάζεται με αντίστοιχα αυξημένο φορτίο της καρδιάς αφού όλοι οι ασθενείς παρουσιάζουν φυσιολογικές τιμές καρδιακού T2\*. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε πρόσφατες μελέτες, όπως και στη δική μας, ανευρίσκεται σημαντική συσχέτιση της φερριτίνης με την εναπόθεση σιδήρου στο ήπαρ, όπως φαίνεται από τη συσχέτιση με το ηπατικό T2\* ( $Rho = -0,77, p < 0,00002,$ ) και με τη συγκέντρωση σιδήρου στο ήπαρ (LIC) ( $r = 0,80, p < 0,0001$ ) απλά με μικρότερη κλίση από αυτή που παρατηρείται στους ασθενείς με β-MA. Έτσι, για τα ίδια επίπεδα σιδήρου στο ήπαρ τα επίπεδα φερριτίνης είναι χαμηλότερα στην EMA από ότι στη β-MA (Origa et al, 2007; Pakbaz et al, 2007). Παράλληλα η τεκμηρίωση ότι δεν ανευρίσκεται καρδιακή υπερφόρτωση σιδήρου ( $r = -0,35, p > 0,05$ ) ακόμη και με την παρουσία σοβαρού ηπατικού φορτίου σιδήρου βρίσκεται σε συμφωνία με προηγούμενες εκθέσεις (Origa et al, 2008; Roghi et al, 2010; Taher et al, 2010a) και παρόμοια με αυτό που παρατηρείται σε ασθενείς με αιμοχρωμάτωση τύπου I.

Η παρατήρηση αυτή μπορεί να εξηγηθεί εν μέρει από τη διαφορετική προέλευση της περίσσειας σιδήρου στις δύο συνθήκες. Φαίνεται ότι η οδός της άντλησης της περίσσειας σιδήρου, δηλαδή, γαστρεντερική απορρόφηση έναντι απελευθέρωσης σιδήρου από το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα παίζει σημαντικό ρόλο για τις θέσεις της εναπόθεσής του. Όταν η

περίσσεια σιδήρου προέρχεται κυρίως από την αυξημένη απορρόφηση από το γαστρεντερικό, ο ρυθμός πρόσληψης είναι χαμηλός και τότε εναποτίθεται στο πρώτο όργανο αποθήκευσης που συναντά η πυλαία. Στη β-MA η περίσσεια σιδήρου προέρχεται κυρίως από τις μεταγγίσεις ερυθρών αιμοσφαιρίων και την ανακύκλωση σιδήρου από γερασμένα ερυθρά στα μακροφάγα και η εναπόθεσή του είναι πιο ευρεία. Κατ' αυτόν τον τρόπο πολύ περισσότερα όργανα εκτός από το ήπαρ (κυρίως τα μακροφάγα) συμμετέχουν στα αυξημένα επίπεδα φερριτίνης στους ασθενείς με β-MA σε σχέση με εκείνους με EMA.

Στη μελέτη, τα επίπεδα NTBI βρέθηκαν αυξημένα στην πλειοψηφία των ασθενών με EMA. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε δυσανάλογα χαμηλά επίπεδα εψιδίνης σε σύγκριση με το φορτίο σιδήρου που οδηγούν σε αυξημένη γαστρεντερική απορρόφηση του σιδήρου και την απελευθέρωση σιδήρου από τα μακροφάγα. Σε συμφωνία με πρόσφατα δημοσιευμένη μελέτη από το Λίβανο (Taher et al, 2009β) η τιμή του NTBI στους αμετάγγιστους ασθενείς ήταν ανεξάρτητη από την ηλικία και συσχετιζόταν ισχυρά με το λογάριθμο της φερριτίνης ( $p=0,0047$ ) και τη LIC ( $p=0,001$ ). Τα δύο τελευταία ευρήματα δεν ήταν συμβατά με μελέτη από την Ιταλία σε ασθενείς με β-MA και EMA (Piga et al, 2009) όπου δεν στοιχειοθετήθηκε συσχέτιση του NTBI με τη φερριτίνη ή την τιμή του LIC. Στη μελέτη μας εκτός από τα παραπάνω βρέθηκε και συσχέτιση των επιπέδων NTBI με το λογάριθμο του ηπατικού T2\* ( $p=0,0006$ ). Τα παραπάνω ευρήματα υποστηρίζουν την πρόσφατη άποψη (Taher et al, 2009α) ότι ο NTBI είναι ένας καλός δείκτης της υπερφόρτωσης με σίδηρο πέρα από τους μεταγγιζόμενους ασθενείς με β-MA (al-Refaiie et al, 1992; Cabantchik et al, 2005) και για τους ασθενείς με EMA.

Εκτός από τον αναμφισβήτητο παράγοντα των μεταγγίσεων διάφοροι τροποποιητικοί παράγοντες φαίνεται να παίζουν ρόλο στο ισοζύγιο σιδήρου των ασθενών με EMA στους οποίους περιλαμβάνονται: η ηλικία, ο αιματολογικός φαινότυπος, η διενέργεια σπληνεκτομής, το ποσοστό της αιμοσφαιρίνης F (HbF), η ερυθροποιητική δραστηριότητα του ασθενούς, η ύπαρξη μεταλλάξεων συγγενούς αιμοχρωμάτωσης.

Ο πιο σαφής και ισχυρός τροποποιητικός παράγοντας από όλους είναι η ηλικία. Όπως καταδεικνύεται από τη στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της τιμής της φερριτίνης και της ηλικίας σε αμετάγγιστους ασθενείς ( $r=0,517$ ,  $p=0,0001$ ) η σταδιακή απορρόφηση σιδήρου από το πεπτικό σύστημα οδηγεί με

το πέρασμα του χρόνου σε υπερφόρτωση με σίδηρο ανεξάρτητα από οποιοδήποτε άλλο επιβαρυντικό παράγοντα.

Ο αιματολογικός φαινότυπος και κατ' επέκταση ο γονότυπος όπως φαίνεται επίσης επηρεάζει το μεταβολισμό του σιδήρου. Η σημασία του είδους των μεταλλάξεων φαίνεται από το γεγονός ότι οι ασθενείς με μια β<sup>sil</sup> μετάλλαξη έχουν γενικά χαμηλότερες τιμές φερριτίνης και NTBI από τους ασθενείς με β<sup>0</sup> και δβ μεταλλάξεις.

Σαφής και ισχυρός τροποποιητικός παράγοντας είναι και η διενέργεια σπληνεκτομής. Οι αμετάγγιστοι ασθενείς της μελέτης που είχαν σπληνεκτομηθεί παρουσίαζαν σε σχέση με τους μη σπληνεκτομημένους αυξημένες τιμές φερριτίνης ( $p < 0,0001$ ), σιδήρου ( $p < 0,000001$ ), κορεσμού τρανσφερρίνης ( $p < 0,00001$ ) και NTBI ( $p < 0,001$ ). Τα αποτελέσματα συμφωνούν με αυτά άλλων μελετών. Η αύξηση της τιμής της φερριτίνης μετά την σπληνεκτομή φαίνεται παράδοξη μιας και η αφαίρεση του σπλήνα ουσιαστικά επιφέρει τη μείωση της συνολικής αποθηκευμένης ποσότητας στο σώμα με την απομάκρυνση της αποθηκευμένης ποσότητας στο όργανο. Φαίνεται ότι με την αφαίρεση του σπλήνα μειώνεται η συνολική αποθηκευτική δυνατότητα σιδήρου στον οργανισμό με συνέπεια η περίσσεια σιδήρου να ανακατανέμεται σε άλλα αποθηκευτικά όργανα και κυρίως το ήπαρ στους ασθενείς με EMA. Την αύξηση της αποθήκευσης στο ήπαρ αντιπροσωπεύουν οι αυξημένες τιμές φερριτίνης στη μελέτη μας ενώ το γεγονός επιβεβαιώνεται από τις αυξημένες τιμές του ηπατικού T2\* ( $p = 0,03$ ) και το σχεδόν διπλασιασμό της τιμής του LIC παρότι μη στατιστικά σημαντική ( $p = 0,08$ ) στους σπληνεκτομημένους ασθενείς.

Τα στοιχεία που υπάρχουν σχετικά με τον ρόλο της συγκληρονόμησης μεταλλάξεων στο γονίδιο HFE και μεταλλάξεων μεσογειακής αναιμίας είναι αρκετά αντικρουόμενα. Τα επίπεδα φερριτίνης βρέθηκαν αυξημένα σε ασθενείς με στίγμα μεσογειακής αναιμίας όταν ήταν παρούσα η μετάλλαξη H63D (Melis et al, 2002). Σε ασθενείς με κληρονομική αιμοχρωμάτωση τύπου I, η συνύπαρξη στίγματος MA συσχετίστηκε με βαρύτερο κλινικό φαινότυπο (Piperino et al, 2000). Από την άλλη πλευρά, η ετεροζυγωτία του H63D δεν επηρέασε τα επίπεδα φερριτίνης σε μια ομάδα Ελλήνων ασθενών είτε με μικροδρεπανοκυτταρική αναιμία ή EMA. (Politou et al, 2004).

Η μετάλλαξη H63D οδηγεί σε μικρότερη απώλεια της λειτουργικότητας της πρωτεΐνης HFE από ότι η μετάλλαξη C282Y. Επιπλέον, υπάρχει σημαντική μεταβλητότητα στην κλινική διεξόδυση αυτών των γονιδίων. Στην ομάδα των ασθενών μας,

παρουσιάσαμε το ρόλο των μεταλλάξεων H63D και S65C κυρίως στην ομάδα των νεότερων ασθενών. Οι ασθενείς με μια HFE μετάλλαξη παρουσίασαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερες τιμές φερριτίνης ( $p=0,025$ ) και TIBC ( $p=0,002$ ) από τους ασθενείς που δεν είχαν. Αξίζει να σημειωθεί, επίσης, ότι ο ασθενής (άνδρας 19 ετών) με τα υψηλότερα επίπεδα φερριτίνης (1183  $\mu\text{g/L}$ ) ήταν ετεροζυγώτης για H63D, ενώ ο μοναδικός ομοζυγώτης για H63D (γυναίκα 24 ετών) είχε μέτρια αυξημένη τιμή φερριτίνης (399  $\mu\text{g/L}$ ). Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι η συνύπαρξη HFE μεταλλάξεως μπορεί να παίζει ρόλο στο βαθμό της υπερφόρτωσης σιδήρου σε ασθενείς με EMA. Η παρατήρηση ότι ο ρόλος αυτός είναι περισσότερο εμφανής σε νεαρότερη ηλικία μπορεί να εξηγηθεί εν μέρει από την ευαισθησία της μεθόδου που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της υπερφόρτωσης σιδήρου (δηλ. τα επίπεδα φερριτίνης).

Η EMA σε αντίθεση με τη  $\beta$ -MA για πολλά χρόνια θεωρείτο μια ασθένεια ήπιας ή μέτριας βαρύτητας με περιορισμένες επιπλοκές. Η θεραπευτική προσέγγιση έτσι κατευθυνόταν περισσότερο προς την αποφυγή έναρξης συστηματικών μεταγγίσεων νωρίς κατά την παιδική ηλικία που θα σήμαινε και την ανάγκη αποσιδήρωσης και στην περίπτωση εμφάνισης επιπλοκών την απόφαση διενέργειας σπληνεκτομής. Κατά συνέπεια, σε αντίθεση με τη  $\beta$ -MA, η αξιολόγηση του ρόλου της μετάγγισης και της θεραπείας αποσιδήρωσης στην αντιμετώπιση της EMA και την πρόληψη των επιπλοκών ήταν σχετικά περιορισμένη. Σε αυτό συνέτεινε και η αντιμετώπιση των ίδιων των ασθενών που με την εσφαλμένη εντύπωση μιας ελαφράς νόσου δεν ήταν δεκτικοί στην αποδοχή έναρξης μεταγγίσεων και θεραπείας αποσιδήρωσης.

Η καλύτερη κλινική μελέτη των ασθενών με EMA απέδειξε ότι παρά τον χαμηλό ρυθμό πρόσληψης σιδήρου από το πεπτικό οι μη μεταγγιζόμενοι ασθενείς με EMA θα αναπτύξουν τελικά επιπλοκές λόγω αιμοσιδήρωσης απλά χρονικά πιο αργά σε σχέση με ασθενείς με  $\beta$ -MA (Pippard et al, 1979). Η αυξανόμενη συχνότητα εμφάνισης επιπλοκών σε ασθενείς με EMA χωρίς θεραπευτική αντιμετώπιση δείχνει ότι θα μπορούσαν να επωφεληθούν από μια πρώιμη παρέμβαση (Aessopos A et al, 2007b) η οποία θα μειώσει τον αυξημένο κίνδυνο αλλοανοσοποίησης με την καθυστερημένη έναρξη μεταγγίσεων (Eder et al, 2007).

Παρά τις αρκετές διαθέσιμες θεραπευτικές επιλογές, δεν υπάρχουν επί του παρόντος σαφείς κατευθυντήριες γραμμές για την αντιμετώπιση των ασθενών με EMA. Η τρέχουσα πρακτική

ακολουθεί συστάσεις που προέρχονται από τη γνώμη ειδικών, μικρές σειρές, ή μελέτες που δεν σχεδιάστηκαν για να αξιολογήσουν το ρόλο των διαφόρων παρεμβάσεων. Η έναρξη θεραπείας αποσιδήρωσης βασίζεται κυρίως στην έκταση της υπερφόρτωσης με σίδηρο και στο βαθμό της εναπόθεσής του χωρίς όμως να υπάρχουν και εδώ σαφείς κατευθυντήριες οδηγίες (Cappellini et al, 2008). Στη μελέτη αυτή επιλέχθηκε να χορηγηθεί ο νεώτερος χηλικός παράγοντας Deferasirox σε 16 ασθενείς (8 αμετάγγιστους και 8 μεταγγισμένους) με EMA και τιμές φερριτίνης >450mg/. Η Deferasirox επιλέχθηκε γιατί έχει τη δυνατότητα να χορηγείται μόνο μια φορά την ημέρα από του στόματος και έτσι ευνοεί την καλύτερη συμμόρφωση των ασθενών. Παράλληλα έτσι θα δοκιμαζόταν η αποτελεσματικότητα του συγκεκριμένου χηλικού παράγοντα σε ασθενείς με σχετικά ηπιότερη αιμοσιδήρωση μιας και κυρίως έχει χρησιμοποιηθεί σε ασθενείς με μείζονα MA και μέτρια ως βαριά αιμοσιδήρωση από μεταγγίσεις. Ως κριτήρια της θεραπείας επιλέχθηκαν: η μείωση της φερριτίνης, (του πιο εύκολου προς παρακολούθηση δείκτη αιμοσιδήρωσης), σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο μετά από 12 μήνες, η μείωση του LIC κατά 3mg Fe/g ξηρού ιστού σε διάστημα ενός έτους και η διατήρησή του <7mg Fe/g ξηρού ιστού, επίπεδο που συσχετίζεται με αυξημένη νοσηρότητα (Olivieri and Brittenham, 1997, Musallam et al, 2011).

Στο σύνολο των ασθενών παρατηρήθηκε μείωση της τιμής της φερριτίνης σε συνάρτηση με το χρόνο. Στους αμετάγγιστους ασθενείς μετά από 12 μήνες η μέση τιμή ήταν  $634,5 \pm 396,9$  μg/L (μέση μείωση 519,5 μg/L,  $p=0,016$ ) ενώ στους μεταγγισμένους  $854,3 \pm 660,8$  μg/L (μέση μείωση 723,0 μg/L,  $p=0,004$ ). Μέσα στο δεύτερο έτος καταγράφηκε περαιτέρω μείωση κατά 74,2 μg/L στους αμετάγγιστους και 246,1 μg/L στους μεταγγισμένους, αλλά και στις δυο περιπτώσεις η διαφορά δεν ήταν στατιστικώς σημαντική. Το αποτέλεσμα της θεραπείας στους αμετάγγιστους ασθενείς φαίνεται ότι είναι δόσοεξαρτώμενο. Οι αμετάγγιστοι ασθενείς που έλαβαν δόση 10 mg/kg ΒΣ παρουσίασαν μετά από ένα έτος πτώση της τιμής της φερριτίνης κατά 213,8 μg/L ενώ σε αυτούς που έλαβαν δόση 20 mg/kg ΒΣ η μείωση της τιμής της φερριτίνης έφθασε τα 825,3 μg/L ( $p=0,021$ ). Αρκεί λοιπόν όπως φαίνεται αναπροσαρμογή της δόσης προς τα επάνω για να πετύχει κανείς το επιθυμητό αποτέλεσμα.

Βασική παράμετρος εκτίμησης της αποτελεσματικότητας της θεραπείας αποσιδήρωσης με Deferasirox ήταν η μεταβολή του LIC. Σε όλους εκτός από έναν από τους αμετάγγιστους ασθενείς, η



μείωση της LIC που επιτεύχθηκε ένα χρόνο μετά την έναρξη της αγωγής ήταν  $>3\text{mg Fe/g}$  ξηρού ιστού ( $8,9 \pm 7,9 \text{ mg Fe/g}$  ξηρού ιστού). Ο συγκεκριμένος ασθενής όπου παρατηρήθηκε αποτυχία της αγωγής ήταν ετεροζυγώτης για το γονίδιο H63D και ως εκ τούτου παρουσίαζε έναν επιπρόσθετο παράγοντα υπερφόρτωσης με σίδηρο. Θεραπευτικά είναι υποψήφιος για αύξηση της δόσης του χηλικού παράγοντα. Ανάλογα ικανοποιητικά ήταν τα αποτελέσματα της αποσιδήρωσης και στους μεταγγισμένους ασθενείς όπου η μείωση έφτασε τα  $10,9 \pm 9,9 \text{ mg Fe/g}$  ξηρού ιστού. Όσον αφορά τη συσχέτιση της μείωσης του LIC με τη χορηγούμενη δόση φαρμάκου στους αμετάγγιστους ασθενείς, δε φαίνεται να είναι στατιστικά σημαντική χωρίς όμως και να απέχει πάρα πολύ ( $p=0,077$ ). Ο στόχος της μείωσης του επιπέδου LIC  $<7\text{mg Fe/g}$  ξηρού ιστού επιτεύχθηκε σε 2 αμετάγγιστους ασθενείς και σε άλλους 3 μεταγγισμένους μετά από ένα χρόνο χορήγησης του φαρμάκου. Η βελτίωση αυτή μπορεί να καταγραφεί σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών με την επιλογή χορήγησης μεγαλύτερης δόσης του χηλικού παράγοντα αφού στη συγκεκριμένη ομάδα ασθενών χορηγήθηκαν δόσεις των 10 και 20 mg/kg βάρους σώματος ενώ είναι δυνατόν να χορηγηθεί με επιτυχία και δόση 30 mg/kg βάρους (Cappellini et al, 2006; Voskaridou et al, 2010). Επίσης η μείωση  $>3\text{mg Fe/g}$  ξηρού ιστού ανά έτος φαίνεται ικανή να οδηγήσει σε μείωση των συνολικών επιπέδων LIC  $<7\text{mg Fe/g}$  ξηρού ιστού μέσα σε μερικά χρόνια θεραπείας. Βελτίωση επήλθε και στην παράμετρο του ηπατικού T2\* παρότι μη στατιστικά σημαντική ( $p=0,08$ ). Μετά την πάροδο 12 μηνών θεραπείας στους 8 αμετάγγιστους ασθενείς κανένας δεν είχε βαριά ηπατική υπερφόρτωση με σίδηρο (T2\*  $<1,4 \text{ msec}$ ), 4 είχαν μέτρια, 2 ήπια και 2 είχαν φυσιολογική τιμή T2\* ( $>6,4 \text{ msec}$ ), όταν κατά την έναρξη της αγωγής η αναλογία ήταν 4 βαριά, 3 μέτρια και 1 φυσιολογική.

Στην εκτίμηση της υπερφόρτωσης του μυοκαρδίου βρέθηκε μεν στατιστικά σημαντική ( $p=0,025$ ) μεταβολή του καρδιακού T2\* στους αμετάγγιστους ασθενείς αλλά το αποτέλεσμα δεν ήταν δοσοεξαρτώμενο και επίσης όλοι οι ασθενείς κατά την έναρξη της θεραπείας είχαν τιμές καρδιακού T2\*  $>20 \text{ msec}$ . Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα και ως προς την εκτίμηση του LVEF αφού δεν καταγράφηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μετά τη θεραπεία σε ασθενείς όμως που είχαν αρχική τιμή LVEF  $>55\%$ .

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η μελέτη αυτή, κατέγραψε σε ικανό αριθμό ασθενών με EMA στον Ελλαδικό χώρο, τη σημαντική αιμοσιδήρωση που προοδευτικά παρουσιάζει μεγάλο ποσοστό των ασθενών αυτών, παρά τη συνήθως ήπια κλινική εικόνα και την απουσία συστηματικών μεταγγίσεων.

Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν τη συσχέτιση των επιπέδων σιδήρου με τον κλινικό φαινότυπο των ασθενών. Οι ασθενείς με βαρύ κλινικό φαινότυπο (I1) έχουν στατιστικά σημαντικά υψηλότερες τιμές φερριτίνης ( $p < 0,001$ ), σιδήρου ( $p < 0,001$ ), κορεσμού τρανσφερρίνης ( $p < 0,01$ ) και NTBI ( $p < 0,0001$ ) σε σχέση με τους ασθενείς με ήπιο κλινικό φαινότυπο.

Σε συμφωνία με ευρήματα άλλων μελετών, καταδεικνύεται ότι στην EMA η εναπόθεση σιδήρου στα όργανα δεν είναι ομοιογενής. Με τη χρήση του MRI φαίνεται ότι οι περισσότεροι ασθενείς της μελέτης, τόσο όσοι έχουν μεταγγιστεί στο παρελθόν (81,8%) όσο και οι αμετάγγιστοι (83,3%) παρουσιάζουν μέτρια ή βαριά υπερφόρτωση με σίδηρο (με βάση το ηπατικό T2\*) ενώ οι τιμές καρδιακού T2\* είναι φυσιολογικές.

Παράγοντες όπως η ηλικία, κατά κύριο λόγο, αλλά και η διενέργεια σπληνεκτομής, ο αιματολογικός φαινότυπος και η ύπαρξη HFE μεταλλάξεων μπορεί να επιβαρύνουν την τελική εναπόθεση σιδήρου. Η ηλικία συσχετίζεται ισχυρά με την τιμή της φερριτίνης στους αμετάγγιστους ασθενείς ( $p = 0,0001$ ). Ασθενείς με μια  $\beta^{sll}$  μετάλλαξη έχουν γενικά χαμηλότερες τιμές φερριτίνης και NTBI από τους ασθενείς με  $\beta^0$  και  $\delta\beta$  μεταλλάξεις. Η διενέργεια σπληνεκτομής συνοδεύεται από αύξηση των βιοχημικών δεικτών αιμοσιδήρωσης: φερριτίνης ( $p < 0,0001$ ), σιδήρου ( $p < 0,000001$ ), κορεσμού τρανσφερρίνης ( $p < 0,00001$ ) και NTBI ( $p < 0,001$ ). Η ανακατανομή του σιδήρου μετά την σπληνεκτομή επιβαρύνει το ήπαρ όπως καταδεικνύεται από την ανεύρεση αυξημένων τιμών ηπατικού T2\* ( $p = 0,03$ ) και το διπλασιασμό της τιμής του LIC ( $p = 0,08$ ) στους σπληνεκτομημένους ασθενείς. Η ύπαρξη HFE μεταλλάξεων σε ασθενείς ηλικίας  $\leq 30$  ετών συσχετίστηκε με αυξημένες τιμές φερριτίνης ( $p = 0,025$ ) και TIBC ( $p = 0,002$ ).

Από τα αποτελέσματα της μελέτης και σε συμφωνία με αντίστοιχα ευρήματα άλλων μελετών φαίνεται ότι η φερριτίνη δεν αποτελεί ακριβή δείκτη του συνολικού ποσού σιδήρου. Αντιθέτως εκτιμά πολύ καλά την εναπόθεση σιδήρου στο ήπαρ όπως αποδεικνύεται από την ισχυρή συσχέτιση με το ηπατικό T2\* ( $p < 0,0002$ ) και την τιμή του LIC ( $p < 0,0001$ ).

Ο υπολογισμός του NTBI μπορεί επίσης να βοηθήσει στον προσδιορισμό των επιπέδων στο ήπαρ αφού όπως φάνηκε στους αμετάγγιστους ασθενείς είναι ανεξάρτητος από την ηλικία και συσχετιζόταν ισχυρά με τους λογάριθμους της φερριτίνης ( $p = 0,0047$ ), της LIC ( $p = 0,001$ ) και του ηπατικού T2\* ( $p = 0,0006$ ).

Παρά το γεγονός ότι η μέτρηση της φερριτίνης αποτελεί την πιο εύκολη και ευρέως διαδεδομένη μέθοδο θα πρέπει στα πλαίσια της παρακολούθησης του βαθμού αιμοσιδήρωσης των ασθενών με EMA να συνοδεύεται από εκτίμηση άλλων παραμέτρων όπως η LIC και οι χρόνοι T2\* του ήπατος και της καρδιάς μέσω MRI. Η συνδυασμένη διαγνωστική προσπέλαση με τη χρήση των κλασσικών βιοχημικών μεθόδων, του NTBI και της μαγνητικής τομογραφίας μπορεί να εκτιμήσει με πολύ μεγαλύτερη ακρίβεια το βαθμό αιμοσιδήρωσης των ασθενών με EMA και να συμβάλλει στην απόφαση έγκαιρης έναρξης μεταγγίσεων ή/και θεραπείας αποσιδήρωσης.

Στα πλαίσια της αντιμετώπισης των ασθενών με EMA, η χορήγηση του νεώτερου χηλικού παράγοντα Deferasirox φαίνεται να είναι ασφαλής, συνοδεύεται από υψηλή συμμόρφωση και δίνει εξαιρετικά αποτελέσματα στη μείωση του ισοζυγίου σιδήρου στον οργανισμό σε προσαρμοσμένη δοσολογική χορήγηση. Στους αμετάγγιστους ασθενείς της μελέτης καταγράφηκε μείωση της τιμής της φερριτίνης μετά από 12 μήνες (μέση τιμή:  $634,5 \pm 396,9$   $\mu\text{g/L}$ , μέση μείωση  $519,5$   $\mu\text{g/L}$ ,  $p = 0,016$ ) ενώ ανάλογο ήταν το αποτέλεσμα και στους μεταγγισμένους (μέση τιμή:  $854,3 \pm 660,8$   $\mu\text{g/L}$ , μέση μείωση  $723,0$   $\mu\text{g/L}$ ,  $p = 0,004$ ). Το αποτέλεσμα της θεραπείας στους αμετάγγιστους ασθενείς φαίνεται ότι είναι δόσοεξαρτώμενο. Σε όλους εκτός ενός από τους αμετάγγιστους ασθενείς, η μείωση της LIC που επιτεύχθηκε ένα χρόνο μετά την

έναρξη της αγωγής ήταν  $>3\text{mg Fe/g}$  ξηρού ιστού ( $8,9 \pm 7,9 \text{ mg Fe/g}$  ξηρού ιστού). Ανάλογα ικανοποιητικά ήταν τα αποτελέσματα της αποσιδήρωσης και στους μεταγγισμένους ασθενείς όπου η μείωση έφτασε τα  $10,9 \pm 9,9 \text{ mg Fe/g}$  ξηρού ιστού. Ο στόχος της μείωσης του επιπέδου LIC  $<7\text{mg Fe/g}$  ξηρού ιστού επιτεύχθηκε σε 2 αμετάγγιστους ασθενείς και σε άλλους 3 μεταγγισμένους μετά από ένα χρόνο χορήγησης του φαρμάκου. Περαιτέρω βελτίωση θα μπορούσε ενδεχομένως να καταγραφεί με τη χορήγηση υψηλότερων δόσεων ή τη συνέχιση της αγωγής για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**Γενικά:** Οι ασθενείς με ενδιάμεση μεσογειακή αναιμία παρά την ήπια κλινική εικόνα τους και τη μη ανάγκη συστηματικών μεταγγίσεων παρουσιάζουν αξιόλογη αιμοσιδήρωση.

**Σκοπός:** Σκοπός της μελέτης ήταν η καταγραφή του επιπέδου αιμοσιδήρωσης σε ικανό πληθυσμό ασθενών με EMA, η συσχέτιση του με τον κλινικό φαινότυπο και με άλλους επιβαρυντικούς παράγοντες και η διερεύνηση ικανοποιητικής θεραπείας αντιμετώπισης της αιμοσιδήρωσης.

**Μεθοδολογία:** Τα επίπεδα αιμοσιδήρωσης των ασθενών προσδιορίστηκαν με κλασσικές βιοχημικές παραμέτρους (φερριτίνη, σίδηρος, TIBC, κορεσμός τρανσφερρίνης), με νεώτερες όπως ο μη-δεσμευμένος με τρανσφερρίνη σίδηρος (NTBI) και μέσω MRI (LIC, ηπατικό T2\* και καρδιακό T2\*). Οι ασθενείς ταξινομήθηκαν σύμφωνα με τα διακριτά κριτήρια που χρησιμοποιεί η κλινική μας σε δύο κλινικούς φαινότυπους (I1 βαρύς και I2 ήπιος) και επίσης με βάση των αριθμό μεταγγίσεων σε αμετάγγιστους (συμπεριελήφθησαν ασθενείς με ευκαιριακές μεταγγίσεις) και σε ασθενείς που για κάποιο χρονικό διάστημα είχαν υποβληθεί σε συστηματικές μεταγγίσεις. Δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στην ηλικιακή σύνθεση των ομάδων και με τις δύο ταξινομήσεις γεγονός που επέτρεπε τις συγκρίσεις. Θεραπευτικά στους ασθενείς με τιμή φερριτίνης >450mg/L χορηγήθηκε από του στόματος ο νέος χηλικός παράγοντας Deferasirox, σε δόσεις 10 ή 20 mg/kg ΒΣ ανάλογα με την τιμή της φερριτίνης. Η επιτυχία της αγωγής εξετάστηκε μετά από ένα χρόνο με βάση τη μείωση της φερριτίνης, την επίτευξη μείωσης της συγκέντρωσης σιδήρου στο ήπαρ (LIC) κατά 3mg Fe/gr ξηρού ιστού και το συνολικό επίπεδο του LIC.

**Αποτελέσματα:** Μελετήθηκαν 70 ασθενείς (μέση ηλικία 23,1 ± 12,5 έτη) με κλινική εικόνα EMA, 67 (95,7%) με δυο μεταλλάξεις για β<sup>thal</sup> ή δβ γονίδια και 3 ετεροζυγώτες β-MA με συνύπαρξη τριπλασιασμένου α γόνου (ααα/αα ή ααα/ααα). Οι μεταλλάξεις στην πλειοψηφία τους (54,1%) ήταν β<sup>+</sup> (σιωπηρές, β<sup>++</sup> και β<sup>+</sup>). Η συχνότερη μετάλλαξη ήταν η IVSI-6 (19,1%) και ακολούθησαν οι IVSI-110 (12,5%), IVSI-1 (9,5%), -101 (8,1%), και οι CD39 και -87 (με 6,6% η καθεμία). Σε πολλές περιπτώσεις οι βιοχημικές παράμετροι βρέθηκαν σε παθολογικά επίπεδα και επίσης ψηλότερες στους ασθενείς με φαινότυπο (I1) όπως η φερριτίνη (p<0,001), ο σίδηρος (p<0,001), ο κορεσμός τρανσφερρίνης (p<0,01) και ο NTBI (p<0,0001). Η εναπόθεση Fe δεν ήταν ομοιογενής αφού 83,3% των αμετάγγιστων ασθενών παρουσίαζαν μέτρια ή βαριά ηπατική αιμοσιδήρωση (με βάση το ηπατικό T2\*) ενώ οι τιμές καρδιακού T2\* ήταν φυσιολογικές. Η τιμή της φερριτίνης δεν αποτελεί καλό δείκτη του συνολικού φορτίου Fe αλλά συσχετίζεται σημαντικά με το ηπατικό φορτίο όπως προσδιορίζεται από το ηπατικό T2\* (p<0,0002) και την LIC

( $p < 0,0001$ ). Καλός δείκτης ήταν και ο NTBI που στους αμετάγγιστους ασθενείς ήταν ανεξάρτητος από την ηλικία και συσχετιζόταν με τη φερριτίνη ( $p = 0,0047$ ), τη LIC ( $p = 0,001$ ) και τον ηπατικό T2\* ( $p = 0,0006$ ). Διάφοροι παράγοντες μπορεί να επιβαρύνουν το τελικό ισοζύγιο σιδήρου. Η ηλικία συσχετίστηκε με τη φερριτίνη ( $p = 0,0001$ ). Η σπληνεκτομή αυξάνει το φορτίο Fe στο ήπαρ [συσχέτιση με φερριτίνη ( $p < 0,0001$ ) και NTBI ( $p < 0,001$ )]. Ασθενείς με μια  $\beta^{sil}$  μετάλλαξη είχαν γενικά χαμηλότερες τιμές φερριτίνης και NTBI από εκείνους με  $\beta^0$  και  $\delta\beta$  μεταλλάξεις. Η ύπαρξη HFE μεταλλάξεων σε ασθενείς ηλικίας  $\leq 30$  ετών συσχετίστηκε με αυξημένες τιμές φερριτίνης ( $p = 0,025$ ), και TIBC ( $p = 0,002$ ). Η θεραπευτική αντιμετώπιση με Deferasirox απέφερε στους αμετάγγιστους ασθενείς μετά από 1 έτος αγωγής σημαντική μείωση της φερριτίνης (μέση μείωση 519,5  $\mu\text{g/L}$ ,  $p = 0,016$ ) και σε όλους πλην ενός ασθενούς μείωση της LIC  $> 3\text{mg Fe/gr}$  ξηρού ιστού ( $8,9 \pm 7,9 \text{ mg Fe/gr}$  ξηρού ιστού).

**Συμπεράσματα:** Η μελέτη απέδειξε τη σημαντική αιμοσιδήρωση που προοδευτικά παρουσιάζει μεγάλο ποσοστό των Ελλήνων ασθενών με EMA. Το φορτίο σιδήρου συσχετίζεται με τον κλινικό φαινότυπο των ασθενών και επιβαρύνεται από διάφορους παράγοντες όπως η ηλικία, η σπληνεκτομή, οι HFE μεταλλάξεις. Στην παρακολούθηση του βαθμού αιμοσιδήρωσης των ασθενών με EMA αποδεικνύεται ότι η φερριτίνη δεν αποτελεί ακριβή δείκτη του συνολικού ποσού σιδήρου και θα πρέπει να συνοδεύεται από εκτίμηση άλλων παραμέτρων όπως η LIC και οι χρόνοι T2\* του ήπατος και της καρδιάς με MRI. Η θεραπεία με τον νεώτερο από του στόματος χηλικό παράγοντα Deferasirox φαίνεται να είναι ασφαλής, διευκολύνει την υψηλή συμμόρφωση και δίνει εξαιρετικά αποτελέσματα στη μείωση του φορτίου σιδήρου στον οργανισμό σε προσαρμοσμένη δοσολογική χορήγηση.

## Summary

**Background:** Patients with thalassemia intermediate (TI) exhibit significant hemosiderosis despite mild clinical presentation and the lack of need for systematic transfusions.

**Aim:** Aim of the study was to record iron levels in a large population with TI, correlate findings with clinical phenotype and other modifying factors and in addition to investigate a satisfactory treatment.

**Methods:** Haemosiderosis levels were evaluated by standard biochemical parameters (serum ferritin, iron, TIBC, transferrin saturation), by newer ones like non-transferrin bound iron (NTBI) and by MRI (LIC, liver T2\* and heart T2\*). Patients were classified according to the distinct criteria used in our clinic, in two clinical phenotypes (I1 heavy and I2 mild) and also according to the number of transfusions to untransfused (including patients with opportunistic transfusions) and patients who had been for a period of time on systematic transfusions. There was no statistically significant difference in the age distribution of the groups in both rankings which allowed for comparisons. Therapeutically in patients with serum ferritin > 450mg/L the new chelator Deferasirox was orally administered, at doses of 10 or 20 mg/kg BW based on serum ferritin value. Treatment success was evaluated after a year's time based on the reduction of serum ferritin, the reduction of liver iron concentration (LIC) by 3mg Fe/gr of dry tissue and the total LIC level.

**Results:** A total of 70 patients (mean age 23.1 ± 12.5 years) with clinical presentation of TI were studied, 67 (95.7%) with 2 mutations of  $\beta^{\text{thal}}$  or  $\delta\beta$  genes and 3 heterozygotes of  $\beta$ -thalassemia with co inheritance of a triplicated  $\alpha$  gene ( $\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha$  or  $\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$ ). The majority (54.1%) of mutations were  $\beta^+$  (silent,  $\beta^{++}$  and  $\beta^+$ ). The most frequent mutation was IVSI-6 (19.1%), followed by IVSI-110 (12.5%), IVSI-1 (9.5%), -101 (8.1%), and CD39 and -87 (with 6.6% each). In many cases the levels of biochemical parameters were found above normal and were also higher in patients with I1 phenotype, like serum ferritin ( $p < 0.001$ ), iron ( $p < 0.001$ ), transferrin saturation ( $p < 0.01$ ) and NTBI ( $p < 0.0001$ ). The iron deposition was not homogeneous since 83.3% of untransfused patients had moderate to severe hepatic haemosiderosis (based on hepatic T2\* values) while cardiac T2\* values were normal. The value of serum ferritin is not a good marker of total body iron load but strongly correlates with the hepatic load as determined by hepatic T2\* ( $p < 0.0002$ ) and LIC ( $p < 0.0001$ ). NTBI was also a good marker as in untransfused patients was independent of age and correlated with serum ferritin ( $p = 0.0047$ ), LIC ( $p = 0.001$ ) and liver T2\* ( $p = 0.0006$ ). Several factors can aggravate the final iron balance. Age correlated with serum ferritin ( $p = 0.0001$ ). Splenectomy increases the liver iron load [correlation with

serum ferritin ( $p < 0.0001$ ) and NTBI ( $p < 0.001$ )]. Patients with a  $\beta^{sil}$  mutation generally have lower serum ferritin and NTBI values than those with  $\beta^0$  and  $\delta\beta$  mutations. The presence of HFE mutations in patients aged  $\leq 30$  years correlated with increased values of serum ferritin ( $p = 0.025$ ), and TIBC ( $p = 0.002$ ). Treatment of untransfused patients with Deferasirox resulted, after 1 year of treatment, in a significant decrease of serum ferritin (mean decrease 519.5 mg/L,  $p = 0.016$ ) and in all but one patient to a reduction of LIC  $> 3$  mg Fe/gr of dry tissue ( $8.9 \pm 7.9$  mg Fe/gr dry tissue).

**Conclusions:** The study demonstrated the significant haemosiderosis that is progressively presented by a large proportion of Greek TI patients. Iron load correlates with clinical phenotype and is aggravated by various factors such as age, splenectomy and HFE mutations. In monitoring the degree of haemosiderosis of TI patients, it was demonstrated that serum ferritin is not an accurate marker of total body iron load and should be accompanied by evaluation of other parameters such as LIC, liver T2\* and heart T2\* with MRI. Treatment with the new oral chelator Deferasirox appears to be safe, facilitates high compliance and gives excellent results in the reduction of iron burden with individually adjusted dosage administration.



## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Aessopos A, Farmakis D, Karagiorga M, Voskaridou E, Loutradi A, Hatziliami A, Joussef J, Rombos J, Loukopoulos D. (2001) Cardiac involvement in thalassemia intermedia: a multicenter study. *Blood.* , 97(11):3411-6.
2. Aessopos A, Farmakis D, Deftereos S, Tsironi M, Polonifi A, Moysakis I, Diamanti-Kandaraki E, Papalambros E. (2005a) Cardiovascular effects of splenomegaly and splenectomy in beta-thalassemia. *Ann Hematol.* , 84(6):353-7.
3. Aessopos A, Farmakis D, Deftereos S, Tsironi M, Tassiopoulos S, Moysakis I, Karagiorga M. (2005b) Thalassemia heart disease: a comparative evaluation of thalassemia major and thalassemia intermedia. *Chest.* , 127(5):1523-30.
4. Aessopos A, Kati M, Farmakis D. (2007a) Heart disease in thalassemia intermedia: a review of the underlying pathophysiology. *Haematologica.*, 92(5):658-65.
5. Aessopos A, Kati M, Meletis J. (2007b) Thalassemia intermedia today: should patients regularly receive transfusions? *Transfusion.*, 47(5):792-800.
6. Aisen P, Enns C, Wessling-Resnick M. (2001) Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int J Biochem Cell Biol.* , 33(10):940-59.
7. Anderson LJ, Holden S, Davis B, Prescott E, Charrier CC, Bunce NH, Firmin DN, Wonke B, Porter J, Walker JM, Pennell DJ. (2001) Cardiovascular T2-star (T2\*) magnetic resonance for the early diagnosis of myocardial iron overload. *Eur Heart J.* , 22(23):2171-9.
8. Andrews NC. (1999) Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med.*; 341(26): 1986-95.
9. Andrews NC. (2004) Probing the iron pool. Focus on "Detection of intracellular iron by its regulatory effect". *Am J Physiol Cell Physiol.* , 287(6):C1537-8
10. Andrews NC. (2008) Forging a field: the golden age of iron biology. *Blood.* , 112(2):219-30.
11. Antonarakis SE, Kazazian HH Jr, Orkin SH. (1985) DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene clusters. *Hum Genet.*, 69(1):1-14.

12. Antonarakis SE, Irkin SH, Cheng TC, Scott AF, Sexton JP, Trusko SP, Charache S, Kazazian HH Jr. (1984) beta-Thalassemia in American Blacks: novel mutations in the "TATA" box and an acceptor splice site. *Proc Natl Acad Sci USA.* , 81(4):1154-8.
13. Arthur MJ. (1996) Iron overload and liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol.* ,11(12):1124-9.
14. Atweh GF, Loukopoulos D. (2001) Pharmacological induction of fetal hemoglobin in sickle cell disease and beta-thalassemia. *Semin Hematol.* , 38(4):367-73.
15. Aziz N, Munro HN. (1987) Iron regulates ferritin mRNA translation through a segment of its 5' untranslated region. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 84(23):8478-82.
16. Babitt JL, Huang FW, Wrighting DM, Xia Y, Sidis Y, Samad TA, Campagna JA, Chung RT, Schneyer AL, Woolf CJ, Andrews NC, Lin HY. (2006) Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat Genet.* , 38(5):531-9.
17. Bacon BR, Powell LW, Adams PC, Kresina TF, Hoofnagle JH. (1999) Molecular medicine and hemochromatosis: at the crossroads. *Gastroenterology.* , 116(1): 193-207.
18. Baklouti F, Dorléac E, Morlé L, Laselve P, Peyramond D, Aubry M, Godet J, Delaunay J. (1986) Homozygous hemoglobin Knossos (alpha 2 beta 227(B9) Ala----Ser): a new variety of beta (+)-thalassemia intermedia associated with delta (0)-thalassemia. *Blood.* , 67(4):957-61.
19. Bank A. (2005) Understanding globin regulation in b-thalassemia: it's as simple as  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , and  $\delta$ . *J. Clin. Invest.* , 115:1470–1473.
20. Bohl D, Bosch A, Cardona A, Salvetti A, Heard JM. (2000) Improvement of erythropoiesis in beta-thalassemic mice by continuous erythropoietin delivery from muscle. *Blood.* , 95(9):2793-8.
21. Borgna-Pignatti C, Vergine G, Lombardo T, Cappellini MD, Cianciulli P, Maggio A, Renda D, Lai ME, Mandas A, Forni G, Piga A, Bisconte MG. (2004) Hepatocellular carcinoma in the thalassaemia syndromes. *Br J Haematol.* , 124(1):114-7.
22. Borgna-Pignatti C, Cappellini MD, De Stefano P, Del Vecchio GC, Forni GL, Gamberini MR, Ghilardi R, Piga A, Romeo MA, Zhao H, Cnaan A. (2006) Cardiac morbidity and mortality in deferoxamine- or deferiprone-treated patients with thalassemia major. *Blood.* , 107(9):3733-7.

23. Borgna-Pignatti C. (2007) Modern treatment of thalassaemia intermedia. *Br J Haematol.* , 138(3):291-304.
24. Bourantas K, Economou G, Georgiou J. (1997) Administration of high doses of recombinant human erythropoietin to patients with beta-thalassaemia intermedia: a preliminary trial. *Eur J Haematol.* , 58(1):22-5.
25. Breuer W, Ronson A, Slotki IN, Abramov A, Hershko C, Cabantchik ZI. (2000a) The assessment of serum nontransferrin-bound iron in chelation therapy and iron supplementation. *Blood.* , 95(9):2975-82.
26. Breuer W, Hershko C, Cabantchik ZI. (2000b) The importance of non-transferrin bound iron in disorders of iron metabolism. *Transfus Sci.* , 23(3): 185-92.
27. Bridle KR, Frazer DM, Wilkins SJ, Dixon JL, Purdie DM, Crawford DH, Subramaniam VN, Powell LW, Anderson GJ, RammGA. (2003) Disrupted hepcidin regulation in HFE-associated haemochromatosis and the liver as a regulator of body iron homeostasis. *Lancet.*; 361: 669–673.
28. Brittenham GM, Griffith PM, Nienhuis AW, McLaren CE, Young NS, Tucker EE, Allen CJ, Farrell DE, Harris JW. (1994) Efficacy of deferoxamine in preventing complications of iron overload in patients with thalassaemia major. *N Engl J Med.* , 331(9):567-73.
29. Cabantchik ZI, Breuer W, Zanninelli G, Cianciulli P. (2005) LPI-labile plasma iron in iron overload. *Best Practice & Research Clinical Haematology.*, 18:277–287.
30. Cairo G, Recalcati S. (2007) Iron-regulatory proteins: molecular biology and pathophysiological implications. *Expert Rev Mol Med.* ;9(33):1-13.
31. Camaschella C, Alfarano A, Gottardi E, Serra A, Revello D, Saglio G. (1990) The homozygous state for the -87 C---G beta + thalassaemia. *Br J Haematol.*, 75(1):132-3.
32. Camaschella C, Mazza U, Roetto A, Gottardi E, Parziale A, Travi M, Fattore S, Bacchiega D, Fiorelli G, Cappellini MD. (1995) Genetic interactions in thalassaemia intermedia: analysis of beta-mutations, alpha-genotype, gamma-promoters, and beta-LCR hypersensitive sites 2 and 4 in Italian patients. *Am J Hematol.* ,48(2):82-7.
33. Camaschella C, Cappellini MD. (1995) Thalassaemia intermedia. *Haematologica.* , 80(1):58-68.
34. Camaschella C, Kattamis AC, Petroni D, Roetto A, Sivera P, Sbaiz L, Cohen A, Ohene-Frempong K, Trifillis P, Surrey S, Fortina P. (1997) Different hematological phenotypes caused by the interaction of

- triplicated alpha-globin genes and heterozygous beta-thalassemia. *Am J Hematol.* , 55(2):83-8.
35. Cao A, Galanello R, Furbetta M, Muroi PP, Garbato L, Rosatelli C, Scalas MT, Addis M, Ruggeri R, Maccioni L, Melis MA. (1978) Thalassaemia types and their incidence in Sardinia. *J Med Genet.* , 15(6):443-7.
  36. Cao A. (1988) Diagnosis of beta-thalassemia intermedia at presentation. *Birth Defects Orig Artic Ser.* , 23(5B):219-26.
  37. Cao A, Gossens M, Pirastu M. (1989) Beta thalassaemia mutations in Mediterranean populations. *Br J Haematol.* , 71(3):309-12.
  38. Cao A, Galanello R, Rosatelli MC. (1994) Genotype-phenotype correlations in beta-thalassemias. *Blood Rev.* , 8(1):1-12.
  39. Cappellini MD. (2002) The adult thalassaemic patient. 7<sup>th</sup> Congress of the European Hematology Association, Educational programme, pp. 65-69.
  40. Cappellini MD. (2005) Overcoming the challenge of patient compliance with iron chelation therapy. *Semin Hematol.* , 42(2 Suppl 1):S19-21.
  41. Cappellini MD, Cohen A, Piga A, Bejaoui M, Perrotta S, Agaoglu L, Aydinok Y, Kattamis A, Kilinc Y, Porter J, Capra M, Galanello R, Fattoum S, Drelichman G, Magnano C, Verissimo M, Athanassiou-Metaxa M, Giardina P, Kourakli-Symeonidis A, Janka-Schaub G, Coates T, Vermynen C, Olivieri N, Thuret I, Opitz H, Ressayre-Djaffer C, Marks P, Alberti D. (2006) A phase 3 study of deferasirox (ICL670), a once-daily oral iron chelator, in patients with beta-thalassemia. *Blood.* ;107(9):3455-62.
  42. Cappellini MD, Cohen A, Eleftheriou A, Piga A, Porter J, Taher A. Guidelines for the Clinical Management of Thalassaemia. 2nd rev. ed. NicosiaCyprus: Thalassaemia International Federation; 2008.
  43. Chaidos A, Makis A, Hatzimichael E, Tsiara S, Gouva M, Tzouvara E, Bourantas KL. (2004) Treatment of beta-thalassemia patients with recombinant human erythropoietin: effect on transfusion requirements and soluble adhesion molecules. *Acta Haematol.* , 111(4):189-95.
  44. Chakalova L, Osborne CS, Dai YF, Goyenechea B, Metaxotou-Mavromati A, Kattamis A, Kattamis C, Fraser P. (2005) The Corfu deltabeta thalassemia deletion disrupts gamma-globin gene silencing and reveals post-transcriptional regulation of HbF expression. *Blood.* , 105(5):2154-60.
  45. Collins FS, Weissman SM. (1984) The molecular genetics of human hemoglobin. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* , 31:315-462.

46. Conrad ME, Benjamin BI, Williams HL, Foy AL. (1967) Human absorption of hemoglobin-iron. *Gastroenterology.* , 53(1):5-10.
47. Cook JD, Barry WE, Hershko C, Fillet G, Finch CA. (1973) Iron kinetics with emphasis on iron overload. *Am J Pathol.* , 72(2):337-44.
48. Cossu P, Toccafondi C, Vardeu F, Sanna G, Frau F, Lobrano R, Cornacchia G, Nucaro A, Bertolino F, Loi A, De Virgiliis S, Cao A. (1981) Iron overload and desferrioxamine chelation therapy in beta-thalassemia intermedia. *Eur J Pediatr.* , 137(3):267-71.
49. Craven CM, Alexander J, Eldridge M, Kushner JP, Bernstein S, Kaplan J. (1987) Tissue distribution and clearance kinetics of non-transferrin-bound iron in the hypotransferrinemic mouse: a rodent model for hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* , 84(10): 3457–3461.
50. Crichton RR. (1971) Ferritin: structure, synthesis and function. *N Engl J Med.*;24;284(25):1413-22.
51. Cumming RL, Millar JA, Smith JA, Goldberg A. (1969) Clinical and laboratory studies on the action of desferrioxamine. *Br J Haematol.* , 17(3):257-63.
52. Daar S, Pathare A, Nick H, Kriemler-Krahn U, Hmissi A, Habr D, Taher A. (2009) Reduction in labile plasma iron during treatment with deferasirox, a once-daily oral iron chelator, in heavily iron-overloaded patients with b-thalassaemia *Eur J Haematol.* ; 82:454-457
53. De Domenico I, Ward DM, di Patti MC, Jeong SY, David S, Musci G, Kaplan J. (2007) Ferroxidase activity is required for the stability of cell surface ferroportin in cells expressing GPI-ceruloplasmin. *EMBO J.* , 26(12):2823-31.
54. de Onis M, Onyango AW, Borghi E, Siyam A, Nishida C, Siekmann J. (2007) Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. *Bull World Health Organ.* , 85(9):660-7.
55. De Stefano P, Zecca M, Giorgiani G, Perotti C, Giraldi E, Locatelli F. (1999) Resolution of immune haemolytic anaemia with allogeneic bone marrow transplantation after an unsuccessful autograft. *Br J Haematol.* , 106(4):1063-4.
56. Dixit A, Chatterjee TC, Mishra P, Choudhry DR, Mahapatra M, Tyagi S, Kabra M, Saxena R, Choudhry VP. (2005) Hydroxyurea in thalassemia intermedia--a promising therapy. *Ann Hematol.* , 84(7):441-6.
57. Eder AF, Chambers LA. (2007) Noninfectious complications of blood transfusion. *Arch Pathol Lab Med.* , 131:708-718.

58. Efremov DG, Dimovski AJ, Baysal E, Ye Z, Adekile AD, Ribeiro ML, Schiliro G, Altay C, Gürgey A, Efremov GD, et al. (1994) Possible factors influencing the haemoglobin and fetal haemoglobin levels in patients with beta-thalassaemia due to a homozygosity for the IVS-I-6 (T-->C) mutation. *Br J Haematol.* , 86(4):824-30.
59. Esposito BP, Breuer W, Sirankapracha P, Pootrakul P, Hershko C, Cabantchik ZI. (2003) Labile plasma iron in iron overload: redox activity and susceptibility to chelation. *Blood.* ;102(7):2670-7.
60. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, Dormishian F, Domingo R Jr, Ellis MC, Fullan A, Hinton LM, Jones NL, Kimmel BE, Kronmal GS, Lauer P, Lee VK, Loeb DB, Mapa FA, McClelland E, Meyer NC, Mintier GA, Moeller N, Moore T, Morikang E, Prass CE, Quintana L, Starnes SM, Schatzman RC, Brunke KJ, Drayna DT, Risch NJ, Bacon BR, Wolff RK. (1996) A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet.* ;13(4):399-408.
61. Fessas P. (1983) The Heterogeneity of thalassemia. Proc 11<sup>th</sup> Intl Cong ISH, Grune and Stratton, New York, 52-58.
62. Fessas P, Loukopoulos D, Kokkinou S, Papatotiriou Y, Karaklis A. (1986) Hemoglobin Knossos: a clinical, laboratory, and epidemiological study. *Am J Hematol.* , 21(2):119-33.
63. Fiorelli G, Fargion S, Piperno A, Battafarano N, Cappellini MD. (1990) Iron metabolism in thalassemia intermedia. *Haematologica.* , 75 Suppl 5:89-95.
64. Fisher JW. (2003) Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp Biol Med (Maywood).* , 228(1):1-14.
65. Fischer R, Longo F, Nielsen P, Engelhardt R, Hider RC, Piga A. (2003) Monitoring long-term efficacy of iron chelation therapy by deferiprone and desferrioxamine in patients with beta-thalassaemia major: application of SQUID biomagnetic liver susceptometry. *Br J Haematol.* , 121(6):938-48.
66. Frazer DM, Inglis HR, Wilkins SJ, Millard KN, Steele TM, McLaren GD, McKie AT, Vulpe CD, Anderson GJ. (2004) Delayed hepcidin response explains the lag period in iron absorption following a stimulus to increase erythropoiesis. *Gut.* ;53(10):1509-15.
67. Galanello R, Ruggeri R, Paglietti E, Addis M, Melis MA, Cao A. (1983) A family with segregating triplicated alpha globin loci and beta thalassemia. *Blood.* , 62(5):1035-40.

68. Galanello R, Dessi E, Melis MA, Addis M, Sanna MA, Rosatelli C, Argiolu F, Giagu N, Turco MP, Cacace E, et al. (1989) Molecular analysis of beta zero-thalassemia intermedia in Sardinia. *Blood.* , 74(2):823-7.
69. Galanello R, Melis MA, Podda A, Monne M, Perseu L, Loudianos G, Cao A, Pirastu M, Piga A. (1990) Deletion delta-thalassemia: the 7.2 kb deletion of Corfu delta beta-thalassemia in a non-beta-thalassemia chromosome. *Blood.* , 75(8):1747-9.
70. Galanello R, Kattamis A, Piga A, Fischer R, Leoni G, Ladis V, Voi V, Lund U, Tricta F. (2006) A prospective randomized controlled trial on the safety and efficacy of alternating deferoxamine and deferiprone in the treatment of iron overload in patients with thalassemia. *Haematologica.*, 91(9):1241-3.
71. Ganz T, Nemeth E. (2006) Regulation of iron acquisition and iron distribution in mammals. *Biochim Biophys Acta.* ;1763(7):690-9.
72. Georgiou I, Makis A, Chaidos A, Bouba I, Hatzi E, Kranas V, Zilidis C, Bourantas KL. (2003) Distribution and frequency of beta-thalassemia mutations in northwestern and central Greece. *Eur J Haematol.*, 70(2):75-8.
73. Glickstein H, Ben El R, Shvartsman M, Cabantchik ZI. (2005) Intracellular labile iron pools as direct targets of iron chelators: a fluorescence study of chelator action in living cells. *Blood.* 2005;106:3242-3250.
74. Glickstein H, El RB, Link G, Breuer W, Konijn AM, Hershko C, Nick H, Cabantchik ZI. (2006) Action of chelators in iron-loaded cardiac cells: Accessibility to intracellular labile iron and functional consequences. *Blood.* , 108(9):3195-203.
75. Gonzalez-Redondo JM, Stoming TA, Kutlar A, Kutlar F, Lanclos KD, Howard EF, Fei YJ, Aksoy M, Altay C, Gurgey A, et al. (1989) A C----T substitution at nt--101 in a conserved DNA sequence of the promotor region of the beta-globin gene is associated with "silent" beta-thalassemia. *Blood.* , 73(6):1705-11.
76. Gratwick GM, Bullough PG, Bohne WH, Markenson AL, Peterson CM. (1978) Thalassaemic osteoarthropathy. *Ann Intern Med.*, 88(4):494-501.
77. Grosveld F, Dillon N, Higgs D. (1993) The regulation of human globin gene expression. *Baillieres Clin Haematol.* , 6(1):31-55.

78. Harrison PM, Arosio P. (1996) The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta.*, 1275(3): 161-203.
79. Hentze MW, Rouault TA, Caughman SW, Dancis A, Harford JB, Klausner RD. (1987a) A cis-acting element is necessary and sufficient for translational regulation of human ferritin expression in response to iron. *Proc Natl Acad Sci USA.* , 84(19):6730-4.
80. Hentze MW, Caughman SW, Rouault TA, Barriocanal JG, Dancis A, Harford JB, Klausner RD. (1987b) Identification of the iron-responsive element for the translational regulation of human ferritin mRNA. *Science.* , 238(4833):1570-3.
81. Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC. (2004) Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell.* , 117(3):285-97.
82. Hershko C, Graham G, Bates GW, Rachmilewitz EA. (1978) Non-specific serum iron in thalassaemia: an abnormal serum iron fraction of potential toxicity. *Br J Haematol.* , 40(2):255-63.
83. Hershko C, Konijn AM, Link G. (1998a) Iron chelators for thalassaemia. *Br J Haematol.* , 101(3):399-406.
84. Hershko C, Link G, Cabantchik I. (1998b) Pathophysiology of iron overload. *Ann N Y Acad Sci.* , 850:191-201.
85. Hershko C, Cappellini MD, Galanello R, Piga A, Tognoni G, Masera G. (2004) Purging iron from the heart. *Br J Haematol.* , 125(5):545-51.
86. Hershko C. (2006) Oral iron chelators: new opportunities and new dilemmas. *Haematologica.*, 91(10):1307-12.
87. Higgs DR. (1993) alpha-Thalassaemia. *Baillieres Clin Haematol.* , 6(1):117-50.
88. Ho PJ, Hall GW, Luo LY, Weatherall DJ, Thein SL. (1998) Beta-thalassaemia intermedia: is it possible consistently to predict phenotype from genotype? *Br J Haematol.* , 100(1):70-8.
89. Hunter HN, Fulton DB, Ganz T, Vogel HJ. (2002) The solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis. *J Biol Chem.* , 277(40):37597-603.
90. Ikuta K, Fujimoto Y, Suzuki Y, Tanaka K, Saito H, Ohhira M, Sasaki K, Kohgo Y. (2000) Overexpression of hemochromatosis protein, HFE,



alters transferrin recycling process in human hepatoma cells. *Biochim Biophys Acta.* ;1496(2-3):221-31.

91. Inati A, Zeineh N, Isma'eel H, Koussa S, Gharzuddine W, Taher A. (2006) Beta-thalassemia: the Lebanese experience. *Clin Lab Haematol.* , 28(4):217-27.
92. Israel L, Israel E. (2003) Erythropoiesis: an overview In: Molineux G, Foote MA, Elliott SG eds. Erythropoietins and Erythropoiesis: molecular, cellular, preclinical and clinical biology. Birkhauser Verlag/Switzerland, 3-14.
93. Jakeman A, Thompson T, McHattie J, Lehotay DC. (2001) Sensitive method for nontransferrin-bound iron quantification by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Clin Biochem.* , 34(1):43-7.
94. Jelkmann W. (2004) Molecular biology of erythropoietin. *Intern Med.* , 43(8): 649-59.
95. Jensen PD. (2004) Evaluation of iron overload. *Br J Haematol.* , 124(6):697-711.
96. Kanavakis E, Metaxotou-Mavromati A, Kattamis C, Wainscoat JS, Wood WG. (1983) The triplicated alpha gene locus and beta thalassaemia. *Br J Haematol.* , 54(2):201-7.
97. Kanavakis E, Tzotzos S, Liapaki A, Metaxotou-Mavromati A, Kattamis C. (1986) Frequency of alpha-thalassemia in Greece. *Am J Hematol.* , 22(3):225-32.
98. Kanavakis E, Traeger-Synodinos J, Tzetis M, Metaxotou-Mavromati A, Ladis V, Kattamis C. (1995) Molecular characterization of homozygous (high HbA<sub>2</sub>) beta-thalassemia intermedia in Greece. *Pediatr Hematol Oncol.* , 2(1):37-45.
99. Kanavakis E, Traeger-Synodinos J, Papasotiriou I, Vrettou C, Metaxotou-Mavromati A, Stamoulakatou A, Lagona E, Kattamis C. (1996) The interaction of alpha zero thalassaemia with Hb Icaria: three unusual cases of haemoglobinopathy H. *Br J Haematol.* , 92(2):332-5.
100. Kanavakis E, Traeger-Synodinos J, Vrettou C, Maragoudaki E, Tzetis M, Kattamis C. (1997) Prenatal diagnosis of the thalassaemia syndromes by rapid DNA analytical methods. *Mol Hum Reprod.* , 3(6):523-8.
101. Kanavakis E, Papassotiriou I, Karagiorga M, Vrettou C, Metaxotou-Mavromati A, Stamoulakatou A, Kattamis C, Traeger-Synodinos J. (2000) Phenotypic and molecular diversity of haemoglobin H disease: a Greek experience. *Br J Haematol.* , 111(3):915-23.

102. Kanavakis E, Traeger-Synodinos J, Lafioniatis S, Lazaropoulou C, Liakopoulou T, Paleologos G, Metaxotou-Mavrommati A, Stamoulakatou A, Papassotiriou I. (2004) A rare example that coinheritance of a severe form of beta-thalassemia and alpha-thalassemia interact in a "synergistic" manner to balance the phenotype of classic thalassaemic syndromes. *Blood Cells Mol Dis.* , 32(2):319-24.
103. Kaptain S, Downey WE, Tang C, Philpott C, Haile D, Orloff DG, Harford JB, Rouault TA, Klausner RD. (1991) A regulated RNA binding protein also possesses aconitase activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* , 88(22):10109-13.
104. Karimi M, Darzi H, Yavarian M. (2005) Hematologic and clinical responses of thalassemia intermedia patients to hydroxyurea during 6 years of therapy in Iran. *J Pediatr Hematol Oncol.* , 27(7):380-5.
105. Kattamis A. (2005) Combined therapy with deferoxamine and deferiprone. *Ann N Y Acad Sci.* , 1054:175-82.
106. Kattamis C, Metaxotou-Mavromati A, Wood WG, Nash JR, Weatherall DJ. (1979) The heterogeneity of normal Hb A2-beta thalassaemia in Greece. *Br J Haematol.* , 42(1):109-23.
107. Kattamis C, Metaxotou-Mavromati A, Tsiarta E, Metaxatou C, Wasi P, Wood WG, Pressley L, Higgs DR, Clegg JB, Weatherall DJ. (1980) Haemoglobin Bart's hydrops syndrome in Greece. *BMJ.* , 281(6235):268-70.
108. Kattamis C, Metaxotou-Mavromati A, Ladis V, Tsiarta H, Laskari S, Kanavakis E. (1982) The clinical phenotype of beta and delta beta thalassaemias in Greece. *Eur J Pediatr.* , 139(2):135-8.
109. Kattamis C, Tzotzos S, Kanavakis E, Synodinos J, Metaxotou-Mavrommati A. (1988) Correlation of clinical phenotype to genotype in haemoglobin H disease. *Lancet.* , 1(8583):442-4.
110. Kattamis C, Hu H, Cheng G, Reese AL, Gonzalez-Redondo JM, Kutlar A, Kutlar F, Huisman TH. (1990a) Molecular characterization of beta-thalassaemia in 174 Greek patients with thalassaemia major. *Br J Haematol.* , 74(3):342-6.
111. Kattamis A, Papassotiriou I, Palaiologou D, Apostolakou F, Galani A, Ladis V, Sakellaropoulos N, Papanikolaou G. (2006) The effects of erythropoietic activity and iron burden on hepcidin expression in patients with thalassemia major. *Haematologica.* , 91(6):809-12.

112. Kattamis C. (1992) Genotypes and clinical and hematological phenotypes of  $\beta$  and  $\delta\beta$  thalassemias. In Bartsokas C, Loukopoulos D eds. Genetics of Hematological Disorders. New York: Hemisphere; Ch 5, 65-77.
113. Kattamis C, Kattamis AC. (1997) Genotypes and phenotypes of beta-thalassemia in Mediterranean populations. *Pediatr Hematol Oncol.*, 14(3):vii-ix.
114. Καττάμης Χ. (2004) Διαχρονική εξέλιξη της μελέτης και αντιμετώπισης της μεσογειακής αναιμίας. *Δελτ Α΄ Παιδιατρ Κλιν Πανεπ Αθηνών.* 51(3): 229-239.
115. Kawabata H, Yang R, Hiramata T, Vuong PT, Kawano S, Gombart AF, Koeffler HP. (1999) Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *J Biol Chem.*, 274(30):20826-32.
116. Kazazian HH. (1989) Use of PCR in the diagnosis of monogenic diseases. In Erlich HA (ed): PCR Technology: principles and applications for DNA amplification. New York: Stockton Press, 153-169
117. Kazazian HH Jr. (1990) The thalassemia syndromes: molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. *Semin Hematol.* , 27(3):209-28.
118. Kemna EH, Tjalsma H, Willems HL, Swinkels DW. (2008) Hcpidin: from discovery to differential diagnosis. *Haematologica.* , 93(1):90-7.
119. Kolnagou A, Natsiopoulos K, Kleanthous M, Ioannou A, Kontoghiorghes GJ. (2013) Liver Iron and Serum Ferritin Levels are Misleading for Estimating Cardiac, Pancreatic, Splenic and Total Body Iron Load in Thalassemia Patients: Factors Influencing the Heterogenic Distribution of Excess Storage Iron in Organs as Identified by MRI T2\*. *Toxicol Mech Methods.* , 23(1):48-56.
120. Kulozik AE, Yarwood N, Jones RW. (1988) The Corfu delta beta zero thalassemia: a small deletion acts at a distance to selectively abolish beta globin gene expression. *Blood.* , 71(2):457-62. Erratum in: Blood 1988 May;71(5):1509.
121. Kushner JP, Porter JP, Olivieri NF. (2001) Secondary iron overload. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* , 47-61.
122. Ladis V, Chouliaras G, Berdousi H, Kanavakis E, Kattamis C. (2005) Longitudinal study of survival and causes of death in patients with thalassemia major in Greece. *Ann N Y Acad Sci.* , 1054:445-50.

123. Lee P, Peng H, Gelbart T, Wang L, Beutler E. (2005) Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6. *Proc Natl Acad Sci U S A.* , 102(6):1906-10.
124. Levi S, Corsi B, Bosisio M, Invernizzi R, Volz A, Sanford D, Arosio P, Drysdale J. (2001) A human mitochondrial ferritin encoded by an intronless gene. *J Biol Chem.* , 276(27):24437-40.
125. Lieu PT, Heiskala M, Peterson PA, Yang Y. (2001) The roles of iron in health and disease. *Mol Aspects Med.* , 22(1-2):1-87.
126. Loukopoulos D. (1996) Current status of thalassemia and the sickle cell syndromes in Greece. *Semin Hematol.* , 33(1):76-86.
127. Loukopoulos D, Voskaridou E, Stamoulakatou A, Papassotiriou Y, Kalotychoy V, Loutradi A, Cozma G, Tsiarta H, Pavlides N. (1998) Hydroxyurea therapy in thalassemia. *Ann N Y Acad Sci.* , 850:120-8.
128. Mancosu MG, Galanello R, Ambu R, De Virgiliis S, Giagu N, Cao A, Faa G. (2000) Histological picture of liver disease in thalassemia intermedia. *Pathologica.* , 92(4):241-8.
129. Maniatis T, Fritsch EF, Lauer J, Lawn RM. (1980) The molecular genetics of human hemoglobins. *Annu Rev Genet.* ,14:145-78.
130. Maragoudaki E, Vrettou C, Kanavakis E, Traeger-Synodinos J, Metaxotou-Mavrommati A, Kattamis C. (1998) Molecular, haematological and clinical studies of a silent beta-gene C-->G mutation at 6 bp 3' to the termination codon (+1480 C-->G) in twelve Greek families. *Br J Haematol.* , 103(1):45-51.
131. Maragoudaki E, Kanavakis E, Traeger-Synodinos J, Vrettou C, Tzetis M, Metaxotou-Mavrommati A, Kattamis C. (1999) Molecular, haematological and clinical studies of the -101 C --> T substitution of the beta-globin gene promoter in 25 beta-thalassaemia intermedia patients and 45 heterozygotes. *Br J Haematol.* , 107(4):699-706.
132. McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, Rolfs A, Sager G, Mudaly E, Mudaly M, Richardson C, Barlow D, Bomford A, Peters TJ, Raja KB, Shirali S, Hediger MA, Farzaneh F, Simpson RJ. (2001) An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science.* , 291(5509):1755-9.
133. Melis MA, Pirastu M, Galanello R, Furbetta M, Tuveri T, Cao A. (1983) Phenotypic effect of heterozygous alpha and beta 0-thalassemia interaction. *Blood.* ,62(1):226-9.

134. Melis MA, Cau M, Deidda F, Barella S, Cao A, Galanello R. (2002) H63D mutation in the HFE gene increases iron overload in beta-thalassemia carriers. *Haematologica.* , 87(3):242-5.
135. Merryweather-Clarke AT, Pointon JJ, Shearman JD, Robson KJ. (1997) Global prevalence of putative haemochromatosis mutations. *J Med Genet.* , 34(4):275-8.
136. Miret S, Simpson RJ, McKie AT. (2003) Physiology and molecular biology of dietary iron absorption. *Annu Rev Nutr.* ;23:283-301.
137. Mohamed N, Jackson N. (1998) Severe thalassaemia intermedia: clinical problems in the absence of hypertransfusion. *Blood Rev.* , 12(3):163-70.
138. Molineux G. (2003) Biology of erythropoietin. In: Molineux G, Foote MA, Elliott SG eds. Erythropoietins and Erythropoiesis: molecular, cellular, preclinical and clinical biology. Birkhauser Verlag/Switzerland, 3-14.
139. Mourad FH, Hoffbrand AV, Sheikh-Taha M, Koussa S, Khoriaty AI, Taher A. (2003) Comparison between desferrioxamine and combined therapy with desferrioxamine and deferiprone in iron overloaded thalassaemia patients. *Br J Haematol.* , 121(1):187-9.
140. Myers RM, Sheffield VC, Cox DR. (1989) Mutation detection by PCR, GC-clamps, and Denaturing Gradient Electrophoresis. In Erlich HA (ed): PCR Technology: principles and applications for DNA amplification. New York: Stockton Press, 71-78.
141. Musallam KM, Cappellini MD, Wood JC, Motta I, Graziadei G, Tamim H, Taher AT. (2011) Elevated liver iron concentration is a marker of increased morbidity in patients with  $\beta$  thalassemia intermedia. *Haematologica.* , 96(11):1605-12.
142. Napier I, Ponka P, Richardson DR. (2005) Iron trafficking in the mitochondrion: novel pathways revealed by disease. *Blood.*, 105(5):1867-74.
143. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, Kaplan J. (2004a) Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science.*, 306(5704):2090-3.
144. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, Ganz T. (2004b) IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest.* , 113(9): 1271-6.

145. Nemeth E, Preza GC, Jung CL, Kaplan J, Waring AJ, Ganz T. (2006) The N-terminus of hepcidin is essential for its interaction with ferroportin: structure-function study. *Blood.* ;107(1):328-33.
146. Nemeth E, Ganz T. (2006) Regulation of iron metabolism by hepcidin. *Annu Rev Nutr.* ;26:323-42.
147. Nemeth E. (2008) Iron regulation and erythropoiesis. *Curr Opin Hematol.* , 15(3):169-75.
148. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF. (1989) Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.*, 17(7):2503-16.
149. Nick H-P, Acklin P, Lattmann R, Buehlmayer P, Hauffe S, Schupp J, Alberti D. (2003) Development of tridentate iron chelators: from desferrithiocin to ICL670. *Curr Med Chem.* , 10: 1065-1076.
150. Nisbet-Brown E, Olivieri NF, Giardina PJ, Grady RW, Neufeld EJ, Séchaud R, Krebs-Brown AJ, Anderson JR, Alberti D, Sizer KC, Nathan DG. (2003) Effectiveness and safety of ICL670 in iron-loaded patients with thalassemia: a randomised, doubleblind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Lancet.* , 361:1597-1602.
151. O'Donnell A, Premawardhena A, Arambepola M, Allen SJ, Peto TE, Fisher CA, Rees DC, Olivieri NF, Weatherall DJ. (2007) Age-related changes in adaptation to severe anemia in childhood in developing countries. *Proc Natl Acad Sci USA.* , 104 (22):9440-4.
152. Oberkanins C, Moritz A, de Villiers JN, Kotze MJ, Kury F. (2000) A reverse-hybridization assay for the rapid and simultaneous detection of nine HFE gene mutations. *Genet Test.* , 4(2):121-4.
153. Olds RJ, Sura T, Jackson B, Wonke B, Hoffbrand AV, Thein SL. (1991) A novel delta 0 mutation in cis with Hb Knossos: a study of different genetic interactions in three Egyptian families. *Br J Haematol.*, 78(3):430-6.
154. Olivieri NF. (1996) Reactivation of fetal hemoglobin in patients with beta-thalassemia. *Semin Hematol.*, 33(1):24-42.
155. Olivieri NF, Brittenham GM. (1997) Iron-chelating therapy and the treatment of thalassemia. *Blood.*, 89(3):739-61.
156. Origa R, Galanello R, Ganz T, Giagu N, Maccioni L, Faa G, Nemeth E. (2007) Liver iron concentrations and urinary hepcidin in beta-thalassemia. *Haematologica.*; 92(5):583-8

157. Origa R, Barella S, Argiolas GM, Bina P, Agus A, Galanello R. (2008) No evidence of cardiac iron in 20 never- or minimally-transfused patients with thalassemia intermedia. *Haematologica.* , 93(7):1095-6.
158. Orkin SH. (1995) Regulation of globin gene expression in erythroid cells. *Eur J Biochem.* , 231(2):271-81.
159. Oron V, Filon D, Oppenheim A, Rund D. (1994) Severe thalassaemia intermedia caused by interaction of homozygosity for alpha-globin gene triplication with heterozygosity for beta zero-thalassaemia. *Br J Haematol.* , 86(2):377-9.
160. Pakbaz Z, Fischer R, Fung E, Nielsen P, Harmatz P, Vichinsky E. (2007) Serum ferritin underestimates liver iron concentration in transfusion independent thalassemia patients as compared to regularly transfused thalassemia and sickle cell patients. *Pediatr Blood Cancer.*, 49(3):329-32
161. Panigrahi I, Dixit A, Arora S, Kabra M, Mahapatra M, Choudhry VP, Saxena R. (2005) Do alpha deletions influence hydroxyurea response in thalassemia intermedia? *Hematology.*, 10(1):61-3.
162. Pantopoulos K, Weiss G, Hentze MW. (1996) Nitric oxide and oxidative stress (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) control mammalian iron metabolism by different pathways. *Mol Cell Biol.* , 16(7):3781-8.
163. Papadaki MG, Kattamis AC, Papadaki IG, Menegas DG, Georgakopoulou TP, Mavrommati-Metaxotou A, Kattamis CA. (2003) Abdominal ultrasonographic findings in patients with sickle-cell anaemia and thalassaemia intermedia. *Pediatr Radiol.* , 33(8):515-21.
164. Papanikolaou G, Samuels ME, Ludwig EH, MacDonald ML, Franchini PL, Dubé MP, Andres L, MacFarlane J, Sakellaropoulos N, Politou M, Nemeth E, Thompson J, Risler JK, Zaborowska C, Babakaiff R, Radomski CC, Pape TD, Davidas O, Christakis J, Brissot P, Lockitch G, Ganz T, Hayden MR, Goldberg YP. (2004) Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet.*, 36(1):77-82.
165. Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. (2001) Heparin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem.*, 276(11):7806-10.
166. Pennell DJ, Berdoukas V, Karagiorga M, Ladis V, Piga A, Aessopos A, Gotsis ED, Tanner MA, Smith GC, Westwood MA, Wonke B, Galanello R. (2006) Randomized controlled trial of deferiprone or deferoxamine in beta-thalassemia major patients with asymptomatic myocardial siderosis. *Blood.*, 107(9):3738-44.

167. Perutz MF. (1978) Hemoglobin structure and respiratory transport. *Sci Am.* , 239(6):92-125.
168. Perutz MF. (1980) Stereochemical mechanism of oxygen transport by haemoglobin. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* , 208(1171):135-62.
169. Peyssonaux C, Zinkernagel AS, Schuepbach RA, Rankin E, Vaultont S, Haase VH, Nizet V, Johnson RS. (2007) Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *J Clin Invest.* , 117(7):1926-32.
170. Piperno A, Mariani R, Arosio C, Vergani A, Bosio S, Fargion S, Sampietro M, Girelli D, Fraquelli M, Conte D, Fiorelli G, Camaschella C. (2000) Haemochromatosis in patients with beta-thalassaemia trait. *Br J Haematol.* , 111(3):908-14.
171. Piga A, Galanello R, Forni GL, Cappellini MD, Origa R, Zappu A, Donato G, Bordone E, Lavagetto A, Zanaboni L, Sechaud R, Hewson N, Ford JM, Opitz H, Alberti D. (2006) Randomized phase II trial of deferasirox ( Exjade, ICL670), a once-daily, orally-administered iron chelator, in comparison to deferoxamine in thalassemia patients with transfusional iron overload. *Haematologica.* , 91: 873-880
172. Pippard MJ, Callender ST, Warner GT, Weatherall DJ. (1979) Iron absorption and loading in beta-thalassaemia intermedia. *Lancet.*, 2(8147):819-21.
173. Politou M, Kalotychou V, Pissia M, Rombos Y, Sakellaropoulos N, Papanikolaou G. (2004) The impact of the mutations of the HFE gene and of the SLC11A3 gene on iron overload in Greek thalassemia intermedia and beta(s)/beta(thal) anemia patients. *Haematologica.*, 89(4):490-2.
174. Ponka P, Beaumont C, Richardson DR. (1998) Function and regulation of transferrin and ferritin. *Semin Hematol.* , 35(1):35-54.
175. Porter JB. (2001) Practical management of iron overload. *Br J Haematol.*, 115(2):239-52.
176. Porter JB, Cappellini MD, El-Beshlavy A, Kattamis A, Seymour JF, Wook Lee J, Nick H, Habr D, Domokos G, Hmissi A, and Taher A. (2008a) Effect of Deferasirox (Exjade©) on Labile Plasma Iron Levels in Heavily Iron-Overloaded Patients with Transfusion-Dependent Anemias Enrolled in the Large-Scale, Prospective 1-Year EPIC Trial. *Blood.* ; 112 (11): abstr 3881.



177. Porter J, Galanello R, Saglio G, Neufeld EJ, Vichinsky E, Cappellini MD, Olivieri N, Piga A, Cunningham MJ, Soulires D, Gattermann N, Tchernia G, Maertens J, Giardina P, Kwiatkowski J, Quarta G, Jeng M, Forni GL, Stadler M, Cario H, Debusscher L, Della Porta M, Cazzola M, Greenberg P, Alimena G, Rabault B, Gathmann I, Ford JM, Alberti D, Rose C. (2008) Relative response of patients with myelodysplastic syndromes and other transfusion-dependent anaemias to deferasirox (ICL670): a 1-yr prospective study. *Eur J Haematol.* , 80(2):168–176.
178. Robb A, Wessling-Resnick M. (2004) Regulation of transferrin receptor 2 protein levels by transferrin. *Blood.* , 104(13):4294-9.
179. Qiu A, Jansen M, Sakaris A, Min SH, Chattopadhyay S, Tsai E, Sandoval C, Zhao R, Akabas MH, Goldman ID. (2006) Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell.* , 127(5):917-28.
180. Quigley JG, Yang Z, Worthington MT, Phillips JD, Sabo KM, Sabath DE, Berg CL, Sassa S, Wood BL, Abkowitz JL. (2004) Identification of a human heme exporter that is essential for erythropoiesis. *Cell.*, 118(6):757-66.
181. Ramm GA, Ruddell RG. (2005) Hepatotoxicity of iron overload: mechanisms of iron-induced hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis.*, 25(4):433-49.
182. al-Refaie FN, Wickens DG, Wonke B, Kontoghiorghes GJ & Hoffbrand AV. (1992) Serum non-transferrin-bound iron in betathalassaemia major patients treated with desferrioxamine and L1. *Br J Haematol.* , 82:431–436.
183. Rees DC, Luo LY, Thein SL, Singh BM, Wickramasinghe S. (1997) Nontransfusional iron overload in thalassemia: association with hereditary hemochromatosis. *Blood.* , 90(8):3234-6.
184. Ristaldi MS, Murru S, Loudianos G, Casula L, Porcu S, Pigheddu D, Fanni B, Sciarratta GV, Agosti S, Parodi MI, et al. (1990) The C-T substitution in the distal CACCC box of the beta-globin gene promoter is a common cause of silent beta thalassaemia in the Italian population. *Br J Haematol.* , 74(4):480-6.
185. Roghi A, Cappellini MD, Wood JC, Musallam KM, Patrizia P, Fasulo MR, Cesaretti C, Taher AT. (2010) Absence of cardiac siderosis despite hepatic iron overload in Italian patients with thalassemia intermedia: an MRI T2\* study, *Ann. Hematol.* , 89:585–589

186. Rosatelli C, Falchi AM, Scalas MT, Tuveri T, Furbetta M, Cao A. (1984) Hematological phenotype of the double heterozygous state for alpha and beta thalassemia. *Hemoglobin.* ,8(1):25-35.
187. Rosatelli C, Leoni GB, Tuveri T, Scalas MT, Di Tucci A, Cao A. (1987) Beta thalassaemia mutations in Sardinians: implications for prenatal diagnosis. *J Med Genet.* , 24(2):97-100.
188. Rosatelli MC, Oggiano L, Battista Leoni G, Tuveri T, Di Tucci A, Scalas MT, Dore F, Pistidda P, Massa A, Longinotti M, et al. (1989) Thalassemia intermedia resulting from a mild beta-thalassemia mutation. *Blood.* , 73(2): 601-5.
189. Rosenberg HK, Markowitz RI, Kolberg H, Park C, Hubbard A, Bellah RD. (1991) Normal splenic size in infants and children: sonographic measurements. *AJR Am J Roentgenol.* , 157(1):119-21.
190. Roy CN, Penny DM, Feder JN, Enns CA. (1999) The hereditary hemochromatosis protein, HFE, specifically regulates transferrin-mediated iron uptake in HeLa cells. *J Biol Chem.* ;274(13):9022-8.
191. Roy CN, Enns CA. (2000) Iron homeostasis: new tales from the crypt. *Blood.* ; 96(13):4020-7.
192. Rund D, Oron-Karni V, Filon D, Goldfarb A, Rachmilewitz E, Oppenheim A. (1997) Genetic analysis of beta-thalassemia intermedia in Israel: diversity of mechanisms and unpredictability of phenotype. *Am J Hematol.*, 54(1):16-22.
193. Salter-Cid L, Brunmark A, Li Y, Leturcq D, Peterson PA, Jackson MR, Yang Y. (1999) Transferrin receptor is negatively modulated by the hemochromatosis protein HFE: implications for cellular iron homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* ;96(10):5434-9.
194. Sampietro M, Cazzola M, Cappellini MD, Fiorelli G. (1983) The triplicated alpha-gene locus and heterozygous beta thalassaemia: a case of thalassaemia intermedia. *Br J Haematol.* , 55(4):709-10.
195. Schmidt PJ, Toran PT, Giannetti AM, Bjorkman PJ, Andrews NC. (2008) The transferrin receptor modulates Hfe-dependent regulation of hepcidin expression. *Cell Metab.* , 7(3):205-14.
196. Schrier SL. (2002) Pathophysiology of thalassemia. *Curr Opin Hematol.* , 9(2):123-6.
197. Schroeder WA. (1980) The synthesis and chemical heterogeneity of human fetal hemoglobin: overview and present concepts. *Hemoglobin.* , 4(3-4):431-46.

198. Serjeant GR, Topley JM, Mason K, Serjeant BE, Pattison JR, Jones SE, Mohamed R. (1981) Outbreak of aplastic crises in sickle cell anaemia associated with parvovirus-like agent. *Lancet.* , 2(8247):595-7.
199. Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, Laftah AH, Takeuchi K, Halliday N, Khan Y, Warley A, McCann FE, Hider RC, Frazer DM, Anderson GJ, Vulpe CD, Simpson RJ, McKie AT. 2005 Identification of an intestinal heme transporter. *Cell.* ,122(5):789-801.
200. Spanos T, Karageorga M, Ladis V, Peristeri J, Hatziliami A, Kattamis C. (1990) Red cell alloantibodies in patients with thalassemia. *Vox Sang.* , 58(1):50-5.
201. Stamatoyannopoulos G, Grosveld F. Hemoglobin switching. In: Stamatoyannopoulos G, Majerus P, Perlmutter RM, Varmus H, eds. *The Molecular Basis of Blood Diseases* (3rd ed.). Philadelphia: WB Saunders; 2001:135–182.
202. Stefanis L, Kanavakis E, Traeger-Synodinos J, Tzetis M, Metaxotou-Mavromati A, Kattamis C. (1994) Hematologic phenotype of the mutations IVS1-n6 (T-->C), IVS1-n110 (G-->A), and CD39 (C-->T) in carriers of beta-thalassemia in Greece. *Pediatr Hematol Oncol.* , 11(5):509-17.
203. Sturgeon P, Itano H, Bergren W. (1955) Genetic and biochemical studies of intermediate types of Cooley's anaemia. *Br J Haematol.* , 1:264-277.
204. Taher A, Isma'eel H, Cappellini MD. (2006a) Thalassemia intermedia: revisited. *Blood Cells Mol Dis.*, 37(1):12-20.
205. Taher A, El Rassi F, Isma'eel H, Koussa S, Inati A, Cappellini MD. (2008) Correlation of liver iron concentration determined by R2 magnetic resonance imaging with serum ferritin in patients with thalassemia intermedia. *Haematologica.* , 93(10):1584-6.
206. Taher A, Hershko C, Cappellini MD. (2009a) Iron overload in thalassaemia intermedia: reassessment of iron chelation strategies. *Br J Haematol.* ;147:634-40.
207. Taher A, Musallam KM, El Rassi F, Duca L, Inati A, Koussa S, Cappellini MD. (2009b) Levels of non-transferrin-bound iron as an index of iron overload in patients with thalassaemia intermedia. *Br J Haematol.* , 146:569-72.
208. Taher AT, Musallam KM, Wood JC, Cappellini MD. (2010a) Magnetic resonance evaluation of hepatic and myocardial iron deposition in

- transfusion-independent thalassemia intermedia compared to regularly transfused thalassemia major patients, *Am. J. Hematol.* , 85 288–290.
209. Taher AT, Musallam KM, El-Beshlawy A, Karimi M, Daar S, Belhoul K, Saned MS, Graziadei G, Cappellini MD. (2010b) Age related complications in treatment-naive patients with thalassaemia intermedia. *Br J Haematol.* , 150(4):486-9.
  210. Tamagnini GP, Lopes MC, Castanheira ME, Wainscoat JS, Wood WG. (1983) Beta + thalassemia--Portuguese type: clinical, haematological and molecular studies of a newly defined form of beta thalassaemia. *Br J Haematol.* , 54(2): 189-200.
  211. Telfer P, Coen PG, Christou S, Hadjigavriel M, Kolnakou A, Pangalou E, Pavlides N, Psiloines M, Simamonian K, Skordos G, Sitarou M, Angastiniotis M. (2006) Survival of medically treated thalassemia patients in Cyprus. Trends and risk factors over the period 1980-2004. *Haematologica.* , 91(9):1187-92.
  212. Testa U. (2002) Recent developments in the understanding of iron metabolism. *Hematol J.* , 3(2):63-89.
  213. Theil EC. (1990) The ferritin family of iron storage proteins. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* , 63:421-49.
  214. Thein SL, Al-Hakim I, Hoffbrand AV. (1984) Thalassaemia intermedia: a new molecular basis. *Br J Haematol.* , 56(2):333-7.
  215. Thein SL. (1999) Is it dominantly inherited beta thalassaemia or just a beta-chain variant that is highly unstable? *Br J Haematol.*, 107(1):12-21.
  216. Thein SL. (2001) Structural variants in beta-thalassemia phenotype. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL eds. Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology and Clinical management. Cambridge, UK: Cambridge University Press, Cambridge , UK; 342-355.
  217. Thein SL. (2004) Genetic insights into the clinical diversity of beta thalassaemia. *Br J Haematol.* , 124(3):264-74.
  218. Thein SL. (2005) Pathophysiology of {beta} Thalassemia--A Guide to Molecular Therapies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.*, 31-7.
  219. Torti FM, Torti SV. (2002) Regulation of ferritin genes and protein. *Blood.* ;99(10):3505-16.
  220. Traeger-Synodinos J, Tzetis M, Kanavakis E, Metaxotou-Mavromati A, Kattamis C. (1991) The Corfu delta beta thalassaemia mutation in

- Greece: haematological phenotype and prevalence. *Br J Haematol.* , 79(2):302-5.
221. Traeger-Synodinos J, Kanavakis E, Tzetis M, Kattamis A, Kattamis C. (1993) Characterization of nondeletion alpha-thalassemia mutations in the Greek population. *Am J Hematol.* , 44(3):162-7.
222. Traeger-Synodinos J, Kanavakis E, Vrettou C, Maragoudaki E, Michael T, Metaxotou-Mavromati A, Kattamis C. (1996) The triplicated alpha-globin gene locus in beta-thalassaemia heterozygotes: clinical, haematological, biosynthetic and molecular studies. *Br J Haematol.* , 95(3):467-71.
223. Traeger-Synodinos J, Maragoudaki E, Vrettou C, Kanavakis E, Kattamis C. (1998) Rare beta-thalassaemia alleles in the Greek and Greek Cypriot populations. *Hemoglobin.* , 22(1):89-94.
224. Treadwell MJ, Weissman L. (2001) Improving adherence with deferoxamine regimens for patients receiving chronic transfusion therapy. *Semin Hematol.* , 38(1 Suppl 1):77-84.
225. Vaccari M, Crepaz R, Fortini M, Gamberini MR, Scarcia S, Pitscheider W, Bosi G. (2002) Left ventricular remodeling, systolic function, and diastolic function in young adults with beta-thalassaemia intermedia: a Doppler echocardiography study. *Chest.* , 121(2):506-12.
226. Verma IC, Kleanthous M, Saxena R, Fucharoen S, Winichagoon P, Raizuddin S, Khan SN, Akbari MT, Izadyar M, Kotea N, Old JM, Ioannou PA, Khan B. (2007) Multicenter study of the molecular basis of thalassaemia intermedia in different ethnic populations. *Hemoglobin.* , 31(4):439-52.
227. Voskaridou E, Douskou M, Terpos E, Papassotiriou I, Stamoulakatou A, Ourailidis A, Loutradi A, Loukopoulos D. (2004) Magnetic resonance imaging in the evaluation of iron overload in patients with beta thalassaemia and sickle cell disease. *Br J Haematol.* , 126(5):736-42.
228. Voskaridou E, Plata E, Douskou M, Papadakis M, Delaki EE, Christoulas D, Terpos E. (2010) Treatment with deferasirox (Exjade) effectively decreases iron burden in patients with thalassaemia intermedia: results of a pilot study. *British J Haematol.* , 148, 332–334.
229. Wainscoat JS, Kanavakis E, Wood WG, Letsky EA, Huehns ER, Marsh GW, Higgs DR, Clegg JB, Weatherall DJ. (1983) Thalassaemia intermedia in Cyprus: the interaction of alpha and beta thalassaemia. *Br J Haematol.* , 53(3):411-6.

230. Wainscoat Js, Thein SL, Wood WG, Weatherall DJ, Metaxotou-Mavromati A, Tzotos S, Kanavakis E, Kattamis C. (1985) A novel deletion in the beta-globin gene complex. *Ann N Y Acad Sci.* , 445:20-7.
231. Weatherall DJ, Clegg JB, Higgs DR, Wood WG. (1995) The hemoglobinopathies In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly W, Valle D eds. The metabolic and molecular bases of inherited diseases. 7<sup>th</sup> ed New York: McGraw-Hill, 3417-3484.
232. Weatherall DJ, Clegg JB. (1999) Genetic disorders of hemoglobin. *Semin Hematol.* , 36 (4 Suppl 7):24-37.
233. Weatherall DJ. (2000) Single gene disorders or complex traits: lessons from the thalassaemias and other monogenic diseases. *BMJ.*, 321(7269): 1117-20.
234. Weatherall D.J. & Clegg J.B. (2001) The Thalassaemia Syndromes. 4<sup>th</sup> ed: Blackwell Science, Oxford.
235. West AR, Oates PS. (2008) Mechanisms of heme iron absorption: Current questions and controversies. *World J Gastroenterol.*; 14(26):4101-10.
236. Wick M, Pinggera W, Lehmann P. Iron Metabolism - Diagnosis and Therapy: Novel Concepts in the Anemias of Renal and Rheumatoid Disease. 4th ed, Springer-Verlag, Wien, 2000.
237. Wood JC, Enriquez C, Ghugre N, Otto-Duessel M, Aguilar M, Nelson MD, Moats R, Coates TD. (2005) Physiology and pathophysiology of iron cardiomyopathy in thalassemia. *Ann N Y Acad Sci.* , 1054:386-95.
238. Wood WG, Weatherall DJ. (1983) Developmental genetics of the human haemoglobins. *Biochem J.* , 215(1):1-10.
239. Wood WG. (1993) Increased HbF in adult life. *Baillieres Clin Haematol.* , 6(1):177-213.
240. Wu KH, Chang JS, Tsai CH, Peng CT. (2004) Combined therapy with deferiprone and desferrioxamine successfully regresses severe heart failure in patients with beta-thalassemia major. *Ann Hematol.*, 83(7):471-3.