

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΩΝ ΣΥΝΔΡΟΜΩΝ ΣΕ  
ΚΑΤΟΙΚΟΥΣ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΚΑΛΛΗ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ**

**ΛΑΡΙΣΑ, 2019**

**DIPLOMA PROJECT**

**POLYMORPHISMS OF  
MEDITERRANEAN SYNDROMES**

LARISSA, 2019

Υπεύθυνη Καθηγήτρια:

**Κυριάκου Δέσποινα**, Καθηγήτρια Ιατρικής των Μεταγγίσεων, Τμήμα Ιατρικής, Π.Θ.

Τριμελής Επιτροπή:

**Κυριάκου Δέσποινα**, Καθηγήτρια Ιατρικής των Μεταγγίσεων, Τμήμα Ιατρικής, Π.Θ.

**Ψαρρά Άννα- Μαρία**, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας, ΤΒΒ, Π.Θ.

**Σαραφίδου Θεολογία**, Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, ΤΒΒ, Π.Θ.

*Στην οικογένειά μου,*

*Nothing in life is to be feared, it is only  
to be understood. Now is the time to  
understand more, so that we may fear  
less.*

## Περιεχόμενα

Περίληψη.....	6
Abstract .....	6
1.1 Τι είναι το αίμα.....	7
1.2 Ο ρόλος του αίματος .....	7
1.3 Από τι αποτελείται το αίμα.....	7
1.3.1. Ερυθρά αιμοσφαίρια.....	8
1.3.2 Λευκά αιμοσφαίρια .....	9
1.3.3 Αιμοπετάλια .....	9
2. Αιμοσφαιρίνη .....	9
2.1 Το μόριο της αιμοσφαιρίνης.....	10
2.2 Γενετικές διαταραχές αιμοσφαιρινών του ανθρώπου.....	10
2.3 Τα γονίδια της αιμοσφαιρίνης του ανθρώπου .....	11
2.4 Γονιδιακή δόση, Οντογένεση και Κλινική διαταραχή.....	12
3. Αιμοσφαιρινοπάθειες .....	12
3.1 Δομικές παραλλαγές της αιμοσφαιρίνης.....	12
3.1.1 Αιμολυτικές Αναιμίες.....	13
3.2 Μεσογειακά σύνδρομα.....	13
3.2.1 Προέλευση του ονόματος «Μεσογειακή αναιμία».....	14
3.2.2 Επιδημιολογία .....	14
4. Α-Μεσογειακή αναιμία .....	14
4.1 Μοριακή βάση της α-μεσογειακής αναιμίας.....	15
4.2 Φαινοτυπική ετερογένεια της α-μεσογειακής αναιμίας .....	15
4.3 Ανάλυση αιμοσφαιρίνης.....	17
4.4 Γενετική συμβουλευτική .....	17
5. Β-Μεσογειακή αναιμία.....	17
5.1 Β-Μεσογειακή αναιμία, Σύνθετες Μεσογειακές Αναιμίες και Κληρονομική Διατήρηση της Εμβρυϊκής Αιμοσφαιρίνης. ....	18
5.2 Μοριακή βάση της β-μεσογειακής αναιμίας.....	18
5.3 Φαινοτυπική ετερογένεια β-μεσογειακής αναιμίας.....	19

5.4 Παθοφυσιολογία.....	20
6. Γονίδια.....	20
6.1 Γενετικός Πολυμορφισμός στο ανθρώπινο είδος.....	21
7. Πολυμορφισμοί .....	21
7.1 Μοριακή βάση πολυμορφισμών.....	21
7.2 Είδη πολυμορφισμών του DNA .....	22
7.3 Γενετικοί πολυμορφισμοί και μελέτες σύνδεσης γονότυπου-φαινοτύπου .....	23
7.4 Οι πολυμορφισμοί ως χρήσιμα εργαλεία στην Ιατρική.....	23
8. Υλικά και Μέθοδοι.....	24
8.1 Βιολογικό υλικό .....	24
8.2 Εργαστηριακοί Μέθοδοι.....	24
8.2. 1 Συλλογή δειγμάτων .....	24
8.2.2 Ποιοτικός έλεγχος .....	24
8.3 Υγρή Χρωματογραφία Ιοντοανταλλαγής Υψηλής Απόδοσης (High-Pressure Liquid Chromatography, HPLC) .....	24
8. 4 Υλικά.....	25
8.5 Σύνοψη και επεξήγηση της δοκιμασίας.....	25
8.6 Ερμηνεία αποτελεσμάτων .....	28
8.7 Αιματολογική Μελέτη Ερυθροκυτταρικών εγκλείστων .....	29
9. Αποτελέσματα .....	29
10. Συζήτηση .....	46
11. Βιβλιογραφικές πηγές.....	49

## Περίληψη

Οι αιμοσφαιρινοπάθειες είναι ετερογενής ομάδα αυτοσωμικών υπολειπόμενων κληρονομικών νοσημάτων. Στα νοσήματα αυτά εντάσσονται κυρίως η δρεπανοκυτταρική νόσος και οι μεσογειακές αναιμίες. Στην μεσογειακή αναιμία η παραγωγή φυσιολογικής αιμοσφαιρίνης είναι μερικώς ή τελείως κατεσταλμένη λόγω ελαττωματικής σύνθεσης της ή περισσότερων αλυσίδων σφαιρίνης. Διάφοροι τύποι μεσογειακής αναιμίας έχουν περιγραφεί με βάση την αλυσίδα της οποίας η σύνθεση είναι ελαττωματική.

Ένα αναμφισβήτητο αξίωμα της Ιατρικής λέει: «το να προλαμβάνεις μια αρρώστια είναι πάντα καλύτερο από το να τη θεραπεύσεις». Όταν όμως πρόκειται για μια κληρονομική ασθένεια όπως οι μεσογειακές αναιμίες, των οποίων κύριο χαρακτηριστικό είναι η ποικιλομορφία, τότε χρειάζεται μεγαλύτερη προσπάθεια. Η ποικιλομορφία αυτή είναι αποτέλεσμα των γενετικών πολυμορφισμών που σημειώνονται στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Για τον σκοπό αυτό, στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο γονότυπος και ο φαινότυπος των μεσογειακών συνδρόμων. Ταυτόχρονα, εξετάστηκε η συσχέτιση πολυμορφισμών με τα συγκεκριμένα σύνδρομα.

Ειδικότερα, διεξήχθη ανάλυση δειγμάτων από κατοίκους Θεσσαλίας. Σκοπός της ανάλυσης ήταν να σημειωθούν τα επίπεδα HbF, της κυριότερης αιμοσφαιρίνης του εμβρύου στα άτομα αυτά. Τα επίπεδα ήταν αυξημένα σε 5 άτομα. Ταυτόχρονα, ελέγχθηκαν και οι τιμές της HbA2. Η συγκεκριμένη αιμοσφαιρίνη αποτελεί το 2 – 3% της συνολικής αιμοσφαιρίνης, ενώ η τιμή της βρέθηκε εκτός των φυσιολογικών ορίων σε 8 άτομα.

Σε δείγματα αρχείου παρατηρήθηκε ότι οι επικρατέστερες μεταλλάξεις για την β-μεσογειακή αναιμία είναι οι IVS1-6 και οι -87. Επίσης, οι κύριοι πολυμορφισμοί της α-μεσογειακής αναιμίας που βρέθηκαν ήταν οι --<sup>MED</sup> και οι cd14.

## Abstract

Hemoglobinopathies are a heterogenous group of hereditary autosomal recessive diseases. These diseases include sickle cell disease and thalassemias. In thalassemia the production of normal hemoglobin is partially or completely suppressed due to a defective synthesis of this or more globulin chains. Different types of thalassemia have been described according to the chain having a defective synthesis.

An indisputable medical posture says: "Preventing a disease is always better than treating it". However, when it comes to a hereditary disease such as thalassemia, whose main feature is diversity, and then more effort is needed. This diversity is the result of genetic polymorphisms which are noted in the human genome. For this purpose, in this study the genotype and phenotype of Mediterranean syndromes were studied. The association of polymorphisms to these syndromes was also studied.

In particular, samples by residents of Thessaly were analyzed. The purpose of the analysis was to note the levels of HbF, the major hemoglobin of the fetus in these individuals. The levels were increased to 5 people. At the same time, the values of HbA2 were also tested. This hemoglobin accounts for 2 - 3% of total hemoglobin, while abnormal levels of this hemoglobin were observed in 8 people. In archive samples, it was observed that the most prevalent mutations for β –thalassemia are

IVS1-6 and -87. Also, the main polymorphisms of  $\alpha$ -thalassemia found were --<sup>MED</sup> and cd14.

## 1. Εισαγωγή

### 1.1 Τι είναι το αίμα

Το αίμα χαρακτηρίζεται ως ρευστός συνδετικός ιστός. Χωρίς την παρουσία του αίματος, ο ανθρώπινος οργανισμός είναι αδύνατο να επιβιώσει. Μέσω του αίματος τροφοδοτούνται τα όργανα και οι ιστοί του οργανισμού, ενώ παράλληλα απομακρύνονται οι άχρηστες τοξικές ουσίες. Η καρδιά είναι υπεύθυνη για την κυκλοφορία του αίματος στο σώμα.

### 1.2 Ο ρόλος του αίματος

Το αίμα συμμετέχει στην μεταφορά αερίων όπως το οξυγόνο και το διοξείδιο του άνθρακα. Ως μεταφορέας ορμονών και άλλων ουσιών επιτρέπει την ανταλλαγή χημικών μηνυμάτων μεταξύ απομακρυσμένων οργάνων, με αποτέλεσμα την ομαλή λειτουργία του οργανισμού. Ταυτόχρονα το αίμα συμμετέχει στην ρύθμιση της θερμοκρασίας του σώματος, της οξεοβασικής καθώς και της ωσμωτικής ισορροπίας. Η προστασία του οργανισμού με τη δημιουργία θρόμβου σε μια αιμορραγία επίσης συγκαταλέγεται στις λειτουργίες του αίματος (Ανδρέα-Πάολα Ρόχας Χιλ, (2018)).

### 1.3 Από τι αποτελείται το αίμα

Το αίμα αποτελείται σε ποσοστό 55% από πλάσμα, ένα χαρακτηριστικό υποκίτρινο υγρό αποτελούμενο κατά 90% από νερό. Το πλάσμα αποτελείται από έναν μεγάλο αριθμό οργανικών και ανόργανων ουσιών διαλυμένων στο νερό. Τα υπόλοιπα συστατικά του αίματος είναι τα λευκά αιμοσφαίρια, τα αιμοπετάλια και τα ερυθρά αιμοσφαίρια (Εικόνα 1). Τα συστατικά αυτά είναι γνωστά ως έμμορφα συστατικά και επιβιώνουν λίγες μέρες στην κυκλοφορία του αίματος. Παράγονται στον ερυθρό μυελό των οστών (Γαριπίδης, (2016)).



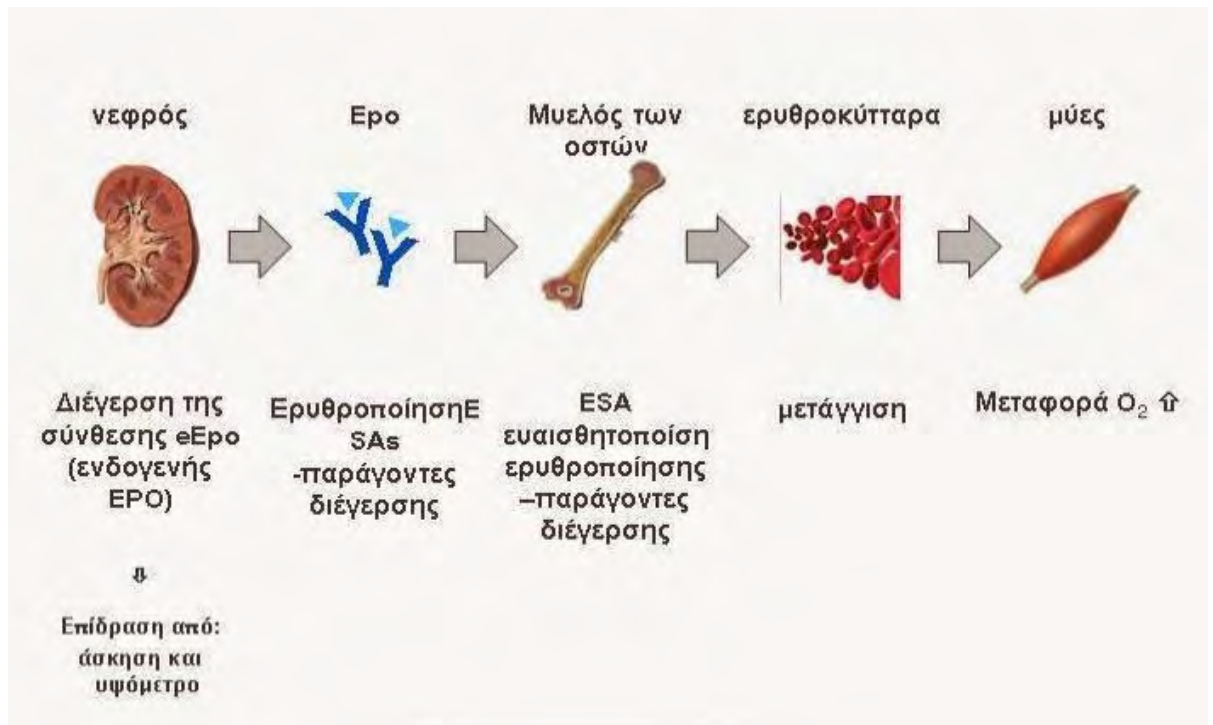
**Εικόνα 1: Τα συστατικά του αίματος**  
<http://www.teiath.gr/userfiles/akanellou/aima.pdf>

### 1.3.1. Ερυθρά αιμοσφαίρια

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια ή ερυθροκύτταρα (RBC) αποτελούν τα πολυαριθμότερα κύτταρα του περιφερικού αίματος. Τα συγκεκριμένα κύτταρα έχουν διάρκεια ζωής 4 μήνες και χαρακτηρίζονται ως «απύρνηνοι κυτταρικοί σάκοι» με σχήμα αμφίκυκλου φακού. Το σχήμα τους οφείλεται εν μέρει στην ύπαρξη περίσσειας μεμβράνης, η οποία δίνει στα ερυθρά αιμοσφαίρια αρκετή πλαστικότητα και τα καθιστά ικανά να περνούν μέσω των τριχοειδών ή άλλων στενών σχηματισμών με μικρή διάμετρο. Λόγω της μεμβράνης, είναι δυνατός ο έλεγχος των χημικών ουσιών που μπορούν να την διαπεράσουν (καθώς και ο βαθμός διαπερατότητας), ώστε να μην διαταράσσεται η εξωκυτταρική-ενδοκυτταρική ισορροπία. Ο ρόλος τους αφορά στην πρόσληψη του οξυγόνου από τους πνεύμονες και την μεταφορά του στους ιστούς, όπου γίνεται η ανταλλαγή του με το διοξείδιο του άνθρακα μέσω της αιμοσφαιρίνης που περιέχουν στην οποία και οφείλεται το κόκκινο χρώμα τους (Μαΐλης, χ.χ.).

Τα εν λόγω κύτταρα παράγονται στο μυελό των οστών εξαιτίας της δράσης της ερυθροποιητίνης, μιας ορμόνης που εκκρίνεται κυρίως στα νεφρά. Μία μικρή ποσότητα ερυθροποιητίνης παράγεται από κύτταρα του ήπατος. Ο μυελός των οστών κάτω από την επίδραση της ερυθροποιητίνης και μόνο παρουσία θρεπτικών ουσιών (σίδηρος, βιταμίνη B12, φυλλικό οξύ) παράγει τα ερυθρά αιμοσφαίρια τα οποία απελευθερώνει στο αίμα (Λεκάκου, (2015)).





**Εικόνα 2: Σύνθεση των ερυθροκυττάρων**  
<http://marialekakou.blogspot.com/2015/02/blog-post.html>

### 1.3.2 Λευκά αιμοσφαίρια

Τα λευκά αιμοσφαίρια είναι πλήρη κύτταρα του αίματος επιφορτισμένα με το ρόλο της άμυνας του οργανισμού έναντι σε λοιμώξεις, καθώς καταπολεμούν μικρόβια που εισέρχονται στο αίμα και προκαλούν μολύνσεις. Παράγονται στο μυελό των οστών και ο χρόνος ζωής τους στο ανθρώπινο σώμα είναι περίπου 3 έως 4 ημέρες (Κόλλιας, (2009), Bikhel et al, (2000)).

### 1.3.3 Αιμοπετάλια

Τα αιμοπετάλια είναι τα πιο μικρά από τα έμμορφα συστατικά του αίματος και χαρακτηρίζονται ως κυτταρικά θραύσματα. Αυτοί οι μικροσκοπικοί απύρνηνοι δίσκοι φράζουν το σημείο τραυματισμού ενός αγγείου, σχηματίζοντας έναν διαλυτό, αιμοπεταλιακό, εύθραυστο θρόμβο. Έτσι, παρατηρείται παροδική απώλεια αίματος, χωρίς να αποτρέπεται η αιμορραγία. Επομένως, ο ρόλος των αιμοπεταλίων αντικατοπτρίζεται στην εξασφάλιση της αιμόστασης (Κοκόρη, (2013)).

## 2. Αιμοσφαιρίνη

## 2.1 Το μόριο της αιμοσφαιρίνης

Η αιμοσφαιρίνη είναι ο φορέας του οξυγόνου στα ερυθροκύτταρα των σπονδυλωτών. Πρόκειται για ένα τετραμερές μόριο με σφαιρικό σχήμα. Αποτελείται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, οι δύο από τις οποίες προέρχονται από τα γονίδια του συμπλέγματος των  $\alpha$  αλυσίδων αιμοσφαιρίνης και οι άλλες δύο από τα γονίδια των  $\beta$  γονιδίων αιμοσφαιρίνης (Εικόνα 2). Κάθε αλυσίδα συνδέεται με μια ομάδα αίμης, δηλαδή μια χρωστική που περιέχει σίδηρο και συνδέεται με το οξυγόνο, προσδίδοντας στο μόριο της αιμοσφαιρίνης την ικανότητα μεταφοράς του οξυγόνου (Weatherall (1997)).



Εικόνα 3: Η δομή της αιμοσφαιρίνης

<http://marialekakou.blogspot.com/2015/02/blog-post.html>

## 2.2 Γενετικές διαταραχές αιμοσφαιρινών του ανθρώπου

Οι αιμοσφαιρινοπάθειες είναι μια ετερογενής ομάδα κληρονομικών διαταραχών που σχετίζονται με τη δομή, την σύνθεση και την παραγωγή των πρωτεϊνικών αλυσίδων  $\alpha$  και  $\beta$  του μορίου της αιμοσφαιρίνης (Hb) και θεωρούνται ως τα πιο συχνά μονογονιδιακά νοσήματα παγκοσμίως. Κοινός παθογενετικός μηχανισμός για όλες τις αιμοσφαιρινοπάθειες είναι οι μεταλλάξεις ή η απώλεια των αντίστοιχων γονιδίων (Λουκόπουλος Δημήτρης, (2015)). Έχουν αναφερθεί μεταλλάξεις ασήμαντες ή μεταλλάξεις που δημιουργούν ήπια αναιμία. Υπάρχουν όμως και μεταλλάξεις που επηρεάζουν σημαντικά αμινοξέα για την λειτουργικότητα της πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα σοβαρό πρόβλημα για τον οργανισμό.

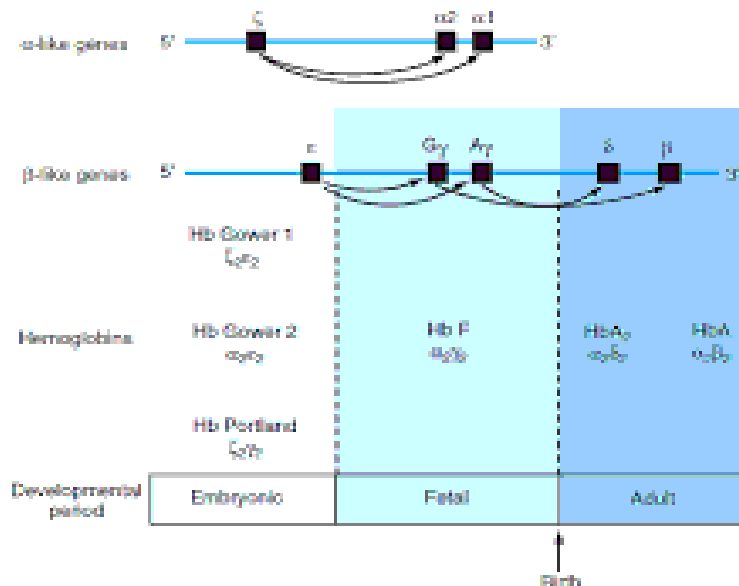
Οι κληρονομικές διαταραχές της αιμοσφαιρίνης μπορούν να χωριστούν σε δύο κύριες ομάδες. Η μία από αυτές είναι οι μεσογειακές αναιμίες στις οποίες είναι εμφανής η παραγωγή μίας από τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες σε χαμηλότερο ποσοστό (ποσοτικές ελλείψεις). Στην δεύτερη ομάδα ανήκουν οι δομικές παραλλαγές της αιμοσφαιρίνης, στις οποίες παρατηρείται σταθερός ρυθμός σύνθεσης της σφαιρίνης, ενώ συγχρόνως είναι εμφανής η τροποποίηση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας (ποιοτικές αλλοιώσεις στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες των σφαιρινών) (Weatherall, (1997), Steinberg et al, (2001)).

Υπάρχει και μία τρίτη κατηγορία διαταραχών, γνωστή ως κληρονομική παραμονή της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης (HPFH) κατά την οποία η σημαντική παραγωγή εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης (αιμοσφαιρίνη F) συνεχίζεται και στην ενηλικίωση (Weatherall (2001)). Στην συγκεκριμένη διαταραχή, παρατηρείται συνεχής έκφραση του γονιδίου της γ-σφαιρίνης κατά την ενήλικη ζωή του ανθρώπου, ενώ φυσιολογικά εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα κατά την εμβρυϊκή ζωή.

Η ταξινόμηση των αιμοσφαιρινοπαθειών βασίζεται στην εκτίμηση της βαρύτητας της νόσου. Διακρίνονται οι μείζονες μορφές με πλήρη συμπτωματολογία και οι ελάσσονες μορφές χωρίς ιδιαίτερα συμπτώματα (Καλλέας, (2010)).

### 2.3 Τα γονίδια της αιμοσφαιρίνης του ανθρώπου

Η κύρια φυσιολογική αιμοσφαιρίνη των ενηλίκων είναι η HbA με σύσταση πρωτεϊνικών αλυσίδων  $\alpha_2\beta_2$ . Ωστόσο, στο ανθρώπινο σώμα, φυσιολογικά υπάρχουν κι άλλοι τύποι αιμοσφαιρίνης. Κάθε μία από αυτές χαρακτηρίζεται από τετραμερή δομή και αποτελείται από 2 αλυσίδες  $\alpha$ -σφαιρίνης ή τύπου  $\alpha$ -σφαιρίνης και 2 αλυσίδες μη  $\alpha$ . Τα γονίδια των αλυσίδων  $\alpha$  και τύπου  $\alpha$  συγκροτούν ένα σύμπλεγμα γονιδίων με διάταξη εν σειρά που χαρτογραφούνται στο χρωμόσωμα 16, ενώ τα γονίδια των αλυσίδων  $\beta$ -σφαιρίνης ή τύπου  $\beta$ -σφαιρίνης καθώς και αυτά των αλυσίδων  $\gamma$ - και  $\delta$ -σφαιρίνης χαρτογραφούνται στο χρωμόσωμα 11. Σε κάθε ομόλογο χρωμόσωμα 16, υπάρχουν δίπλα-δίπλα δύο πανομοιότυπα γονίδια  $\alpha$ -σφαιρίνης, που συμβολίζονται με  $\alpha 1$  και  $\alpha 2$ . Τα γονίδια του συμπλέγματος των γονιδίων της  $\beta$ -σφαιρίνης παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία. Αναμφισβήτητα, όλα τα γονίδια των σφαιρινών έχουν κοινή προέλευση (Gunay et al, (2018), Nussbaum et al, (2011)).



**Εικόνα 4: Οργάνωση των γονιδίων των σφαιρινών του ανθρώπου και οι αιμοσφαιρίνες που παράγονται σε κάθε στάδιο της ανάπτυξης (Nussbaum et al, (2011))**

### 2.4 Γονιδιακή δόση, Οντογένεση και Κλινική διαταραχή

Οι διαφορές στη γονιδιακή δόση και την οντογένεση των α- και β- σφαιρινών αντανακλώνται στην παθογένεια πολλών αιμοσφαιρινοπαθειών. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο της β-σφαιρίνης ευθύνονται σε μεγάλο βαθμό για κάποιο νόσημα \, επειδή μια μετάλλαξη θα επηρεάσει το 50% των β-αλυσίδων. Οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις δεν έχουν αντίκτυπο στο έμβρυο, δεδομένου ότι πριν την γέννηση η κύρια β-σφαιρίνη είναι η γ-σφαιρίνη. Αντιθέτως, μια μετάλλαξη στην α-αλυσίδα θα επηρεάσει μόνο το 25% των αλυσίδων κι αφού οι α-αλυσίδες είναι παρούσες σε όλες τις αιμοσφαιρίνες, οι μεταλλάξεις στις αλυσίδες αυτές προκαλούν σοβαρές διαταραχές από την 6<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης κι έπειτα (Nussbaum et al, (2011)).

## 3. Αιμοσφαιρινοπάθειες

Οι κληρονομικές διαταραχές της αιμοσφαιρίνης είναι δυνατόν να διακριθούν σε τρεις μεγάλες κατηγορίες, ανάλογα με το εάν η μετάλλαξη τροποποιεί την δομή, την σύνθεση ή την αναστροφή των σφαιρινών. Ειδικότερα προκύπτουν:

- Οι δομικές παραλλαγές, όπου παρατηρείται τροποποίηση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας χωρίς να επηρεάζεται ο ρυθμός σύνθεσης της σφαιρίνης
- Τα μεσογειακά σύνδρομα, όπου παρατηρείται μείωση της σύνθεσης μιας ή περισσοτέρων σφαιρινικών αλυσίδων, με συνέπεια την ανισορροπία στις ποσότητες των α- και β- αλυσίδων
- Η κληρονομική διατήρηση της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης, όπου διαταράσσεται η μεταστροφή από τη γ-σφαιρίνη στη β-σφαιρίνη κατά την περιγεννητική περίοδο (Nussbaum et al, (2011)).

### 3.1 Δομικές παραλλαγές της αιμοσφαιρίνης

Οι σημειακές μεταλλάξεις σε ένα από τα δομικά γονίδια των σφαιρινών είναι η κύρια αιτία των αιμοσφαιρινικών παραλλαγών, ενώ ορισμένες οφείλονται σε άλλους πιο σύνθετους μοριακούς μηχανισμούς. Με βάση τον κλινικό φαινότυπο, οι δομικές παραλλαγές της αιμοσφαιρίνης ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες:

- Παραλλαγές που προκαλούν αιμολυτική αναιμία. Η πλειονότητα αυτών των μεταλλαγμένων αιμοσφαιρινών χαρακτηρίζεται από αστάθεια του τετραμερούς συμπλόκου.
- Παραλλαγές με τροποποιημένη ικανότητα μεταφοράς οξυγόνου, λόγω αυξημένης ή μειωμένης συγγένειας για το οξυγόνο ή λόγω σχηματισμού μεθαιμοσφαιρίνης που αδυνατεί να οξυγονωθεί αντιστρεπτά.
- Παραλλαγές που οφείλονται σε μεταλλάξεις στην κωδική περιοχή του γονιδίου και προκαλούν μεσογειακά σύνδρομα λόγω μείωσης της αφθονίας του αντίστοιχου πολυπεπτιδίου της σφαιρίνης. Οι περισσότερες από αυτές τις

μεταλλάξεις διαταράσσουν τον ρυθμό σύνθεσης του mRNA ή της πρωτεΐνης (Nussbaum et al, (2011)).

### 3.1.1 Αιμολυτικές Αναιμίες

#### 3.1.1.1 Αιμοσφαιρίνες με Νέες Φυσικές Ιδιότητες : Δρεπανοκυτταρική Αναιμία

Πρόκειται για μια ανώμαλη αιμοσφαιρίνη που οφείλεται σε αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου. Αποτέλεσμα αυτής της αντικατάστασης είναι η αλλαγή του κωδικονίου του έκτου αμινοξέος που οδηγεί σε αντικατάσταση του γλουταμικού οξέος από την βαλίνη στην θέση 6 της β-σφαιρίνης. Η ομοζυγωτία για αυτή την μετάλλαξη ευθύνεται για την συγκεκριμένη διαταραχή, η οποία παρατηρείται αρκετά συχνά σε ορισμένες γεωγραφικές περιοχές (Nussbaum et al, (2011)).

#### 3.1.1.2 Αιμοσφαιρίνες με Νέες Φυσικές Ιδιότητες : Hb C

Πρόκειται για μια παραλλαγή της αιμοσφαιρίνης που οφείλεται σε αντικατάσταση του γλουταμικού οξέος από την λυσίνη στην θέση 6 της β-σφαιρίνης. Είναι λιγότερο διαλυτή από την HbA και σχηματίζει μικρούς κρυστάλλους μειώνοντας την ελαστικότητα και το χρόνο ζωής των ερυθροκυττάρων (Nussbaum et al, (2011)).

#### 3.1.1.3 Ασταθείς Αιμοσφαιρίνες

Οφείλονται κυρίως σε σημειακές μεταλλάξεις που προκαλούν αποδιάταξη του τετραμερούς της αιμοσφαιρίνης στα ώριμα ερυθροκύτταρα. Αυτά τα αδιάλυτα τετραμερή καθιζάνουν σχηματίζοντας έγκλειστα (σωμάτια Heinz), προκαλώντας καταστροφή της μεμβράνης και αιμόλυση των ώριμων ερυθροκυττάρων (Nussbaum et al, (2011)).

- Παραλλαγές της Αιμοσφαιρίνης με Τροποποιημένη Ικανότητα Μεταφοράς Οξυγόνου

Έχουν σημειωθεί μεταλλάξεις που τροποποιούν την ικανότητα της αιμοσφαιρίνης να μεταφέρει οξυγόνο, ενώ είναι γνωστός ο τρόπος με το οποίο επηρεάζονται λειτουργίες μιας πρωτεΐνης που εξυπηρετούνται από μια περιοχή της, χωρίς να ασκείται επιρροή σε άλλες ιδιότητες του μορίου (Nussbaum et al, (2011)).

- Αιμοσφαιρίνες με Τροποποιημένη Συγγένεια για το Οξυγόνο

Σε αυτή την κατηγορία μεταλλάξεων αποδεικνύεται η σημασία της αλληλεπίδρασης των υπομονάδων για την φυσιολογική λειτουργία μιας πολυμερούς πρωτεΐνης (Nussbaum et al, (2011)).

## 3.2 Μεσογειακά σύνδρομα

Τα μεσογειακά σύνδρομα αποτελούν το πιο κοινό μονογονιδιακό νόσημα με 270 εκατομμύρια φορείς παγκοσμίως. Πρόκειται για μια ομάδα διαταραχών της σύνθεσης αιμοσφαιρίνης που χαρακτηρίζεται από αξιοσημείωτη κλινική ετερογένεια και προκύπτει από μειωμένη έκφραση μίας από τις δύο αλυσίδες σφαιρίνης του μορίου αιμοσφαιρίνης (Mettananda et al, (2018)).

Τα μεσογειακά σύνδρομα κατατάσσονται σύμφωνα με το είδος της αλυσίδας της οποίας η σύνθεση υπολείπεται. Οι βασικές κατηγορίες περιλαμβάνουν την α-Μεσογειακή Αναιμία που οφείλεται σε μειωμένη σύνθεση των α αλυσίδων αιμοσφαιρίνης και τη β- Μεσογειακή Αναιμία που οφείλεται σε μειωμένη σύνθεση των β. Συχνή επίσης είναι και η δβ Μεσογειακή Αναιμία, που οφείλεται σε μειωμένη σύνθεση των β και δ αλυσίδων αιμοσφαιρίνης, ενώ σπανιότερα συναντώνται οι: γ-MA, γδβ-MA, δ-MA, και εγδβ-MA. (Koutelekos, και Haliasos, (2013), Daniel E. Sabath, (2017)).

Η μείωση στην έκφραση μιας από τις αλυσίδες σφαιρίνης έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση περίσσειας πολυπεπτιδίων που κωδικοποιούνται από το μη προσβεβλημένο γονίδιο. Παρατηρείται μη φυσιολογική ωρίμανση των ερυθροκυττάρων, καθώς απουσία της συμπληρωματικής αλυσίδας με την οποία θα σχημάτιζε τετραμερές, η πλεονάζουσα φυσιολογική αλυσίδα καθιζάνει στο εσωτερικό του ερυθροκυττάρου, επιφέροντας πρόωρη καταστροφή του (Nussbaum et al, (2011)).

### 3.2.1 Προέλευση του ονόματος «Μεσογειακή αναιμία»

Ο όρος προέρχεται από την ελληνική λέξη θάλασσα και υποδηλώνει ότι πρόκειται για μια πάθηση που απαντάται σε άτομα μεσογειακής καταγωγής (Nussbaum et al, (2011)).

Στην πραγματικότητα, η Μεσογειακή αναιμία συναντάται σε διάφορες χώρες του κόσμου. Πιο συγκεκριμένα, η συχνότητα της είναι μεγάλη στις περιοχές της Μεσογείου, της Μέσης Ανατολής και της Άπω Ανατολής, ενώ είναι μικρότερη στην ανατολική Ευρώπη. Ωστόσο σε πολύ χαμηλά ποσοστά η νόσος εμφανίζεται στις βόρειες ακτές της Αφρικής και στην Νότια Αμερική. Λόγω της εκτεταμένης μετανάστευσης πληθυσμών τους τελευταίους αιώνες, η νόσος εμφανίζεται με σχετικά υψηλή συχνότητα σε πολλές περιοχές που πρωταρχικά εντοπιζόταν. (Chi-Kong Li, (2017), Henrik Birgens et al, (2009)).

### 3.2.2 Επιδημιολογία

Η μεσογειακή αναιμία παρατηρείται κυρίως σε ανθρώπους που ζουν σε υγρά κλίματα, καθώς η εξάπλωση των παθολογικών αλληλομόρφων ευνοήθηκε στις τροπικές και υποτροπικές περιοχές. Η υψηλή συχνότητα αυτών οφείλεται στο προσαρμοστικό πλεονέκτημα των φορέων έναντι της ελονοσίας που είναι ανάλογο με το πλεονέκτημα των ετεροζυγωτών για την αιμοσφαιρίνη των δρεπανοκυττάρων της ανθεκτικότητας των φορέων στην ελονοσία (Renzo Galanello et al, (2010)).

## 4. Α-Μεσογειακή αναιμία

Η α-μεσογειακή αναιμία είναι κληρονομική διαταραχή των ερυθρών αιμοσφαιρίων που χαρακτηρίζεται από περιορισμό ή καταστολή παραγωγής των αλυσίδων της α-σφαιρίνης, αλλά φυσιολογική παραγωγή των αλυσίδων της β-σφαιρίνης. Τα γονίδια

της ανθρώπινης α-σφαιρίνης εντοπίζονται και αντιγράφονται στο τελομερικό άκρο του μικρού βραχίονα του χρωμοσώματος 16, όπου εμφανίζονται ως διπλασιασμένοι δομικοί τόποι. Η διαγραφή τμημάτων DNA που περιέχουν έναν ή και τους δυο αυτούς δομικούς τόπους α-σφαιρίνης αποτελεί τον πιο συνηθισμένο μοριακό μηχανισμό για την α-μεσογειακή αναιμία (Michel Goossens et al, (1982)).

Ενδεχομένως υπάρχουν αρκετές εκατοντάδες διαφορετικές αλληλεπιδράσεις που θα μπορούσαν να συμβούν μεταξύ του μεγάλου αριθμού καθοριστικών παραγόντων της α-μεσογειακής αναιμίας. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές έχουν ως συνέπεια σοβαρές αιματολογικές ανωμαλίες (D.R. Higgs et al, (1989)).

#### 4.1 Μοριακή βάση της α-μεσογειακής αναιμίας

Η ελλιπής σύνθεση των αλυσίδων της α-σφαιρίνης στην α-μεσογειακή αναιμία προκαλείται συνήθως από ελλείμματα στο σύμπλεγμα των γονιδίων της α-σφαιρίνης στο χρωμόσωμα 16. Υπολογίζεται ότι 128 διαφορετικές διαταραχές προκαλούν α-μεσογειακή αναιμία (Higgs et al, (2009), Harteveld et al, (2010)). Η πλειοψηφία αυτών είναι ελλείμματα, με αποτέλεσμα την μερική απώλεια στη σύνθεση των α αλυσίδων (μεταλλάξεις α<sup>+</sup>), ή ολοκληρωτική απώλεια της σύνθεσης των α γονιδίων από το παθολογικό χρωμόσωμα (μεταλλάξεις α<sup>0</sup>).

Υπάρχουν διάφοροι τύποι μεταλλάξεων και ο καθένας από αυτούς έχει συγκεκριμένο συμβολισμό. Ο συμβολισμός «αα» αντικατοπτρίζει ένα φυσιολογικό αλληλόμορφο με δυο α γονίδια, ο συμβολισμός «-α» δηλώνει έλλειμμα ενός α γονιδίου, ενώ ο «--» έλλειμμα και των δύο α γονιδίων από το ίδιο αλληλόμορφο. Ο εκθέτης χρησιμοποιείται για να επισημάνει το μέγεθος του ελλείμματος ή τη φύση της σημειακής μετάλλαξης. Υπάρχουν επίσης μεταλλάξεις που επηρεάζουν την επεξεργασία του RNA, όπως οι νουκλεοτιδικές αλλαγές στην ουρά πολυαδενυλίωσης του α2 γονιδίου (π.χ. AATAAA>AATAAG και AATAAA> AATGAA).

Οι διαταραχές κατά τη μετάφραση του RNA οφείλονται σε μεταλλάξεις στο κωδικόνιο έναρξης, στο κωδικόνιο τερματισμού, σε μεταλλάξεις μετατοπισμένου πλαισίου καθώς και σε μη νοηματικές μεταλλάξεις.

Τα α γονίδια είναι διπλασιασμένα, δηλαδή, κάθε φυσιολογικό άτομο έχει τέσσερα γονίδια α σφαιρίνης, δύο σε κάθε αντίγραφο του χρωμοσώματος 16 (16p13.3). Εκτός του ότι υπάρχουν δύο ταυτόσημα γονίδια α-σφαιρίνης στο χρωμόσωμα 16, εμφανίζεται μεγάλη ομολογία και στις αλληλουχίες των ιντρονίων τους (2011).

Η διάταξη των περιοχών ομολογίας μέσα και γύρω από τα δύο γονίδια της α-σφαιρίνης διευκολύνει την λανθασμένη στοίχιση και τον ανασυνδυασμό της περιοχής του γονιδίου α1 στο ένα χρωμόσωμα με την αντίστοιχη περιοχή του γονιδίου α2, στο άλλο (Nussbaum et al, (2011)).

#### 4.2 Φαινοτυπική ετερογένεια της α-μεσογειακής αναιμίας

Οι κλινικοί φαινότυποι της α-μεσογειακής αναιμίας κατατάσσονται σε τέσσερις τύπους που κυμαίνονται από ήπιες έως σοβαρές καταστάσεις, ανάλογα με τον αριθμό των ελαττωματικών γονιδίων α-σφαιρίνης.

Σε γενικές γραμμές, η έλλειψη ενός μόνο α-γονιδίου (-α/αα) οδηγεί σε πολύ ήπιες κλινικές καταστάσεις που αναφέρονται ως κατάσταση σιωπηλού φορέα. Στην περίπτωση αυτή παρατηρείται, μικρή ανισορροπία στην παραγωγή α και μη α αλυσίδων σφαιρίνης, φυσιολογικές τιμές HbA2 και ήπια μικροκυττάρωση, με ή χωρίς

αναιμία. Στους φορείς του στίγματος α-θαλασσαιμίας, στους οποίους παρατηρούνται ελλείμματα και των δύο α γονιδίων (-α/-α ή -/αα), η κατάσταση είναι σοβαρότερη με την ήπια ή μέτρια μικροκυτταρική και υποχρωμική αναιμία να κυριαρχούν (Higgs et al, (2010), Weatherall, (2010)). Συνήθως η απώλεια των α γονιδίων οφείλεται σε ελλείμματα, και σπανιότερα σε σημειακές μεταλλάξεις και μικρά ελλείμματα (Weatherall (1997a), Weatherall (1997b)).

**Πίνακας 1. Φαινότυπος-Γονότυπος στην α-μεσογειακή αναιμία**

Αριθμός γονιδίων	λειτουργικών	Γονότυπος	Φαινότυπος
4		αα/αα	Φυσιολογικός
3		α-/αα	Ετερόζυγος α-μεσογειακή αναιμία <<Σιωπηλός Φορέας>>
2		--/αα	Ετερόζυγος α-μεσογειακή αναιμία
1		α-/α-	Ετερόζυγος α-μεσογειακή αναιμία
1		α/--	Νόσος HbH HbH = β4
-		--/--	Εμβρυϊκός Ύδρωπας με Hb του Bart's (γ=4)

Η αιμοσφαιρινοπάθεια Η γνωστή και ως ενδιάμεση α-μεσογειακή αναιμία, προκύπτει συχνά από τη διαγραφή τριών γονιδίων α-σφαιρίνης. Είναι το αποτέλεσμα μιας σύνθετης ετεροζυγωτίας για α<sup>+</sup> και α<sup>0</sup> μεταλλάξεις και θεωρείται μια μέτρια έως σοβαρή μορφή της α-μεσογειακής αναιμίας. Στο σύνδρομο αυτό, η μειωμένη παραγωγή α πολυπεπτιδικών αλυσίδων οδηγεί σε αυξημένη αναλογία β προς α σφαιρίνων στο αίμα. Συμπτώματα μπορούν να εκδηλωθούν σε οποιαδήποτε ηλικία. Οι μορφές της νόσου HbH που δημιουργούνται από σημειακές μεταλλάξεις είναι πιο σοβαρές από εκείνες που προκλήθηκαν από κοινά ελλείμματα. Οι ασθενείς με HbH συνήθως παρουσιάζουν ηπατοσπληνομεγαλία, ίκτερο σε διαφορετικό βαθμό, χολολιθίαση και σοβαρά αιμολυτικά επεισόδια επαγόμενα από μολύνσεις ή φαρμακευτικές αγωγές (Raffaella Origa, MD et al, (2005)).

Το σύνδρομο Hb Bart's είναι η πιο σοβαρή μορφή α-μεσογειακής αναιμίας, ως αποτέλεσμα διαγραφής και των τεσσάρων γονιδίων α-σφαιρίνης. Το σύνδρομο αυτό προκύπτει από την κληρονόμηση δύο α μεταλλάξεων, ή εξαιτίας σύνθετης ετεροζυγωτίας για μια σημειακή μετάλλαξη και ένα 0 έλλειμμα α. Σε αυτό το σύνδρομο το μεγαλύτερο μέρος της αιμοσφαιρίνης αποτελείται από μη λειτουργικά ομοτετραμερή γ4 και β4, με επίσης μεταβλητές ποσότητες της εμβρυϊκής Hb Portland, η οποία είναι ο μόνος λειτουργικός τύπος αιμοσφαιρίνης σε αυτούς τους ασθενείς. Η αιμοσφαιρίνη Bart είναι ένας ανώμαλος τύπος αιμοσφαιρίνης, η οποία συσσωρεύεται στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Έχει εξαιρετικά υψηλή συγγένεια για το οξυγόνο, με



αποτέλεσμα το συγκεκριμένο χημικό στοιχείο να μην παρέχεται αποτελεσματικά στους ιστούς. Η σοβαρότητα της αναιμίας και η καρδιακή ανεπάρκεια, μαζί με άλλα χαρακτηριστικά αυτού του συνδρόμου, το καθιστούν ασύμβατο με την ζωή (Higgs (1993), Weatherall et al, (2001), Grosso et al, (2012)). Στην πλειοψηφία των ασθενών η πορεία της νόσου είναι ομαλή. Ωστόσο, υπάρχουν πάσχοντες που επηρεάζονται σοβαρά (Lorey et al, (2001), Chui et al (2003)).

Οι Hb Bart's και HbH λόγω της ανικανότητάς τους να απελευθερώσουν κάτω από φυσιολογικές συνθήκες το οξυγόνο στους ιστούς, είναι εντελώς αναποτελεσματικοί φορείς φορείς οξυγόνου (Nussbaum et al, (2011)).

### 4.3 Ανάλυση αιμοσφαιρίνης

Η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση αιμοσφαιρίνης προσδιορίζει την ποσότητα και τον τύπο της Hb που υπάρχει. Το πρότυπο Hb στην α-μεσογειακή αναιμία ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο α-μεσογειακής αναιμίας.

Οι τύποι Hb που σχετίζονται περισσότερο με την α-μεσογειακή αναιμία είναι:

- Αιμοσφαιρίνη A (HbA). Δύο αλυσίδες α-σφαιρίνης και δύο αλυσίδες β-σφαιρίνης ( $\alpha_2\beta_2$ ).
- Αιμοσφαιρίνη F (HbF). Δύο αλυσίδες α-σφαιρίνης και δύο αλυσίδες γ-σφαιρίνης ( $\alpha_2\gamma_2$ ).
- Αιμοσφαιρίνη Bart (Hb Bart). Τέσσερις αλυσίδες γ-σφαιρίνης ( $\gamma_4$ ).
- Αιμοσφαιρίνη H (HbH). Τέσσερις αλυσίδες β-σφαιρίνης ( $\beta_4$ ).
- Αιμοσφαιρίνη A2 (HbA2). Δύο αλυσίδες α-σφαιρίνης και δύο αλυσίδες δ-σφαιρίνης ( $\alpha_2\delta_2$ ).
- Αιμοσφαιρίνη Πόρτλαντ. Δύο αλυσίδες ζ-σφαιρίνης και δύο αλυσίδες γ-σφαιρίνης ( $\zeta_2\gamma_2$ ) (Raffaella Origa, MD et al, (2005)).

### 4.4 Γενετική συμβουλευτική

Η α-μεσογειακή αναιμία συνήθως κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο. Κατά τη σύλληψη, κάθε άτομο με σύνδρομο Hb Bart έχει 25% πιθανότητα να αποκτήσει απογόνο με σύνδρομο Hb Bart, πιθανότητα 50% να έχει χαρακτηριστικό α-μεσογειακής αναιμίας με διαγραφή ή απενεργοποίηση δύο γονιδίων στο cis (-/aa) και μια πιθανότητα 25% να παραμείνει ανεπηρέαστο.

Η γενετική συμβουλευτική έχει την δυνατότητα εκτίμησης γενετικού κινδύνου με την χρήση οικογενειακού ιστορικού και εξετάσεων που υποδηλώνουν την γενετική κατάσταση των μελών της οικογένειας (Raffaella Origa et al, (2005)).

## 5. Β-Μεσογειακή αναιμία

Οι β-μεσογειακές αναιμίες αποτελούν μια ομάδα κληρονομικών νοσημάτων που εμφανίζει πολλές ομοιότητες με την ομάδα των α-μεσογειακών αναιμιών. Η

ελαττωμένη παραγωγή της β-σφαιρίνης προκαλεί υποχρωματική μικροκυτταρική αναιμία ενώ η ποσοτική ανισορροπία στην σύνθεση των σφαιρινών οδηγεί σε καθίζηση της περίσσειας των α-αλυσίδων, η οποία οδηγεί σε καταστροφές στην μεμβράνη των ερυθροκυττάρων. Ωστόσο, οι β-σφαιρίνες είναι σημαντικές μόνο κατά την μεταγεννητική περίοδο (Nussbaum et al, (2011)).

### 5.1 Β-Μεσογειακή αναιμία, Σύνθετες Μεσογειακές Αναιμίες και Κληρονομική Διατήρηση της Εμβρυϊκής Αιμοσφαιρίνης.

Οι μεταλλάξεις του συμπλέγματος της β-σφαιρίνης διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες με διαφορετικούς κλινικούς φαινοτύπους. Η πρώτη κατηγορία μεταλλάξεων οδηγεί σε διαταραχή της παραγωγής της β-σφαιρίνης και προκαλεί απλή β-μεσογειακή αναιμία. Η δεύτερη κατηγορία μεταλλάξεων περιλαμβάνει μεγάλα χρωμοσωματικά ελλείματα, προκαλώντας απώλεια του γονιδίου της β-σφαιρίνης ή άλλων γονιδίων του συμπλέγματος ή της περιοχής ελέγχου του γενετικού τόπου που οδηγεί σε σύνθετη β-μεσογειακή αναιμία. Κάποια ελλείματα έχουν ως αποτέλεσμα έναν διαφορετικό φαινότυπο γνωστό ως κληρονομική διατήρηση της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης (Nussbaum et al, (2011)).

### 5.2 Μοριακή βάση της β-μεσογειακής αναιμίας

Η β-μεσογειακή αναιμία προκαλείται από πολλούς διαφορετικούς τύπους μοριακών βλαβών όπως διαγραφές γονιδίων (Sarker NR et al, (2014)), καθώς επίσης αναστροφές και παρεμβολές (Laura Bull, (2013)). Η κύρια αιτία αυτού του νοσήματος είναι οι σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου της β-σφαιρίνης, καθώς η ελαττωμένη σύνθεση της β-αλυσίδας λόγω βλάβης στο ένα ή τα δύο β γονίδια ευθύνεται γι αυτό. Η βλάβη μπορεί να είναι απώλεια του β-γονιδίου από το χρωμόσωμα 11 ή μεταλλάξεις που επιφέρουν την πλήρη αναστολή ή την υπολειτουργία του (Gabriela E. Martyn et al, (2017)). Η αναστολή ασκείται σε πολλά επίπεδα: μείωση της λειτουργίας των υποκινητών, αναστολή της έναρξης της μεταγραφής, διακοπή της μεταγραφής πριν από το κανονικό σήμα τερματισμού, ελαττωματική αποκοπή των παρεμβαλλόμενων αλληλουχιών, απώλεια της σταθερότητας του αγγελιοφόρου RNA λόγω ελαττωματικής προσθήκης της πολυαδενυλικής ουράς και άλλα.

Πιο συγκεκριμένα, με βάση τον μηχανισμό με τον οποίο κάθε μετάλλαξη επηρεάζει την έκφραση του β γονιδίου, οι μεταλλάξεις της β-μεσογειακής αναιμίας διακρίνονται οι εξής:

- Μεταλλάξεις που επηρεάζουν το επίπεδο μεταγραφής. Οι περισσότερες εντοπίζονται στον υποκινητή του β γονιδίου, μειώνουν την παραγωγή της β αλυσίδας με αποτέλεσμα φαινότυπο ήπιας β<sup>+</sup> μεσογειακής αναιμίας.
- Μεταλλάξεις στη θέση έναρξης της μεταγραφής που επίσης οδηγούν σε φαινότυπο ήπιας β<sup>+</sup> μεσογειακής αναιμίας.
- Μεταλλάξεις που επηρεάζουν την αποκοπή του 3' άκρου του mRNA και την προσθήκη της poly-A αλληλουχίας και προκαλούν φαινότυπο β<sup>+</sup> μεσογειακής αναιμίας.
- Μεταλλάξεις που επηρεάζουν την αποκοπή και επανασυγκόλληση του mRNA. Πρόκειται για μεταλλάξεις που βρίσκονται στις αλληλουχίες συνήθως στη

θέση δότη (5' άκρο) και στη θέση δέκτη (3' άκρο) στους κόμβους αποκοπής των εξωνίων και προκαλούν φαινότυπο  $\beta^+$  μεσογειακής αναιμίας.

- Μεταλλάξεις που επηρεάζουν τη μετάφραση. Οι μεταλλάξεις αυτές εντοπίζονται στην περιοχή των εξωνίων και οδηγούν κυρίως σε πλήρη κατάργηση της σύνθεσης της  $\beta$  αλυσίδας, δηλαδή σε  $\beta^0$  μεσογειακή αναιμία.
- Μεταλλάξεις τύπου ελλείμματος. Στην  $\beta$ -μεσογειακή αναιμία σπάνια παρατηρούνται ελλείματα που αφορούν αποκλειστικά το  $\beta$  γονίδιο της αιμοσφαιρίνης (Kanavakis ET-SJ, 2006). Molecular basis of thalassaemia syndromes. In: Beaumont CB, P.; Beuzard, Y.; Brugnara C (ed) Disorders of iron homeostasis, erythrocytes, erythropoiesis. pp 210- 227 .

### 5.3 Φαινοτυπική ετερογένεια $\beta$ -μεσογειακής αναιμίας

Το νόσημα χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια. Έχει γνωστοποιηθεί πως ελέγχεται από πολλαπλά αλληλόμορφα και καθένα από αυτά είναι αποτέλεσμα διαφορετικής μετάλλαξης. Έτσι, η διαταραχή μπορεί να είναι από ασυμπτωματική έως κλασσική, θανατηφόρα αναιμία του Cooley.

Η εμφάνιση ποικίλων φαινοτύπων στην  $\beta$ -μεσογειακή αναιμία είναι αποτέλεσμα του βαθμού της ανισορροπίας των αλυσίδων σφαιρίνης (Weatherall (2001)). Οι πιο σοβαρές μορφές αντιπροσωπεύονται από την μείζονα  $\beta$ -μεσογειακή αναιμία, κατάσταση που συχνά προκύπτει από ομοζυγωτία ή σύνθετη ετεροζυγωτία μεταλλάξεων στο γονίδιο  $\beta$ -σφαιρίνης αλλά και από ετεροζυγωτία για επικρατούσες μεταλλάξεις. Το κύριο χαρακτηριστικό τους είναι η σοβαρή αναιμία (Grosso et al, (2012)). Αυτό προκύπτει από την ανεπάρκεια των  $\beta$  αλυσίδων σφαιρίνης και της περίσσειας  $\alpha$  αλυσίδων η οποία προκαλεί βλάβες στα πρόδρομα ερυθροκύτταρα και επιταχύνει την καταστροφή τους είτε στο μυελό των οστών ή το περιφερικό αίμα γεγονός που οδηγεί σε χρόνια αιμολυτική αναιμία (Weatherall (1997a)).

Ηπιότερες μορφές μεσογειακής αναιμίας, που αναφέρονται ως ενδιάμεση μεσογειακή αναιμία. Αυτές οι ενδιάμεσες μορφές παρουσιάζουν ποικίλες κλινικές εικόνες που κυμαίνονται σε σοβαρότητα. Η ηπιότερη κλινική εικόνα αυτών των καταστάσεων μπορεί να εξηγηθεί από την συν-κληρονομία γενετικών παραγόντων που είναι ικανοί να μειώνουν την περίσσεια των αλυσίδων  $\alpha$ -σφαιρίνης ή γενετικών καθοριστών που οδηγούν σε παραμονή των αλυσίδων  $\gamma$ -σφαιρίνης στην ενήλικη ζωή, αυξάνοντας έτσι την παραγωγή της  $\beta$  αλυσίδας σφαιρίνης. Εναλλακτικά, αυτοί οι φαινότυποι μπορεί να οφείλονται σε ομοζυγωτία για ήπιες μεταλλάξεις ή διπλή ετεροζυγωτία για μια ήπια ή σιωπηλή μετάλλαξη και μια πιο σοβαρή βλάβη στα γονίδια  $\beta$ -σφαιρίνης. Μια ακόμα κλινική εικόνα ενδιάμεσης μεσογειακής αναιμίας οφείλεται σε τριπλασιασμό ή τετραπλασιασμό στα  $\alpha$ -γονίδια σφαιρίνης μπορεί να προκαλέσει μια εντονότερη ανισορροπία στην παραγωγή των αλυσίδων σφαιρίνης (Weatherall et al, (2001)).

Η ελάσσονα  $\beta$ -μεσογειακή αναιμία είναι μια περίπτωση, στην οποία οι πάσχοντες κληρονομούν και από τους δύο γονείς τα γονίδια που ευθύνονται για αυτή και χαρακτηρίζεται από ήπια αναιμία και μορφολογικές αλλαγές των ερυθροκυττάρων, τα οποία είναι υποχρωμικά και μικροκυτταρικά. Η σύνθεση  $\beta$ - αλυσίδων διαταρράσσεται με σκοπό να παρατηρηθεί ελαττωμένη σύνθεση των  $\beta$ -αλυσίδων και κατ' επέκταση αυξημένη παραγωγή των  $\gamma$  ή  $\delta$ -αλυσίδων. Έτσι, η αύξηση των ποσοτήτων των αιμοσφαιρινών F και A των ερυθροκυττάρων είναι εμφανής ( Weatherall et al, (2001)). Τα άτομα με ελάσσονα  $\beta$ -μεσογειακή αναιμία, παράγουν μερικές  $\beta$ -αλυσίδες και συνήθως δεν απαιτούν ειδική θεραπεία.

Τέλος, μια σπανιότερη μορφή β-μεσογειακής αναιμίας χαρακτηρίζεται από κανονική τιμές HbA2.

## Πίνακας 2. Φαινότυπος-Γονότυπος στην β-μεσογειακή αναιμία

ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ	ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ	ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ
Σιωπηλός Φορέας	σιωπηλό β/β	Ασυμπτωματικός Χωρίς αιματολογικές ανωμαλίες
Ελάσσων Μεσογειακή Αναιμία	β <sup>0</sup> /β β <sup>+</sup> /β ήπια β <sup>+</sup> /β	Ασυμπτωματική αναιμία Μικροκυττάρωση και Υπερχρωμία
Ενδιάμεση Μεσογειακή Αναιμία		Αργεί να εμφανιστεί Ήπια-μέτρια αναιμία Ανεξάρτητη από μετάγγιση Η κλινική σοβαρότητα είναι μεταβλητή και κυμαίνεται από μικρή έως μεγάλη
Μείζων Μεσογειακή Αναιμία	β <sup>0</sup> /β <sup>0</sup> β <sup>+</sup> /β <sup>+</sup> β <sup>0</sup> /β <sup>+</sup>	Εμφανίζεται νωρίς στη ζωή Σοβαρή αναιμία Οι επιζώντες εξαρτώνται από μετάγγιση αίματος

Σε ασθενείς με β-μεσογειακή αναιμία, η μακροχρόνια θεραπεία μετάγγισης για την αντιμετώπιση της αναιμίας οδηγεί σε τοξική υπερφόρτωση του οργανισμού με σίδηρο και επιπλοκές (Maria Antonietta Castaldi et al, (2016)).

## 5.4 Παθοφυσιολογία

Η μειωμένη ποσότητα ή απουσία αλυσίδων β-σφαιρίνης έχει ως αποτέλεσμα μια περίσσεια αδέσμευτων αλυσίδων α-σφαιρίνης που καθιζάνουν σε ερυθροειδείς προδρόμους στον μυελό των οστών, οδηγώντας στον πρόωρο θάνατό τους και συνεπώς σε αναποτελεσματική ερυθροποίηση (Nussbaum et al, (2011)).

## 6. Γονίδια

Το σώμα μας αποτελείται από κύτταρα, τα οποία αποτελούν την δομική και λειτουργική μονάδα κληρονομικότητας. Στον πυρήνα του κάθε κυττάρου υπάρχει το DNA και σε αυτό βρίσκεται η γενετική πληροφορία που κατευθύνει την εμβρυογένεση, την ανάπτυξη, την αύξηση, τον μεταβολισμό και την αναπαραγωγή, δηλαδή όλες τις διαδικασίες που καθιστούν τον άνθρωπο έναν λειτουργικό οργανισμό. Η πληροφορία αυτή κόβεται σε πολλά κομμάτια που καλούνται γονίδια. Κάθε άνθρωπος έχει δυο αντίγραφα από κάθε γονίδιο, ένα από τον κάθε γονέα (<file:///C:/Users/CE%9A%CE%A9%CE%9D%CE%A3%CE%A4%CE%91%CE%9>

D%CE%A4%CE%99%CE%9D%CE%91/Downloads/basics.pdf,  
<http://nf1.bioacademy.gr/index.php/nf-mainmenu-30/mainmenu-32/mainmenu-33>).

Αυτά τα πληροφοριακά γενετικά στοιχεία, καθορίζουν τα χαρακτηριστικά ενός είδους στο σύνολό του αλλά και τα χαρακτηριστικά των οργανισμών που ανήκουν στο συγκεκριμένο είδος (Alberts B et al, (1998)).

## 6.1 Γενετικός Πολυμορφισμός στο ανθρώπινο είδος

Όλοι οι άνθρωποι ανήκουν στο ίδιο είδος, το οποίο χαρακτηρίζεται από γενετική ποικιλότητα από άτομο σε άτομο. Η αλληλουχία του πυρηνικού DNA μεταξύ δύο ατόμων παρουσιάζει 99,9% ομοιότητα. Οι άνθρωποι μεταξύ τους έχουν διαφορετικά αλληλόμορφα γονιδίων, με αποτέλεσμα την προαναφερθείσα ποικιλότητα (Τριανταφυλλίδης, (2013)).

Όλη η γενετική ποικιλότητα είναι προϊόν της συσσώρευσης αλλαγών επί πολλές γενιές. Οι αλλαγές αυτές είναι γνωστές ως **μεταλλάξεις**, ενώ ο συγκεκριμένος όρος παραπέμπει στην αλλαγή του γενετικού υλικού, στον ανασυνδυασμό, στην ανταλλαγή του γενετικού υλικού ανάμεσα στα χρωμοσώματα και στην επιλογή, στην επικράτηση σ' ένα δεδομένο περιβάλλον συγκεκριμένων γονοτύπων που εμφανίζουν μεγαλύτερη ικανότητα προσαρμογής (Russell, (2009)).

Οι σημειακές μεταλλάξεις, οι προσθήκες, οι ελλείψεις και οι αλλαγές στην δομή και τον αριθμό των χρωμοσωμάτων συμπεριλαμβάνονται στους διαφόρους τύπους μεταλλάξεων (Παπαδόπουλος Π. Νικόλαος, (2009)).

Είναι δυνατόν να διακριθούν τρεις κατηγορίες μεταλλάξεων: οι γονιδιωματικές μεταλλάξεις, όπου επηρεάζεται ο αριθμός των χρωμοσωμάτων στο κύτταρο, οι χρωμοσωμικές μεταλλάξεις, όπου αλλοιώνεται η δομή των χρωμοσωμάτων και τις γονιδιακές μεταλλάξεις, όπου τροποποιούνται συγκεκριμένα γονίδια (Nussbaum et al, (2011)).

## 7. Πολυμορφισμοί

Όταν μία μετάλλαξη παρατηρείται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 1% του γενικού πληθυσμού, ονομάζεται πολυμορφισμός (Alberts B et al, (1998)). Ένα λειτουργικό πολυμορφικό γονίδιο είναι μια σταθερή παραλλαγή του γονιδίου, με διαφοροποιημένη ενζυμική δραστηριότητα και με γνωστή συχνότητα σε συγκεκριμένο πληθυσμό (Tribut et al, (2002)). Ειδικότερα, πολυμορφισμοί είναι οι διάφορες εναλλακτικές μορφές (αλληλόμορφα) ενός χρωμοσωμικού τύπου που διαφέρουν ως προς την νουκλεοτιδική αλληλουχία ή περιέχουν μεταβλητό αριθμό διαδοχικά επαναλαμβανόμενων νουκλεοτιδικών μονάδων. Ένας πολυμορφισμός μπορεί να προκληθεί από την προσθήκη ενός νουκλεοτιδίου, την διαγραφή ή την αντικατάσταση.

### 7.1 Μοριακή βάση πολυμορφισμών

Οι πολυμορφισμοί επηρεάζουν την έκφραση γονιδίων ή την καταλυτική δράση των παραγόμενων ενζύμων με ποικίλους τρόπους. Πολυμορφισμοί έχουν παρατηρηθεί και στην μη κωδική περιοχή του γονιδίου. Τότε, επηρεάζονται στοιχεία που ελέγχουν την έκφραση των ενζύμων, καθώς παραλλαγές του σήματος πολυαδενυλίωσης

επηρεάζουν την ποσότητα του παραγόμενου ενζύμου, ενώ η ενίσχυση του γονιδίου αυξάνει την ποσότητά του. Τέλος, σύνθετες αλληλεπιδράσεις πολυμορφικών γονιδίων και προϊόντων ενζυμικής κατάλυσης έχουν παρατηρηθεί (Bartsch et al, (2000)).

## 7.2 Είδη πολυμορφισμών του DNA

Η διαφορά στην αλληλουχία μεταξύ των διαφορετικών αλληλομόρφων ορίζει τα είδη των πολυμορφισμών του DNA. Οι κατηγορίες αυτών είναι οι ακόλουθες: α) Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs), β) Πολυμορφισμοί ελλείματος-ένθεσης

### *α) Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί*

Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί δημιουργούνται από αυθόρμητες μεταλλάξεις κατά την αντιγραφή και ευθύνονται για μεγάλο ποσοστό γενετικής ποικιλομορφίας (Gunderson, Steemers, Lee, Mendoza & Chee, 2005). Σε αυτού του είδους τους πολυμορφισμούς παρατηρείται μια αλλαγή σε ένα ζεύγος βάσεων, ενώ η συχνότητα εμφάνισής τους είναι αυξημένη. Με τον όρο SNP γίνεται αναφορά σε σημειακές νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις, σε μονονουκλεοτιδικές ενθέσεις και απαλοιφές (Krawitz et al, (2010)). Οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις συνήθως είναι αυτόματες. Μετά την δράση μηχανισμών επιδιόρθωσης, οι βλάβες στο γονιδίωμα περιορίζονται σε ποσοστό 1 στις  $10^9$  αντιγραφόμενες βάσεις. Υπάρχουν όμως και παράγοντες οι οποίοι αυξάνουν σημαντικά το ποσοστό αυτό, όπως τα χημικά μεταλλαξιγόνα (ανάλογα βάσεων, οι αλκυλιωτικοί παράγοντες, τα παρεμβαίνοντα αντιδραστήρια, άλλες ενώσεις? που επιδρούν στο DNA και η ιοντίζουσα ακτινοβολία) και οι θερμικές μεταβολές στο εσωτερικό του κυττάρου, οι οποίοι παίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία μεταλλάξεων (Connor JM et al, (1993)).

### *β) Πολυμορφισμοί ελλείματος-ένθεσης*

Οι πολυμορφισμοί αυτοί είναι το αποτέλεσμα της ποικιλότητας που οφείλεται σε ελλείματα ή ενθέσεις τμημάτων DNA μήκους 2 έως 100 νουκλεοτιδίων. Ο αριθμός εμφάνισης τους στο γονιδίωμα ανέρχεται σε εκατοντάδες χιλιάδες (Nussbaum et al, (2011)). Οι μισοί από αυτούς τους πολυμορφισμούς διαθέτουν δύο μόνο αλληλόμορφα και καλούνται απλοί. Οι υπόλοιποι χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη πολλαπλών αλληλομόρφων. Οι συγκεκριμένοι διακρίνονται σε δυο υποκατηγορίες, στους μικροδορυφόρους και στους μινιδορυφόρους.

#### *– Μικροδορυφόροι ή Βραχείες διαδοχικές επαναλήψεις (SSRs)*

Οι βραχείες διαδοχικές επαναλήψεις ή μικροδορυφόροι αποτελούνται από μία έως μερικές δεκάδες επαναλήψεις δι-, τρι-, τετρα- νουκλεοτιδικής μονάδας. Θεωρούνται άριστοι μοριακοί δείκτες εξαιτίας κάποιων χαρακτηριστικών όπως η παρουσία τους στο γένωμα όλων των οργανισμών, ο συγκυρίαρχος τρόπος κληρονομίησης και η δυνατότητα για αυτοματοποιημένη ανάλυσή τους (Rafalski et al, (1993)). Στα χαρακτηριστικά αυτά συμπεριλαμβάνεται και το υψηλό επίπεδο πολυμορφισμού των μικροδορυφορικών δεικτών (Rafalski et al, (1993)) που οφείλεται και στον υψηλό ρυθμό μετάλλαξης των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (Peakall et al, (1998)).

Επομένως, οι μικροδορυφόροι συνήθως έχουν πολλαπλά αλληλόμορφα στο πληθυσμό (Τριανταφυλλίδης, (2013)).

Οι SSRs μπορούν να απομονωθούν απευθείας από τράπεζες DNA ή από ειδικές τράπεζες μικροδορυφόρων (Budak et al, (2003)) ενώ το μικρό μέγεθος των πολυμορφισμών αυτών επιτρέπει την ανίχνευσή τους με PCR με εκκινητές εκατέρωθεν του πολυμορφισμού.

- *Μινιδορυφόροι ή Ποικίλλου αριθμού διαδοχικές επαναλήψεις (VNTRs)*

Οι ποικίλλου αριθμού διαδοχικές επαναλήψεις ή μινιδορυφόροι είναι μικρές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες μήκους 6 έως 100 bp που επαναλαμβάνονται διαδοχικά από δυο μέχρι εκατοντάδες φορές (Τριανταφυλλίδης, (2013)). Οι συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί χαρακτηρίζονται από την παρουσία πολλαπλών αλληλομόρφων και κατά συνέπεια είναι απίθανο δύο μη συγγενικά άτομα να έχουν τα ίδια αλληλόμορφα (Nussbaum et al, (2011)). Το μήκος των δεικτών αυτών μπορεί να αυξηθεί ή να μειωθεί, ώστε να ανιχνευτούν οι κατάλληλοι πολυμορφισμοί του γονιδιακού υλικού (Bruford et al, (1993)).

Η ανάλυση κατά Southern με την χρήση ενός τμήματος της επανάληψης του μινιδορυφόρου ως ανιχνευτή επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλών ανόμοιων τόπων, εφόσον οι αλληλουχίες των μινιδορυφόρων διαφορετικών πολυμορφισμών VNTR είναι παρόμοιες (Nussbaum et al, (2011)).

- *Πολυμορφισμοί Αριθμού Αντιγράφων (CNPs)*

Οι πολυμορφισμοί αριθμού αντιγράφων οφείλονται στην ποικιλότητα στον αριθμό των αντιγράφων μεγάλων τμημάτων του γονιδιώματος. Οι πολυμορφισμοί μπορεί να έχουν είτε δυο αλληλόμορφα (διακρίνονται από την παρουσία ή απουσία του τμήματος) ή περισσότερα. Η ταυτοποίησή τους πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή της τεχνολογίας των συστοιχιών συγκριτικής γονιδιωματικής υβριδοποίησης, αφού η κυτταρογενετική ανάλυση και ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του DNA δεν συνίσταται λόγω του μικρού και μεγάλου μεγέθους τους αντίστοιχα.

### **7.3 Γενετικοί πολυμορφισμοί και μελέτες σύνδεσης γονότυπου-φαινοτύπου**

Υπάρχει δυνατότητα συσχέτισης των γενετικών πολυμορφισμών και των ανθρώπινων ασθενειών. Στην μελέτη συσχέτισης με το γονιδίωμα (GWAS) έχει ανατεθεί ο συγκεκριμένος ρόλος. Η συχνότητα των δευτερευόντων αλληλομόρφων, το μέγεθος της επίδρασης του πολυμορφισμού, το μέγεθος του εξεταζόμενου δείγματος και ο βαθμός εξάρτησης του υπεύθυνου χαρακτηριστικού από τους γενετικούς παράγοντες είναι κάποιοι από τους παράγοντες που επηρεάζουν την πιθανότητα συσχέτισης γονότυπου-φαινοτύπου (Evans et al, (2012)).

### **7.4 Οι πολυμορφισμοί ως χρήσιμα εργαλεία στην Ιατρική**

Οι πολυμορφισμοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως γενετικοί δείκτες στην ταυτοποίηση διαφόρων ειδών καθώς και στην προγεννητική διάγνωση. Η χρήση αυτών είναι καθοριστικής σημασίας στην ταυτοποίηση ετεροζυγωτών καθώς και στην

γονοτύπιση ιστών. Τέλος, βοηθούν στην ταυτοποίηση στις τράπεζες αίματος και στην εξατομικευμένη θεραπεία.

## **8. Υλικά και Μέθοδοι**

Για την διάγνωση των αιμοσφαιρινοπαθειών κρίνεται αναγκαία η εκτίμηση αιματολογικών και βιοχημικών παραμέτρων. Στην συγκεκριμένη εργασία, η εκτίμηση των παραμέτρων επιτεύχθηκε με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης κατά την οποία τα ιονισμένα μόρια της αιμοσφαιρίνης συνδέονται με κόκκους αντίθετα φορτισμένων ουσιών και εκλούνται προοδευτικά ανάλογα με το φορτίο τους. Παράλληλα, ο ποσοτικός προσδιορισμός της HbA2 αιμοσφαιρίνης είναι εφικτός με την παρατήρηση χαρακτηριστικών δομών στο κυτταρόπλασμα των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Τα ενδοκυτταρικά έγκλειστα εμφανίζονται σε περιπτώσεις μεσογειακών συνδρόμων, ενώ απουσιάζουν από τα ερυθρά αιμοσφαίρια υπό φυσιολογικές συνθήκες. Πρόκειται για αδέσμευτες αλυσίδες αιμοσφαιρίνης που χρησιμοποιούνται στην ανίχνευση κάποιων αιματολογικών διαταραχών.

### **8.1 Βιολογικό υλικό**

Στην παρούσα διατριβή έλαβαν μέρος 97 άτομα-κάτοικοι Θεσσαλίας, οι οποίοι προσήλθαναν στο εργαστήριο Αιμοδοσίας και Αιματολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Αφού έγινε αιμοληψία από στελέχη του εργαστηρίου, εξετάστηκε δείγμα γενικής αίματος. Οι μέθοδοι ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται παρακάτω.

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας συμπεριλήφθηκε και η μελέτη των πολυμορφισμών που ευθύνονται για την α- και την β-μεσογειακή αναιμία, η οποία κατέστη δυνατή από δείγματα αρχείου.

### **8.2 Εργαστηριακοί Μέθοδοι**

#### **8.2.1 Συλλογή δειγμάτων**

Έγινε συλλογή των δειγμάτων ολικού αίματος σε σωληνάριο κενού που περιέχει αντιπηκτικό.

#### **8.2.2 Ποιοτικός έλεγχος**

Σύμφωνα με την ορθή εργαστηριακή πρακτική, σε κάθε κύκλο αναλύσεων περιλαμβάνονταν δείγματα υψηλού και χαμηλού μάρτυρα.

### **8.3 Υγρή Χρωματογραφία Ιοντοανταλλαγής Υψηλής Απόδοσης (High-Pressure Liquid Chromatography, HPLC)**

Η χρωματογραφία υψηλής πίεσης ανήκει στις χρωματογραφικές τεχνικές, άρα ο διαχωρισμός είναι αποτέλεσμα της συνδυαστικής δράσης μιας στατικής και μιας



κινητής φάσης. Στην HPLC, το δείγμα εισάγεται στη κορυφή της στήλης και με τη βοήθεια της κινητής φάσης, τα συστατικά του μετακινούνται με τη μορφή ζωνών και τελικά εκλούνται το ένα μετά το άλλο. Οι αναλυόμενες ουσίες κατανέμονται μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης, με αποτέλεσμα να μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες κατά μήκος της στήλης.

Το υλικό της στήλης αυτής είναι πολύ λεπτό, έτσι ώστε να παρέχονται περισσότερες θέσεις αλληλεπίδρασης άρα και μεγαλύτερη διαχωριστική ικανότητα. Λόγω λεπτής κοκκομετρίας του υλικού, η εφαρμογή πίεσης είναι απαραίτητη για την ικανοποιητική ροή. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η υψηλή διαχωριστική ικανότητα αλλά και ο γρήγορος διαχωρισμός. Σε μια τυπική διάταξη HPLC, τοποθετείται ακριβώς μετά την στήλη ένας ανιχνευτής για την καταγραφή της απορροφητικότητας του εκλουσμένου υλικού σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος. (Berg Jeremy M. et al, (2012)).

#### 8.4 Υλικά

Ο αναλυτής που χρησιμοποιήθηκε για την συγκεκριμένη τεχνική είναι το πλήρως αυτοματοποιημένο σύστημα ελέγχου αιμοσφαιρίνης VARIANT™ II.



**Εικόνα 5: Αυτοματοποιημένο σύστημα ελέγχου αιμοσφαιρίνης VARIANT™ II.**

<http://www.bio-rad.com/en-gr/product/variant-ii-instrumentation?ID=e3fd66ea-7a7b-4752-a9c3-38c8c6ea85f0>

#### 8.5 Σύνοψη και επεξήγηση της δοκιμασίας

Το VARIANT II HbA2/HbA1c Dual Program (BIO-Rad) βασίζεται στις αρχές της υγρής χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής υψηλής απόδοσης (HPLC) για τον αυτόματο διαχωρισμό των φυσιολογικών και παθολογικών αιμοσφαιρινών και για τον ακριβή προσδιορισμό των αιμοσφαιρινών A2, F και A1c σε δείγματα ολικού αίματος, χωρίς παρεμβολές από την παρουσία ασταθούς A1c, λιπαιμίας ή διακυμάνσεων της

θερμοκρασίας. Το HbA2/HbA1c Dual Program περιλαμβάνει δύο διαθέσιμες μεθόδους. Για την ανάλυση των HbA2, HbF, παθολογικών αιμοσφαιρινών και της HbA1c παρουσία παραλλαγμένων μορφών αιμοσφαιρίνης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος V2\_B-THAL\_DU.

#### **Επιμέρους στοιχεία της δοκιμασίας**

- VARIANT II Dual Kit Recorder Pack
- Ρυθμιστικό διάλυμα 1, 3 x 2000 ml, ρυθμιστικό διάλυμα BIS-TRIS/φωσφορικού νατρίου, περιέχει αζίδιο του νατρίου(<0,05%)
- Ρυθμιστικό διάλυμα 2, 1 x 2500 ml, ρυθμιστικό διάλυμα BIS-TRIS/φωσφορικού νατρίου, περιέχει αζίδιο του νατρίου(<0,05%)
- Διάλυμα έκπλυσης/αραίωσης, 3 x 1900 ml, περιέχει αζίδιο του νατρίου(<0,05%)
- β-Thal, Σετ βαθμονομητών β-θαλασσαιμίας, λυοφιλιωμένο, 2 επίπεδα 3 x 10 ml, 3 x 5,0 ml, λυοφιλιωμένο αιμόλυμα ανθρώπινων ερυθροκυττάρων, περιέχει γενταμυκίνη, τοπραμυκίνη και EDTA ως συντηρητικά
- HbA1c, Σετ βαθμονομητών HbA1c, λυοφιλιωμένο, 2 επίπεδα 3 x 5,0 ml, 3 x 5,0 ml, λυοφιλιωμένο αιμόλυμα ανθρώπινων ερυθροκυττάρων, περιέχει γενταμυκίνη, τοπραμυκίνη και EDTA ως συντηρητικά
- Αραιωτικό βαθμονομητή, 1 x 100 ml, περιέχει αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό
- Σετ αναλυτικής μικροστήλης, 2 x 1 καθένα εκ των οποίων περιέχει
- 1 μικροστήλη κατιοντοανταλλαγής, εσ. Διάμ. 4,6 x 30 mm
- εκκινητή ολικού αίματος, λυοφιλιωμένο, 1 x 1,0 ml, λυοφιλιωμένο αιμόλυμα ανθρώπινων ερυθροκυττάρων, περιέχει γενταμυκίνη, τοπραμυκίνη και EDTA ως συντηρητικά
- 2 προφίλτρα, 0,5 μm x 4 mm, για 400 ενέσεις το καθένα
- Σωληνάρια δείγματος 1,5 ml, 1 x 100, με διατρήσιμα πώματα
- CD-ROM, περιέχει το πλήρες λογισμικό του VARIANT II Dual kit (Μέθοδοι V2\_A1C\_DUAL και V2\_B-THAL\_DU)





**Εικόνα 6: Επιμέρους στοιχεία της διαδικασίας** (<http://www.bio-rad.com/en-product/variant-ii-instrumentation?ID=e3fd66ea-7a7b-4752-a9c3-38c8c6ea85f0>)

## Διαδικασία

Αρχικά πραγματοποιήθηκε βαθμονόμηση του οργάνου. Το σωληνάριο του τυφλού, οι βαθμονομητές και οι μάρτυρες τοποθετήθηκαν στο σταθμό δειγματοληψίας του VARIANT II. Η χρήση προσαρμογέων μικροσωληναρίων για τα σωληνάρια βαθμονομητών και μαρτύρων 1,5 ml είναι απαραίτητη. Οι προσαρμογείς θα πρέπει να διαθέτουν ραβδοκώδικες που να προσδιορίζουν τον τύπο του δείγματος.

BLANK (Τυφλό)

CALIBRATOR Level 1 (Βαθμονομητής, επίπεδο 1)

CALIBRATOR Level 2 (Βαθμονομητής, επίπεδο 2)

CONTROL Level 1 (Μάρτυρας, επίπεδο 1)

CONTROL Level 1 (Μάρτυρας, επίπεδο 2)

Σειρά δειγμάτων με βαθμονομητές

Αρ. δείγματος	Αντιδραστήριο
•	Τυφλό
•	Βαθμονομητής, επίπεδο 1
•	Βαθμονομητής, επίπεδο 2
•	Μάρτυρας, επίπεδο 1
•	Μάρτυρας, επίπεδο 2
• έως N	Δείγματα ασθενών
N + 1	Μάρτυρας, επίπεδο 1
N + 2	Μάρτυρας, επίπεδο 2
N + 3	Σωληνάριο STOP

Σειρά δειγμάτων με βαθμονομητές

Αρ. δείγματος	Αντιδραστήριο
•	Τυφλό
•	Μάρτυρας, επίπεδο 1

- Μάρτυρας, επίπεδο 2
  - έως N Δείγματα ασθενών
  - N + 1 Μάρτυρας, επίπεδο 1
  - N + 2 Μάρτυρας, επίπεδο 2
  - N + 3 Σωληνάριο STOP
- Ο κύκλος αναλύσεων ξεκινούσε επιλέγοντας <RUN>  
<WORKLIST>  
<START/STOP>.

Μετά την ανάλυση των βαθμονομητών, υπολογίζονταν αυτόματα η κλίση και το σημείο τομής της καμπύλης βαθμονόμησης των αιμοσφαιρινών. Η κλίση και το σημείο τομής χρησιμοποιούνταν για τον υπολογισμό της ποσοστιαίας επιφάνειας των αιμοσφαιρινών σε όλες τις μετέπειτα αναλύσεις του κύκλου. Εάν οι παράμετροι βαθμονόμησης βρίσκονται εκτός του καθορισμένου εύρους, το σύστημα εκτυπώνει μήνυμα σφάλματος. Αφού ολοκληρωθεί η ανάλυση του τελευταίου δείγματος, το σύστημα εκτελεί αυτόματα μια τελική βαθμίδωση και περνά σε κατάσταση READY (Ετοιμότητα), έτσι ώστε να ξεκινήσει ο επόμενος κύκλος αναλύσεων. Αν δεν ξεκινήσει άλλος κύκλος αναλύσεων μέσα σε 30 λεπτά, το σύστημα περνά σε κατάσταση INACTIVE (Ανενεργό).

## 8.6 Ερμηνεία αποτελεσμάτων

### Αναμενόμενο εύρος τιμών της HbA2

Το φυσιολογικό εύρος της HbA2 κυμαίνεται τυπικά μεταξύ 1,7% και 3,2% της συνολικής αιμοσφαιρίνης, ενώ σε ασθενείς με ετερόζυγη β-μεσογειακή αναιμία, τα ποσοστά HbA2, κυμαίνονται μεταξύ 4,0% και 9,0%. Το VARIANT II HbA2/HbA1c Dual Program είναι γραμμικό για ποσοστά HbA2 από 1,2% έως 16% και παρουσιάζει επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων μέτρησης για επίπεδα HbA2 από 1,4% έως 13% περίπου (αποδεκτό εύρος).

### Αναμενόμενο εύρος τιμών της HbF

Το αναμενόμενο εύρος τιμών της HbF είναι τυπικά μικρότερο από 1% της συνολικής αιμοσφαιρίνης. Το εύρος της HbF για ετερόζυγες και ομόζυγες μορφές β-μεσογειακής αναιμίας είναι 1% έως 5% και 80% έως 100%, αντίστοιχα. Το VARIANT II HbA2/HbA1c Dual Program είναι γραμμικό για ποσοστά HbF από 0,7% έως 65% και παρουσιάζει επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων μέτρησης για επίπεδα HbF από 1% έως 40% περίπου (αποδεκτό εύρος αποτελεσμάτων).

### Πίνακας 3. Φυσιολογικά εύρη HbA2, HbF

	<b>HbA2</b>	<b>HbF</b>
<b>N</b>	110	110
<b>Μέση Τιμή</b>	2,80%	0,53%
<b>Εύρος ασφαλείας 95%</b>	2,40-3,20%	0,10-1,80%
<b>Εύρος</b>	2,40-3,20%	0,10-2,10%

## 8.7 Αιματολογική Μελέτη Ερυθροκυτταρικών εγκλειστών

### α) Μέθοδος πριν από την επώαση

Στοχεύει στην διαπίστωση ενδοκυττάρων ιζημάτων αιμοσφαιρίνης και χρησιμοποιείται για την διάγνωση της ομόζυγης β-μεσογειακής αναιμίας, όπου οι αλυσίδες που βρίσκονται σε περίσσεια καθιζάνουν μέσα στα ερυθροκύτταρα.

#### Τεχνική

- 200 μl ολικού αίματος με αντιπηκτικό προστίθενται σε ίσο όγκο χρωστικής Methyl Violet.
- Παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min.
- Από το εναιώρημα παρασκευάζονται επιστρώσεις σε αντικειμενοφόρες πλάκες.
- Παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Όταν υπάρχουν εγκλειστα, φαίνονται σαν μικρά ή μεγάλα μωβ άμορφα κοκκία.

### β) Μέθοδος με επώαση

Κατακρήμνιση ασταθών αλυσίδων αιμοσφαιρίνης μέσα στα ερυθροκύτταρα. Χρησιμεύει για την ανίχνευση ασταθών αλυσίδων αιμοσφαιρίνης και αλυσίδων β (αιμοσφαιρινοπάθεια Η και ετερόζυγη α-μεσογειακή αναιμία).

#### Τεχνική

- Ποσότητα 250 μl δείγματος ολικού αίματος επωάζεται με 50 μl NaNO<sub>2</sub> σε κλίβανο για 30 min στους 37°C.
- Αφαίρεση 200 μl από το δείγμα και τα ερυθροκύτταρα χρωματίζονται με 200 μl χρωστικής Methyl Violet.
- Από το εναιώρημα παρασκευάζονται επιστρώσεις σε αντικειμενοφόρο πλάκες.
- Παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Τα εγκλειστα μοιάζουν με αδρά κοκκία ή είναι έντονα μωβ χρωματισμένα.

## 9. Αποτελέσματα

Σύμφωνα με τον Πίνακα 4 που παρατίθεται παρακάτω, η ανάλυση αφορά δείγματα ατόμων εκ των οποίων οι 24 ήταν άντρες, οι 68 γυναίκες ενώ σε 5 δείγματα δεν αναφερόταν το φύλο στο παραπεμπτικό. Από τα 97 δείγματα που μελετήθηκαν, σε 5 παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα HbF. Η HbF είναι η κυριότερη αιμοσφαιρίνη του εμβρύου, ενώ στον ενήλικα εξακολουθεί να παράγεται σε ποσοστό μικρότερο του 1%. Ειδικότερα, 6 μήνες μετά την γέννηση του ανθρώπου γίνεται η αντικατάσταση της HbF από την HbA<sub>2</sub>. Οι φυσιολογικές τιμές της εμβρυικής αιμοσφαιρίνης στον ανθρώπινο οργανισμό είναι 0-1,17%. Ωστόσο οι αυξημένες τιμές που παρατηρήθηκαν σε κάποια από τα εξεταζόμενα άτομα, δεν υποδηλώνουν απαραίτητα

κάποια παθολογική κατάσταση, αφού είναι πιθανό να οφείλονται στην δημιουργία οξέος ερυθροποιητικού stress. Αυξημένη παραγωγή της HbF σημειώνεται σε ασθενείς μετά από χημειοθεραπεία λόγω συρρίκνωσης του μυελού των οστών. Επιπροσθέτως, υψηλά επίπεδα της συγκεκριμένης αιμοσφαιρίνης προκύπτουν κατά την αναγέννηση του μυελού των οστών έπειτα από μεταμόσχευση ή σε οξεία αιμόλυση. Συχνή περίπτωση όπου το ποσοστό της HbF αυξάνεται και θεωρείται ως φυσιολογική κατάσταση, είναι η εγκυμοσύνη και σχετίζεται με την αυξημένη παραγωγή ερυθροκυττάρων.

Σε 8 άτομα η τιμή της HbA2 βρέθηκε εκτός των φυσιολογικών τιμών, οι οποίες κυμαίνονται από 1,8%-3,5%. Η αιμοσφαιρίνη αυτή είναι μια φυσιολογική αιμοσφαιρίνη και αποτελεί το 2-3% της συνολικής αιμοσφαιρίνης. Αυξημένες τιμές της σχετίζονται με μεγαλοβλαστική αναιμία και β-μεσογειακή αναιμία. Αντιθέτως, χαμηλές τιμές της HbA2 αντικατοπτρίζουν αναιμία, α-μεσογειακή αναιμία, β-μεσογειακή αναιμία, ερυθρολευχαιμία.

**Πίνακας 4. Αποτελέσματα ηλεκτροφορήσεων**

	Φύλο	Ηλικία	HbF	HbA1c	HbA2	Μορφοποίηση ερυθρών	Μετά έκβαση με NaNO <sub>2</sub>	Έγκλειστα ερυθρών	Χωρίς επώαση	Δοκιμασία δρεπανωσης
Κωδικός 1	Άρρεν	86	0%	6%	1,80%	Αναιμία, 3+ Μικροκυτταρωση, 2+ Υποχρωμία, 2+ Ανισοκυττάρωση	-			-
Κωδικός 2	Θήλυ	17	0%	5,40%	2,50%		-			-
Κωδικός 3	Θήλυ	29	0,70%	5,80%	2,60%	1+ Ανισοκυττάρωση	-			-
Κωδικός 4	Άρρεν	-	0,50%	5,90%	2,40%		-			-
Κωδικός 5	Θήλυ	40	1,20%	5,80%	2,50%		-			-
Κωδικός 6	Άρρεν	58	0,50%	5,50%	2,50%		-			-
Κωδικός 7	Άρρεν	-	0,50%	5,20%	2,80%		-			-
Κωδικός 8	Θήλυ	62	0,40%	6,50%	2,30%		-			-
Κωδικός 9	Άρρεν	17	0,20%	4,60%	2,60%		-			-
Κωδικός 10	Άρρεν	-	0%	6,20%	2,60%		-			-
Κωδικός 11	Θήλυ	17	0,40%	5,20%	2,60%		-			-
Κωδικός 12	Θήλυ	-	0%	5,10%	2,80%		-			-
Κωδικός 13	Θήλυ	-	0%	7,80%	2,50%	Ουδετεροφιλία	-			-
Κωδικός 14	Θήλυ	37	0,10%	5,60%	2,60%	Αναιμία, 2+ Μικροκυττάρωση,	-			-

						2+ Υποχρωμία, 1+ Ανισοκυττάρωση			
Κωδικός 15	Θήλυ	28	0%	4,90%	1,60%	Ουδετεροφιλία, 1+ Υποχρωμία	-		-
Κωδικός 16	Άρρεν	66	0%	6,40%	2,50%	1+ Ανισοκυττάρωση	-		-
Κωδικός 17	Θήλυ	30	0,60%	4,70%	2,90%		-		-
Κωδικός 18	Θήλυ	34	1,00%	5,20%	2,90%		-		-
Κωδικός 19	Θήλυ	31	0,70%	5,40%	2,50%		-		-
Κωδικός 20	Θήλυ	43	0,60%	5,60%	2,20%		-		-
Κωδικός 21	Θήλυ	22	1,10%	5,90%	2,30%	Μεγάλα αιμοπετάλια	-		-
Κωδικός 22	Θήλυ	20	0%	5,40%	2,30%	Ηωσινοφιλία	-		-
Κωδικός 23	Θήλυ	15	0%	5,20%	1,90%	Ηωσινοφιλία, Αναιμία, 3+ Μικροκυττάρωση, 3+ Υποχρωμία, 3+ Ανισοκυττάρωση	-		-
Κωδικός 24	Θήλυ	17	1,20%	5,10%	2,50%	1+ Ανισοκυττάρωση	-		-
Κωδικός 25	Θήλυ	82	0%	6,60%	2,40%	Μεγάλα αιμοπετάλια	-		-
Κωδικός 26	Θήλυ	2	30%	0%	4,10%	Λεμφοκυττάρωση, Μονοκυττάρωση, Αναιμία, 3+ Μικροκυττάρωση, 3+ Υποχρωμία	+		+
Κωδικός 27	Θήλυ	27	0,50%	5,40%	2,60%		-		-
Κωδικός 28	Θήλυ	38	0,70%	5,50%	2,30%		-		-
Κωδικός 29	Άρρεν	19	0,20%	5,20%	2,70%		-		-
Κωδικός 30	Άρρεν	44	0%	6,00%	2,20%	1+ Μικροκυττάρωση, 1+ Υποχρωμία, 1+ Ανισοκυττάρωση	-		-
Κωδικός 31	Θήλυ	34	0,50%	5,10%	2,40%		-		-
Κωδικός 32	Θήλυ	-	0,60%	5,40%	2,70%	1+ Ανισοκυττάρωση	-		-
Κωδικός 33	Θήλυ	28	0,80%	5,40%	2,30%	1+ Μικροκυττάρωση,	-		-

						1+ Υποχρωμία, Μεγάλα αιμοπετάλια			
Κωδικός 34	Θήλυ	15	0,80%	5,50%	2,50%	1+ Υποχρωμία, 1+ Ανισοκυττάρωση, Θρομβοπενία, Μεγάλα αιμοπετάλια	-		-
Κωδικός 35	Θήλυ	36	0,60%	5,70%	2,80%		-		-
Κωδικός 36	-	-	0,80%	5,90%	2,70%	1+ Ανισοκυττάρωση	-		-
Κωδικός 37	-	34	1,40%	5,60%	2,50%	1+ Ανισοκυττάρωση	-		-
Κωδικός 38	Θήλυ	23	0%	5,50%	2,50%	1+ Μικροκυττάρωση, 1+ Υποχρωμία, 1+ Ανισοκυττάρωση	-		-
Κωδικός 39	Θήλυ	30	1,00%	5,20%	3,10%		-		-
Κωδικός 40	Άρρεν	67	0,40%	5,70%	2,50%		-		-
Κωδικός 41	Θήλυ	29	0,70%	6,00%	4,70%	3+ Μικροκυττάρωση, 3+ Υποχρωμία, 1+ Ανισοκυττάρωση	+		-
Κωδικός 42	Θήλυ	62	0,50%	5,90%	3,00%	Ουδετεροφιλία, Θρομβοπενία	-		-
Κωδικός 43	Θήλυ	35	0,70%	5,90%	2,70%	1+ Ανισοκυττάρωση	-		-
Κωδικός 44	Θήλυ	17	0,20%	5,30%	3,00%	1+ Ανισοκυττάρωση	-		-
Κωδικός 45	Θήλυ	33	0%	5,40%	2,60%		-		-
Κωδικός 46	Θήλυ	40	0,40%	5,20%	1,90%		-		-
Κωδικός 47	Θήλυ	18	0%	5,70%	1,60%	1+ Μικροκυττάρωση, 1+ Υποχρωμία	-		-
Κωδικός 48	Άρρεν	26	0,40%	5,60%	2,60%		-		-
Κωδικός 49	Θήλυ	22	1,20%	5,60%	2,50%		-		-
Κωδικός 50	Θήλυ	52	2,00%	6,10%	2,90%	Αναιμία, 3+, Μακροκυττάρωση, 3+ Ανισοκυττάρωση, Θρομβοπενία	-		-
Κωδικός	Θήλυ	24	0,50%	5,40%	2,50%		-		-



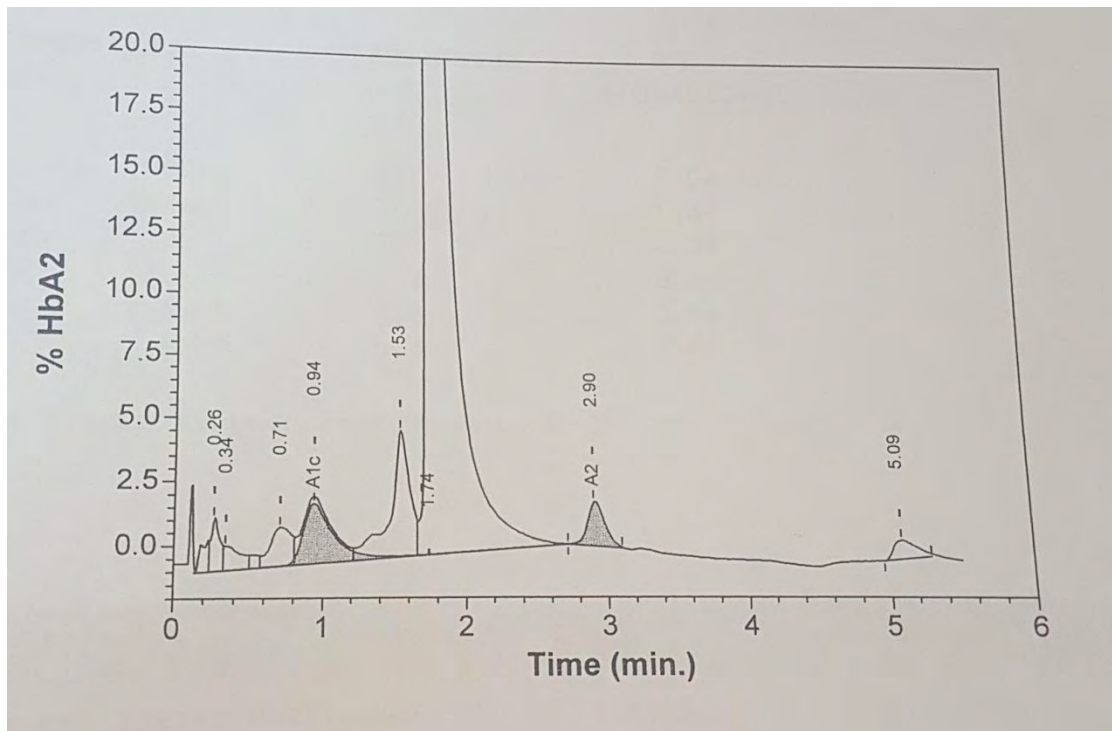
51									
Κωδικός 52	Θήλυ	19	0,80%	4,50%	2,80%		-		-
Κωδικός 53	Θήλυ	54	0,60%	6,00%	2,20%	2+ Μικροκυττάρωση, 2+ Υποχρωμία	+		-
Κωδικός 54	Θήλυ	54	2,30%	5,60%	2,20%		-		-
Κωδικός 55	Θήλυ	30	0,70%	5,30%	2,60%		-		-
Κωδικός 56	Άρρεν	21	0%	4,80%	2,90%		-		-
Κωδικός 57	-	20	1,10%	4,40%	3,00%	1+ Ανισοκυττάρωση	-		-
Κωδικός 58	Θήλυ	-	1,40%	4,40%	3,00%	Μικρά αιμοπετάλια	-		-
Κωδικός 59	Άρρεν	41	10,40 %	3,00%	3,00%	Αναιμία, 3+ Ανισοκυττάρωση	+		+
Κωδικός 60	Άρρεν	22	0,50%	4,70%	2,70%		-		-
Κωδικός 61	Θήλυ	41	1,00%	5,20%	2,20%	Αναιμία	-		-
Κωδικός 62	Άρρεν	44	0%	4,40%	2,60%		-		-
Κωδικός 63	Θήλυ	18	0,40%	4,60%	2,90%		-		-
Κωδικός 64	Θήλυ	33	0%	5,10%	2,70%		-		-
Κωδικός 65	Θήλυ	36	0%	5,70%	2,30%	2+ Μικροκυττάρωση, 1+Υποχρωμία, 1+ Ανισοκυττάρωση	-		-
Κωδικός 66	Θήλυ	21	0,60%	4,00%	2,60%	Ουδετεροφιλία, 1+, Μακροκυττάρωση	-		-
Κωδικός 67	Θήλυ	18	0%	4,50%	2,40%	Ουδετεροφιλία	-		-
Κωδικός 68	Θήλυ	19	0,60%	5,00%	2,40%	1+ Ανισοκυττάρωση	-		-
Κωδικός 69	Θήλυ	28	0,70%	5,60%	2,20%	1+ Μικροκυττάρωση, 1+ Υποχρωμία, 2+ Ανισοκυττάρωση	-		-
Κωδικός 70	Θήλυ	34	1,70%	5,10%	4,70%	Αναιμία, 3+ Μικροκυττάρωση, 3+ Υποχρωμία, 1+ Ανισοκυττάρωση	+		-
Κωδικός 71	Θήλυ	14	0,40%	4,60%	2,40%		-		-
Κωδικός	Θήλυ	22	0,40%	4,90%	2,50%		-		-

72									
Κωδικός 73	Άρρεν	65	1,10%	5,80%	2,50%	1+ Ανισοκυττάρωση	-		-
Κωδικός 74	Θήλυ	16	0,60%	5,30%	2,60%	1+ Ανισοκυττάρωση	-		-
Κωδικός 75	Άρρεν	52	0,70%	5,60%	2,60%	1+, Μακροκυττάρωση, 1+ Ανισοκυττάρωση, Θρομβοπενία	-		-
Κωδικός 76	Θήλυ	57	0%	6,80%	2,40%	1+ Ανισοκυττάρωση	-		-
Κωδικός 77	Θήλυ	33	0,90%	5,10%	2,60%	Μεγάλα αιμοπετάλια	-		-
Κωδικός 78	Θήλυ	16	0,50%	4,50%	2,60%		-		-
Κωδικός 79	Θήλυ	75	0%	6,50%	2,50%		-		-
Κωδικός 80	Θήλυ	23	0,70%	5,10%	3,60%	2+ Μικροκυττάρωση, 2+Υποχρωμία, 1+ Ανισοκυττάρωση	+		-
Κωδικός 81	Θήλυ	36	0,80%	5,10%	2,70%		-		-
Κωδικός 82	Άρρεν	62	0,60%	5,10%	2,80%		-		-
Κωδικός 83	Θήλυ	31	0,70%	5,00%	2,90%	1+ Μικροκυττάρωση, 1+ Υποχρωμία	-		-
Κωδικός 84	Άρρεν	66	0,70%	5,00%	3,80%	1+ Υποχρωμία, 2+ Ανισοκυττάρωση	+		-
Κωδικός 85	Θήλυ	54	0,60%	6,00%	2,20%	2+ Μικροκυττάρωση, 1+ Υποχρωμία	+		-
Κωδικός 86	Άρρεν	48	1,40%	6,00%	5,50%	Ερυθροκυττάρωση, 3+ Μικροκυττάρωση, 3+ Υποχρωμία, 1+ Ανισοκυττάρωση	+		-
Κωδικός 87	Θήλυ	29	0,50%	5,00%	2,60%	1+ Ανισοκυττάρωση, Μεγάλα αιμοπετάλια	-		-
Κωδικός 88	-	37	0,50%	4,70%	2,50%		-		-
Κωδικός 89	Θήλυ	22	0,50%	5,30%	2,50%	1+ Ανισοκυττάρωση	-		-
Κωδικός 90	Άρρεν	44	0%	5,30%	2,40%		-		-

Κωδικός 91	Θήλυ	50	0,50%	4,40%	3,00%	Ερυθροκυττάρωση, 2+ Ανισοκυττάρωση, Θρομβοκυττάρωση , Μικρά αιμοπετάλια	-		-
Κωδικός 92	Θήλυ	19	0%	5,00%	2,20%	1+ Ανισοκυττάρωση	-		-
Κωδικός 93	Άρρεν	2	3,80%	4,80%	5,70%	Λεμφοκυττάρωση, Ερυθροκυττάρωση, 3+ Μικροκυττάρωση, 3+ Υποχρωμία	+		-
Κωδικός 94	Άρρεν	36	0,50%	4,90%	2,60%	Μεγάλα αιμοπετάλια	-		-
Κωδικός 95	-	36	0,50%	5,90%	2,40%	Ουδετεροφιλία, 1+ Ανισοκυττάρωση	-		-
Κωδικός 96	Άρρεν	39	0,40%	5,00%	2,60%		-		-
Κωδικός 97	Θήλυ	15	0,80%	5,00%	2,70	1+ Ανισοκυττάρωση	-		-

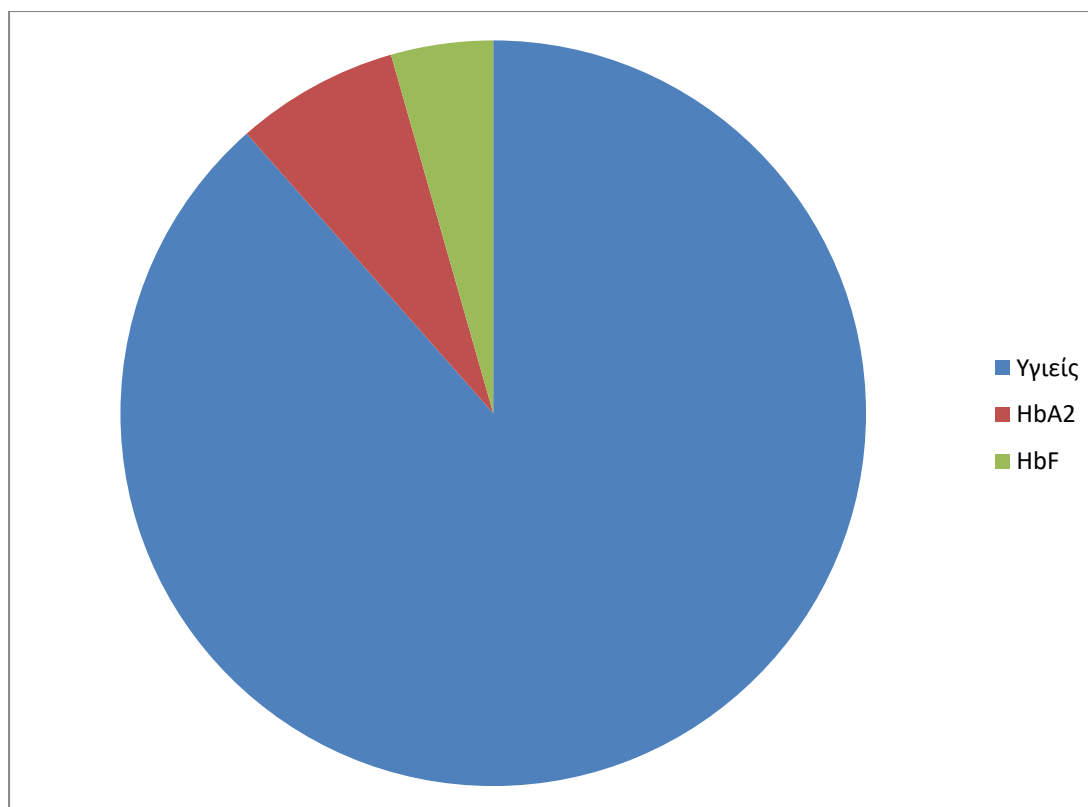
Τα αποτελέσματα των ηλεκτροφορήσεων παρουσιάστηκαν σε μορφή διαγράμματος, όπου απεικονίστηκαν τα επίπεδα των αιμοσφαιρινών σε συγκεκριμένο χρόνο έκλουσης. Πιο ειδικά, τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως διάγραμμα όπου το εμβαδό κάθε μπάντας αντιστοιχεί στην εκατοστιαία αναλογία αυτής.

Ενδεικτικά παρατίθεται ένα από αυτά, παρακάτω, περιγράφοντας τα επίπεδα των αιμοσφαιρινών που αναγράφονται στον Πίνακα 4 για τον ασθενή με κωδικό 1.



**Εικόνα 7: Επίπεδα αιμοσφαιρινών HbF, HbA1c, HbA2 στον ασθενή με κωδικό 1**

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα του Πίνακα 4 απεικονίζονται σε μορφή γραφήματος ως εξής:



**Εικόνα 8: Ποσοτική απεικόνιση ετεροζυγωτών για την HbF και HbA2**

Ωστόσο, από δείγματα αρχείου, τα οποία δεν σχετίζονται με τα παραπάνω 97 δείγματα, σημειώθηκε το σύνολο των πολυμορφισμών που παρατηρούνται σε φορείς α και β-μεσογειακής αναιμίας που εντοπίζονται στην Περιφέρεια Θεσσαλίας.

Σε 105 δείγματα, στα οποία εξετάστηκαν οι πολυμορφισμοί της α-μεσογειακής αναιμίας διαπιστώθηκε πως σε ποσοστό περίπου 50% αυτών, τα αλληλόμορφα είναι φυσιολογικά ή ο πολυμορφισμός δεν βρέθηκε. Το πιο συχνό έλλειμα είναι το --<sup>MED</sup> και cd14 σε ποσοστό 7% και 6% αντίστοιχα. Οι συχνότητες των λοιπών μεταλλάξεων ήταν ιδιαίτερα μικρές και αναγράφονται στον Πίνακα 5.

**Πίνακας 5: Πολυμορφισμοί υπεύθυνοι για την α-μεσογειακή αναιμία**

Κωδικός 1	-
Κωδικός 2	-
Κωδικός 3	-
Κωδικός 4	-- <sup>MED</sup>
Κωδικός 5	cd142

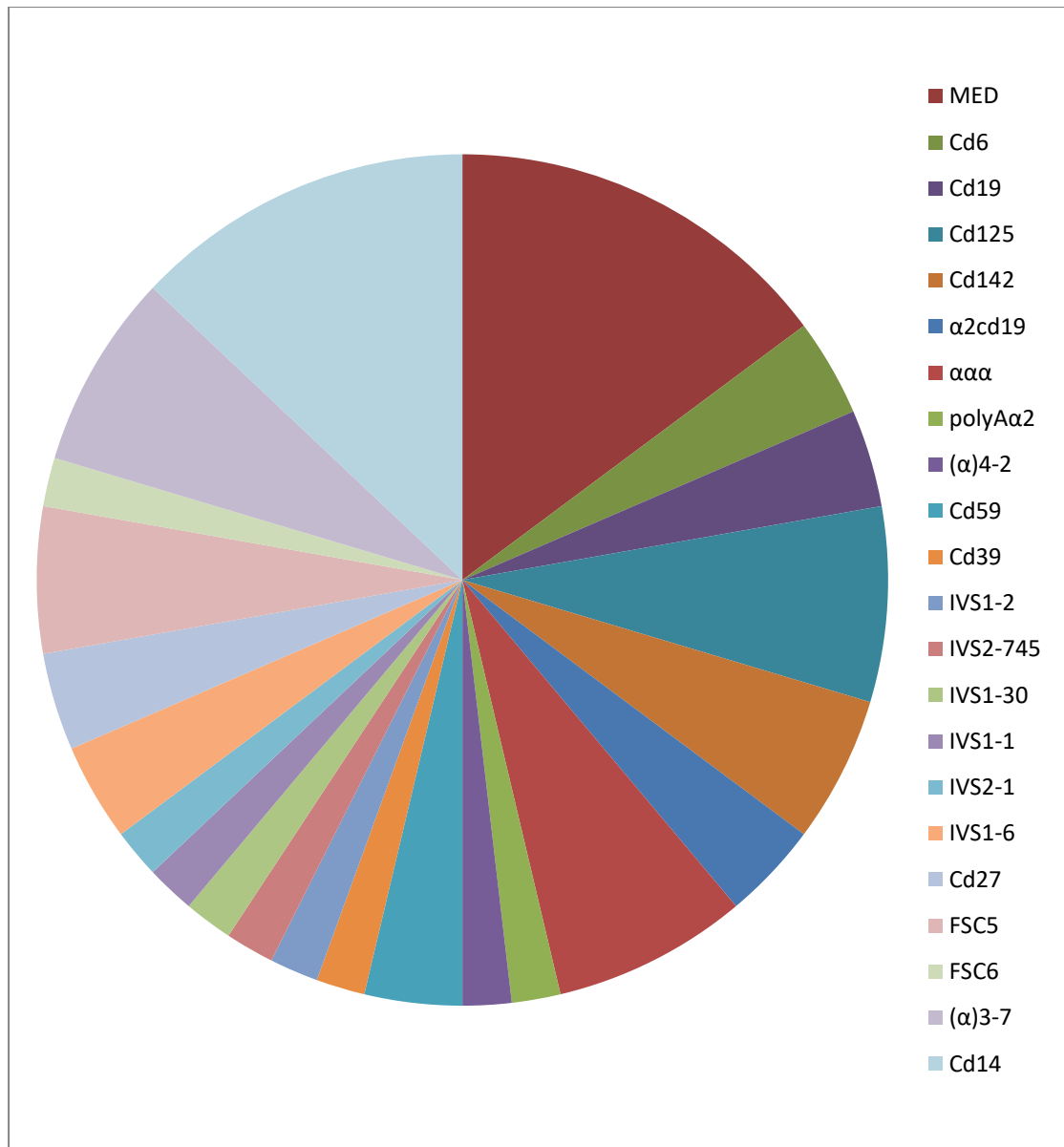
Κωδικός 6	cd125
Κωδικός 7	--MED
Κωδικός 8	$\alpha 2cd19$
Κωδικός 9	aaa
Κωδικός 10	-
Κωδικός 11	-
Κωδικός 12	cd14 (G > A)
Κωδικός 13	cd14
Κωδικός 14	-
Κωδικός 15	$(-\alpha)^{3-7}$
Κωδικός 16	--MED
Κωδικός 17	-
Κωδικός 18	-
Κωδικός 19	polyA $\alpha 2$
Κωδικός 20	$(-\alpha)^{4-2}$
Κωδικός 21	--MED
Κωδικός 22	$(-\alpha)^{3-7}$
Κωδικός 23	--MED
Κωδικός 24	cd125
Κωδικός 25	cd14 (G > A)
Κωδικός 26	-
Κωδικός 27	-
Κωδικός 28	-
Κωδικός 29	aaa
Κωδικός 30	FSC5
Κωδικός 31	-
Κωδικός 32	-
Κωδικός 33	-
Κωδικός 34	-

Κωδικός 35	-
Κωδικός 36	-
Κωδικός 37	-
Κωδικός 38	--MED
Κωδικός 39	-
Κωδικός 40	cd142
Κωδικός 41	cd14
Κωδικός 42	-
Κωδικός 43	cd59
Κωδικός 44	-
Κωδικός 45	-
Κωδικός 46	-
Κωδικός 47	$\alpha 2cd19$
Κωδικός 48	-
Κωδικός 49	-
Κωδικός 50	-
Κωδικός 51	-
Κωδικός 52	IVS1-6
Κωδικός 53	$(-\alpha)^{3-7}$
Κωδικός 54	$\alpha\alpha\alpha$
Κωδικός 55	--MED
Κωδικός 56	$\alpha\alpha\alpha$
Κωδικός 57	-
Κωδικός 58	-
Κωδικός 59	cd14 (G > A)
Κωδικός 60	-
Κωδικός 61	FSC6
Κωδικός 62	cd6 (G > A)
Κωδικός 63	-

Κωδικός 64	IVS1-6
Κωδικός 65	IVS1-2
Κωδικός 66	-
Κωδικός 67	-
Κωδικός 68	-
Κωδικός 69	-
Κωδικός 70	-
Κωδικός 71	IVS1-1
Κωδικός 72	IVS1-30
Κωδικός 73	-
Κωδικός 74	-
Κωδικός 75	FSC5
Κωδικός 76	cd27 (G > T)
Κωδικός 77	IVS2-745
Κωδικός 78	cd44 (-C)
Κωδικός 79	-
Κωδικός 80	-
Κωδικός 81	-
Κωδικός 82	IVS2-1
Κωδικός 83	cd39
Κωδικός 84	-
Κωδικός 85	-
Κωδικός 86	cd27
Κωδικός 87	-
Κωδικός 88	FSC5
Κωδικός 89	cd14
Κωδικός 90	--MED
Κωδικός 91	cd125 (T > C)
Κωδικός 92	cd59 (G > A)



Κωδικός 93	cd19 (C > G)
Κωδικός 94	cd14 (G > A)
Κωδικός 95	-
Κωδικός 96	-
Κωδικός 97	-
Κωδικός 98	-
Κωδικός 99	cd142 (T > C)
Κωδικός 100	cd125 (T > C), (-α) <sup>3-7</sup>
Κωδικός 101	cd19 (-G)
Κωδικός 102	-
Κωδικός 103	-
Κωδικός 104	-
Κωδικός 105	cd6 (G > A)



**Εικόνα 9: Ποσοτική απεικόνιση πολυμορφισμών α-μεσογειακής αναιμίας**

Σε 43 από τα 87 δείγματα που μελετήθηκαν για πολυμορφισμούς της β-μεσογειακής αναιμίας που εξετάστηκαν, ο πολυμορφισμός είτε παρέμεινε άγνωστος, είτε κάποια από αυτά τα άτομα είναι φυσιολογικά. Οι πιο συχνές μεταλλάξεις ήταν αυτές του IVS1-6 και οι -87. Σε μικρό ποσοστό παρατηρήθηκαν επιπλέον πολυμορφισμοί, όπως φανερώνει ο Πίνακας 6.

**Πίνακας 6: Πολυμορφισμοί υπεύθυνοι για την β-μεσογειακή αναιμία**

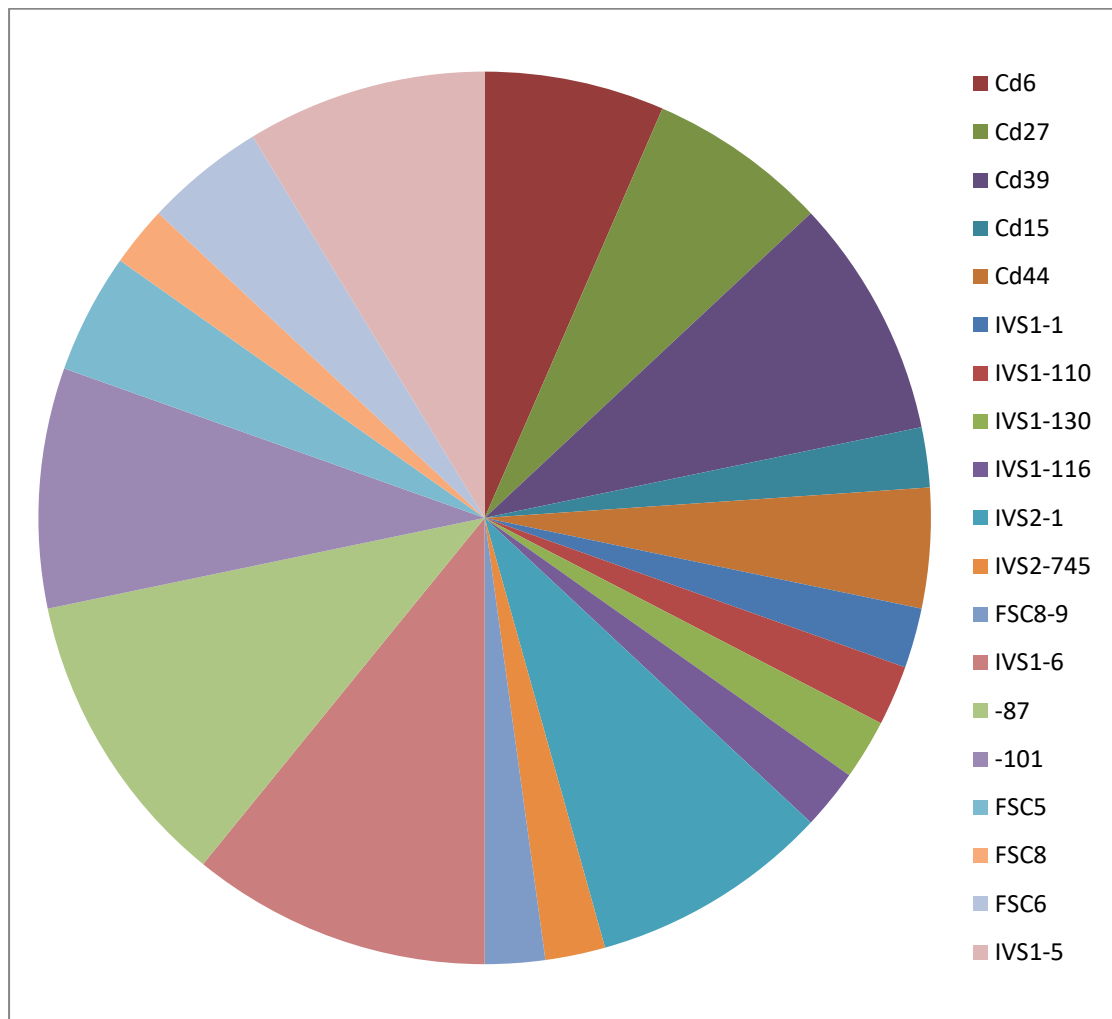
Κωδικός 1	-
-----------	---

Κωδικός 2	-
Κωδικός 3	-
Κωδικός 4	cd6
Κωδικός 5	-101
Κωδικός 6	FSC8
Κωδικός 7	FSC5
Κωδικός 8	-87
Κωδικός 9	cd6
Κωδικός 10	FSC6
Κωδικός 11	IVS1-6
Κωδικός 12	cd39
Κωδικός 13	IVS2-1
Κωδικός 14	-
Κωδικός 15	IVS1-130
Κωδικός 16	-
Κωδικός 17	-
Κωδικός 18	IVS1-1
Κωδικός 19	-
Κωδικός 20	-
Κωδικός 21	IVS1-5
Κωδικός 22	IVS1-6
Κωδικός 23	-
Κωδικός 24	-
Κωδικός 25	-
Κωδικός 26	-
Κωδικός 27	-
Κωδικός 28	cd27 (G > T), cd44 (- > T)
Κωδικός 29	cd39 (C > T)

Κωδικός 30	-
Κωδικός 31	-
Κωδικός 32	IVS2-1
Κωδικός 33	IVS2-745
Κωδικός 34	IVS1-116
Κωδικός 35	-
Κωδικός 36	-
Κωδικός 37	cd39 (G > T)
Κωδικός 38	IVS1-6
Κωδικός 39	-
Κωδικός 40	-
Κωδικός 41	-
Κωδικός 42	FSC6, FSC8-9
Κωδικός 43	cd6 (G > A)
Κωδικός 44	-
Κωδικός 45	-
Κωδικός 46	-
Κωδικός 47	-
Κωδικός 48	IVS2-1
Κωδικός 49	-101
Κωδικός 50	-87
Κωδικός 51	-
Κωδικός 52	-
Κωδικός 53	IVS1-110
Κωδικός 54	IVS1-5
Κωδικός 55	cd27 (G > T), cd15 (G > A)
Κωδικός 56	IVS1-5

Κωδικός 57	IVS1-6
Κωδικός 58	FSC5
Κωδικός 59	-
Κωδικός 60	-101
Κωδικός 61	-
Κωδικός 62	cd39 (G > T)
Κωδικός 63	-
Κωδικός 64	cd44 ( -C)
Κωδικός 65	-
Κωδικός 66	-
Κωδικός 67	-
Κωδικός 68	-
Κωδικός 69	-
Κωδικός 70	-
Κωδικός 71	-
Κωδικός 72	-
Κωδικός 73	-87
Κωδικός 74	-
Κωδικός 75	-101
Κωδικός 76	IVS1-5
Κωδικός 77	IVS2-1
Κωδικός 78	-
Κωδικός 79	-
Κωδικός 80	-87
Κωδικός 81	-
Κωδικός 82	-87
Κωδικός 83	cd27 (G > T)
Κωδικός 84	IVS1-6
Κωδικός 85	IVS2-1

Κωδικός 86	-
Κωδικός 87	-



**Εικόνα 10: Ποσοτική απεικόνιση πολυμορφισμών που ευθύνονται για την β-μεσογειακή αναιμία**

## 10. Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι γενετικές διαταραχές του αίματος γνωστές αιμοσφαιρινοπάθειες και κυρίως οι μεσογειακές αναιμίες σε κατοίκους Θεσσαλίας καθώς και οι πολυμορφισμοί αυτών. Αφού μελετήθηκε τυχαίο δείγμα πληθυσμού 97 ατόμων, το προέκυψε ότι το 5% αυτών παρουσίαζαν αυξημένες τιμές HbF, ενώ το 8% αυτών εμφάνισαν ιδιαίτερα υψηλές τιμές HbA2.

Έπειτα από βιβλιογραφική αναζήτηση, η β-μεσογειακή αναιμία είναι η συνηθέστερη ασθένεια στην Ελλάδα, με τα ποσοστά των φορέων να φθάνουν το 8% του γενικού πληθυσμού (Parachatzoroulou et al, 2010).

Η πρώτη επιδημιολογική μελέτη για τις μεσογειακές αναιμίες πραγματοποιήθηκε το 1946. Η μελέτη αποκάλυψε ότι το ποσοστό των ετεροζυγωτών της β-μεσογειακής αναιμίας ήταν σχεδόν 18% και αυτών της α<sup>0</sup>-θαλασσαιμίας ήταν περίπου 2% (Kyrii et al, 2013).

Η συλλογή επιδημιολογικών πληροφοριών για τις αιμοσφαιρινοπάθειες είναι περιορισμένη και στην Ελλάδα (Williams & Weatherall, 2012). Έχει γίνει αναφορά στο ετήσιο ποσοστό των προσβεβλημένων νεογνών καθώς και στους θανάτους, μεταξύ του 2000 και 2010. Ωστόσο, έως το 2012 ο αριθμός των νεογνών που ήταν προσβεβλημένα μειώθηκε σημαντικά εξαιτίας του Εθνικού Προγράμματος Πρόληψης Θαλασσαιμίας που δημιουργήθηκε (Voskaridou et al, 2012).

Από το 2000 έως το 2010 σε νοσοκομείο του Πολυγύρου Χαλκιδικής σε 3931 ασθενείς διεξήχθη εξέταση για αιμοσφαιρινοπάθειες. Μεταξύ των ασθενών, το 10,8% ήταν ετεροζυγότες για β-μεσογειακή αναιμία και το 4,1% βρέθηκε με δρεπανοκυτταρική νόσο. Από την γεωγραφική κατανομή στην περιοχή έγινε σαφής η παρουσία αιμοσφαιρινοπάθειας και στις ορεινές περιοχές. Αυτό το μοτίβο δεν συνάδει με την υπόθεση της ελονοσίας. Ταυτόχρονα, οι μεταλλάξεις γονιδίων HBB αναλύθηκαν για 85 ασθενείς. Η κυρίαρχη μετάλλαξη ήταν εκείνη του κωδικονίου 39 (C > T) (27,1%), ακολουθούμενη από την μετάλλαξη IVS1-110 (G > A) (22,4%). Η Χαλκιδική αποτελεί παράδειγμα γεωγραφικής απομόνωσης, αφού στην υπόλοιπη Ελλάδα η κατανομή των ίδιων μεταλλάξεων διαφέρει, με την μετάλλαξη IVS-I-110 να παρατηρείται σε ποσοστό 20,6% και η μετάλλαξη του κωδικονίου 39 σε ποσοστό 7,6% (Voskaridou et al, 2012).

Αξίζει να σημειωθεί ότι κρούσματα υπάρχουν και στην Ευρώπη. Αυτές οι ασθένειες είναι λιγότερο συνηθισμένες στην Νότια Ευρώπη συγκριτικά με την Βόρεια και την Δυτική Ευρώπη, αλλά οι δρεπανοκυτταρικές διαταραχές είναι συχνότερες από τις μεσογειακές αναιμίες (Modell et al, 2007).

Πιο ειδικά, στο Βέλγιο η συχνότητα των ετεροζυγωτών των αιμοσφαιρινοπαθειών είναι 0,41%, ενώ στην Δανία 0,14%. Στην Γαλλία οι φορείς αποτελούν το 0,46%. Ανάλογο ποσό αναφέρεται στο Ηνωμένο Βασίλειο (0,41%). Στην Γερμανία το ποσοστό μειώνεται σημαντικά φτάνοντας το 0,19%. Στην Ελλάδα το ποσοστό εκτιμάται κοντά στο 9,0%, ενώ στην Ιταλία στο 5,0% (Angastiniotis et al, 1993).

Σε παγκόσμιο επίπεδο, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας οι μεσογειακές αναιμίες είναι συχνότερες στους ενήλικες σε σχέση με τα δρεπανοκυτταρικά σύνδρομα. Πιο συγκεκριμένα, περίπου το 5% των ενηλίκων, είναι φορείς για αιμοσφαιρινοπάθεια, 2,9% για θαλασσαιμία και 2,1% για δρεπανοκυτταρική νόσο.

Με την παγκόσμια μετανάστευση, τα νοσήματα αυτά αποτελούν ένα πρόβλημα υγείας στο 71% των 229 χωρών, με αποτέλεσμα να αποτελούν γνώρισμα της Ευρώπης, των Ηνωμένων Πολιτειών και της Αυστραλίας. Το ποσοστό αυτό αντιπροσωπεύει το 89% όλων των γεννήσεων σε παγκόσμιο επίπεδο, ιδιαίτερα στις

χώρες χαμηλού ή μεσαίου εισοδήματος, εξαιτίας ανεπαρκών εγκαταστάσεων για συμβουλευτική, προγεννητική διάγνωση και θεραπεία (Martinez et al, 2014).

Ο επιπολασμός της νόσου είναι υψηλός στις τροπικές χώρες και αντικατοπτρίζει την προστασία των φορέων από την ελονοσία (Williams, Weatherall, 2012).

Ωστόσο, ο επιπολασμός αυτών των ασθενειών δεν έχει προσδιοριστεί με ακρίβεια, ενώ ποικίλλει σημαντικά μεταξύ περιοχών του κόσμου, μεταξύ περιοχών μιας χώρας καθώς και μεταξύ ιατρικών κέντρων της ίδιας περιοχής (Martinez et al, 2014), (Williams & Weatherall, 2012).

Υψηλά ποσοστά β-μεσογειακής αναιμίας έχουν σημειωθεί στην Αίγυπτο. Σε τυχαίο δείγμα Αιγύπτιων, το 13% του οποίου ήταν άτομα ηλικίας μεταξύ 1 και 59 χρονών, η συχνότητα των φορέων κυμαινόταν από 2,6 έως 4%. Μετά από μοριακές μελέτες διευκρινίστηκε ότι το 80% των μεσογειακών αναιμιών στην Αίγυπτο οφείλονται σε κλασικές μεσογειακές μεταλλάξεις. Ταυτόχρονα, η α-μεσογειακή αναιμία είναι έκδηλη σε ποσοστό 10%, όπως επισημαίνεται έπειτα από μελέτη 545 νεογνών.

Όσον αφορά την Τυνησία, στο 4,5% ανέρχονται τα ποσοστά της β-μεσογειακής αναιμίας και μπορούν να φτάσουν έως και 10% σε ορισμένες περιοχές (Angastiniotis et al, 1993).

Στην Ταϊλάνδη έχει τονιστεί πως μια σημαντική μετάλλαξη αιμοσφαιρίνης χαρακτηρίζει πάνω από το 40% του πληθυσμού (Angastiniotis et al, 1993).

Οι αιμοσφαιρινοπάθειες είναι συχνές και στην Νότια Κίνα με 5 καταγεγραμμένες, κοινές μεταλλάξεις για περισσότερα από το 90% των γονιδίων β-μεσογειακής αναιμίας. Η συχνότητα του Εμβρυικού Ύδρωπα στα νεογνά είναι 1/500 (Angastiniotis et al, 1993).

Οι ήπιες μορφές α-μεσογειακής αναιμίας, οι οποίες προκύπτουν από μια απλή διαγραφή γονιδίου α (-α/αα), εμφανίζονται σε μια ευρεία τροπική ζώνη που εκτείνεται από την υποσαχάρια Αφρική έως την Ινδία και ολόκληρη την ανατολική και νοτιοανατολική Ασία. Σε αυτή την ζώνη εμφανίζονται με συχνότητα 10% - 25% αν και σε κάποιους πληθυσμούς όπως της Βόρειας Ινδίας και της Νέας Γουινέας βρίσκονται σε ποσοστό έως 80% του πληθυσμού. Οι πιο σοβαρές μορφές της α-μεσογειακής αναιμίας λόγω της απώλειας δύο γονιδίων της α-αλυσίδας είναι λιγότερο συνηθισμένο φαινόμενο, φτάνοντας σε υψηλές συχνότητες μόνο στην νοτιοανατολική Ασία και σε μερικά νησιά της Μεσογείου. Παρουσιάζονται σποραδικά και σε άλλους πληθυσμούς, παρόλο που η πραγματική τους συχνότητα δεν έχει προσδιοριστεί (Williams & Weatherall, 2012).

#### Περιορισμοί μελέτης:

Σημειώνεται ότι η μελέτη μας έχει ορισμένους περιορισμούς, όπως ο μικρός αριθμός πληθυσμιακού δείγματος. Αναλυτικότερα, πρόκειται για μια μελέτη «ασθενών-μαρτύρων» προκειμένου να διερευνηθεί το ποσοστό των ετεροζυγωτών για τις αιμοσφαιρίνες F και A2 καθώς και την συσχέτιση πολυμορφισμών με τα μεσογειακά σύνδρομα σε ανεξάρτητο δείγμα πληθυσμού κατοίκων Θεσσαλίας. Η πιθανότητα ύπαρξης συγγυτών στις μελέτες «ασθενών-μαρτύρων» είναι μεγάλη και για το λόγο αυτόν είναι απαραίτητη η εκπόνηση τυχαιοποιημένων ελεγχόμενων δοκιμών για την



εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων. Ωστόσο, η αυξημένη εγκυρότητα των αποτελεσμάτων είναι απόρροια εξέτασης όλο και περισσότερων δειγμάτων.

## 11. Βιβλιογραφικές πηγές

- Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, et al. (1998). *Essential Cell Biology. Taylor & Francis*
- Angastiniotis M., Models B., Englezos P. & Biulyienkov V. , 1993, Prevention and control of haemoglobinopathies).
- Barrett AN, Saminathan R, Choolani M (2017).Thalassaemia screening and confirmation of carriers in parents. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 39:27-40
- Bartsch H, Nair U, Risch A, Rojas M, Wikman H, Alexandrov K (2000) Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 9(1):3-28
- Berg Jeremy M., Tymoczko John L., Stryer Lubert (2012). *Biochemistry 7<sup>th</sup> edition: W.H. Freeman and Company*
- Bikhet S.F., Darwish A.M., Tolba H.A., Shaheen S.I. (2000). Segmentation and classification of white blood cells pp 2259-2261
- Birgens H, Liung R (2007). The thalassaemia syndromes. *Scand J Clin Lab Invest*, 67(1):11-25
- Bruford MW, Wayne RK. (1993) Microsatellites and their application to population genetic studies.*Curr Opin Genet*, 3:939-943
- Castaldi MA, Cobellis L (2016). Thalassaemia and infertility. *Hum Fertil (Camb)*,19(2):90-6.
- Connor JM, Ferguson-Smith MA (1993). *Essential Medical Genetics 4th Edition. Blackwell Scientific Publications*
- D.R. Higgs, M.A. Vickers, A.O.M. Wilkie, I.-M. Pretorius, A.P. Jarman, and D.J. Weatherall (1989). A review of the molecular genetics of the human alpha-globin gene cluster. *Blood*, 73(5):1081-104
- Ed Uthman,Hemoglobinopathies and Thalassemias
- Evans DM, Purcell S (2012). Power calculations in genetic studies. *Cold Spring Harb Protoc*, 2012 (6):664-674
- Gabriela E. Martyn, Kate G.R. Quinlan, Merlin Crossley (2017). KLF1 drives the expression of fetal hemoglobin in British HPFH. *Blood:blood-2017-02-767400*

- Grosso Michela, Raffaele Sessa, Stella Puzone, Maria Rosaria Storino, Paola Izzo (2012). Molecular Basis of Thalassemia. *Anemia*, pp 341-359.
- Gunay Aliyeva, Chingiz Asadov, Tahira Mammadova, Surmaya Gafarova, Eldar Abdulalimov (2018).Thalassemia in the laboratory: pearls, pitfalls, and promises. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*
- Gunderson KL, Steemers FJ, Lee G, Mendoza LG, Chee MS (2005). A genome-wide scalable SNP genotyping assay using microarray technology. *Nature Genetics*, 37(5): 549- 554
- Harteveld and Higgs (2010). Alpha-thalassaemia. *Orphanet J Rare Dis.* 5:13.
- Higgs (1993). The Haemoglobinopathies. *Bailliere's Clinical Haematology.* pp 117-150.
- Higgs & Gibbons (2010). The molecular basis of  $\alpha$ -thalassemia: a model for understanding human molecular genetics. *Hematol Oncol Clin North Am*, 24(6):1033-54.
- Higgs and Weatherall (2009).The alpha thalassaemias. *Cell Mol Life Sci.* 66(7):1154-62.
- John Koutelekos , Nikolaos Haliasos (2013). Depression and thalassemia in children, adolescents and adults. *Health Science Journal να δω αν μπει*
- Kanavakis E., Metaxotou-Mavromati A., Kattamis C., Wainscoat J. S., Wood W. G.. (1983).The triplicated alpha gene locus and beta thalassaemia. *Br J Haematol*, 54(2):201-7
- Kanavakis ET-SJ (2006). Molecular basis of thalassaemia syndromes. In: Beaumont CB, P.; Beuzard, Y.; Brugnara C (ed) *Disorders of iron homeostasis, erythrocytes, erythropoiesis.* pages 210- 227
- Kyrii Andreani R., Kalogerou Elena, Loizidou Dena, Ioannou Christina, Makariou Christina, Kythreoyis Loukas, Phylactides Marios, Kountouris Petros, Angastiniotis Michael, Modell Bernadette & Kleanthous Marina (2013). The Changing Epidemiology of  $\beta$ - Thalassemia in the Greek- Cypriot Population, pages 435-443
- Laura Bull (2013). Genetics, Mutations, and Polymorphisms. *Madame Curie Bioscience Database [Internet].*
- Li CK (2017). New trend in the epidemiology of thalassaemia. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 39:16-26
- Loukopoulos Dimitris (2011). Haemoglobinopathies in Greece: prevention programme over the past 35 years. *Indian J Med Res*, 134(4): 572–57
- Martinez Patricia Aguilar, Angastiniotis Michael, Eleftheriou Androulla, Gulbis Beatrice, Pereira Marina Del Mar Manu, Petrova-benedict Roumyana and Gives Corrine Joan- Louis (2014). Hemoglobinopathies in Europe: health & migration policy perspectives, *Orphaned J Rare Dis* 9:97.

- Martyn GE, Quinlan KGR, Crossley M (2017). The regulation of human globin promoters by CCAAT box elements and the recruitment of NF-Y. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 1860(5):525-536.
- Mettananda S, Higgs DR (2018). Molecular Basis and Genetic Modifiers of Thalassemia. *Hematol Oncol Clin North Am*, 32(2):177-191
- Modell B, Darlison M, Birgens H, Cario H, Faustino P, Giordano PC, Gulbis B, Hopmeier P, Lena- Russo D, Romao L, Theodorsson E. (2007). Epidemiology of haemoglobinopathies disorders in Europe: an overview, *Scand J Clin Lab Invest*, 67(1): 39-69
- Nussbaum R.L., McInnes R.R., Willard H.F.(2011). ‘ Hemoglobinopathies’ *Thompson & Thompson Genetics in Medicine, 7<sup>th</sup> edition*. Canada : Elsevier
- Papachatzopoulou Adamantia, Kourakli Alexandra, Stavrou Eleana F., Dragon Ekaterinh, Vantarakis Apostolos, Patrinos George P. & Athanassiadou Aglaia (2010). Region- Specific Genetic Heterogeneity of HBB Mutation Distribution in South-western Greece, pages 333-334
- Patrinos George P. & Grosveld Frank G. (2007). Pharmacogenomics and Therapeutics of Hemoglobinopathies. *Journal Hemoglobin*, 32(1-2):229-236
- Peter Krawitz, Christian Rödelberger, Marten Jäger, Luke Jostins, Sebastian Bauer, Peter N. Robinson (2010). Microindel detection in short-read sequence data. *Bioinformatics*, 26 (6):722–729
- P. F. R. Little, G. Annison, S. Darling, R. Williamson, L. Camba & B. Modell (1980). Model for antenatal diagnosis of  $\beta$ -thalassaemia and other monogenic disorders by molecular analysis of linked DNA polymorphisms. *Nature* 285, 144-147
- Raffaella Origa, MD and Paolo Moi, MD (2005). Alpha-Thalassemia. *GeneReviews [Internet]*
- Renzo Galanello and Raffaella Origa (2010). Beta-thalassemia. *Orphanet J Rare Dis*. 5: 11
- Sabath DE (2017). Molecular Diagnosis of Thalassemias and Hemoglobinopathies: An ACLPS Critical Review. *Am J Clin Pathol*, 148(1):6-15.
- Sarker NR , Ghosh AK , Saha SK , Shariar A (2014). Recent advances in the management of Thalassemia: A Review Update. *J Shaheed Suhrawardy Med Coll*, 6(1)
- Steinberg M.H. et al. (2001). Disorders of hemoglobin. *Cambridge University Press*.
- Tribut O, Lessard Y, Reymann JM, et al.(2002) Pharmacogenomics. *Med Sci Monit*, 8(7): RA152- 163
- Voskaridou Ersi, Ladis Vasilis, Kattamis Antonia, Hassapopoulou Eleni, Economou Marina, Kourakli Alexandra, Maragkos Konstantinos, Kontogianni

Kalliopi, Lafioniatis Stilianos, Vrettou Elena, Koutsouka Freideriki, Papadakis Alexandros, Mihos Andreas, Eftihiadis Eftihios, Farmaki Kallistheni (2012). A national registry of haemoglobinopathies in Greece : Deducted demographics, trends in mortality and affected births. *Annals of Hematology* 91 (9): 1451-1458

- Weatherall D.J. (1997a). The Hereditary anaemias. *BMJ*, 314: 492-497.
- Weatherall D.J. (1997b). The Thalassaemias. *BMJ*, 314: 1675-8.
- Weatherall (2010). The inherited diseases of hemoglobin are an emerging global health burden. *Blood*, 115(22):4331-6
- Weatherall & Clegg (2001). Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bull World Health Organ* 79(8):704-12.
- Williams Thomas N., Weatherall David J. (2012). World Distribution, Population Genetics and Health Burden of the Hemoglobinopathies 2(9): a011692.
- (2011). Thalassaemia: recent molecular, clinical and therapeutic developments. *Haema*, 2
  
- Ανδρέα-Πάολα Ρόχας Χιλ (2018). Αίμα. *Κλινική Βιοχημεία*
- Γαριπίδης Ιορδάνης (2016). Αίμα <https://www.slideshare.net/garijon/ss-70566479> (τελευταία πρόσβαση στις 12/12/2018)
- Καλλέας (2010). Μελέτη και αξιολόγηση της κατανομής των αιμοσφαιρινοπαθειών στο νομό Χαλκιδικής και σύγκριση των μεθόδων προσδιορισμού της HbA2.
- Κοκόρη Στέλλα (2013). Φυσιολογία του αίματος. \ <https://www.eae.gr/images/files/aimodosia/drastiriotites/2013-05/parousiaseis/KOKOPH.pdf> (τελευταία πρόσβαση στις 11/12/2018)
- Κόλλιας Αναστάσιος (2009). Μελέτη της μεταφοράς της γλυκόζης στα λευκά αιμοσφαίρια και στην έκφραση των υποδοχέων της λιπονεκτίνης στα περιφερικά μονοκύτταρα και συσχέτιση με το μεταβολισμό, την παραγωγή κυτταροκινών και κλινικούς δείκτες ινσουλινοαντοχής και αθηρωμάτωσης
- Κουτελέκος Ιωάννης , Χαλιάσος Νικόλαος (2013). Μεσογειακή αναιμία. *Περιεχειρητική Νοσηλευτική*, 2(3)
- Λεκάκου Μαρία (2015). Τι είναι ο αιματοκρίτης
- Λουκόπουλος Δημήτρης (2015). Κληρονομικές παθήσεις της αιμοσφαιρίνης. *Θαλασσαιμίες. Δρεπανοκυτταρική αναιμία. Παραλλαγές αιμοσφαιρίνης*, (4). Αθήνα: Κάλιπος
- Μαΐλης Θεόφιλος, Δομή και λειτουργία της ανθρώπινης αιμοσφαιρίνης <https://eclass.uoa.gr/modules/document/file.php/BIOL199/%CE%94%CE%9F%CE%9%CE%97%20%CE%9A%CE%91%CE%99%20%CE%9B%CE%95%CE%99%CE%A4%CE%9F%CE%A5%CE%A1%CE%93%CE%99%CE%91%20%CE%A4%CE>

%97%CE%A3%20%CE%91%CE%9D%CE%98%CE%A1%CE%A9%CE%A0%CE%99%CE%9D%CE%97%CE%A3%20%CE%91%CE%99%CE%9C%CE%9F%CE%A3%CE%A6%CE%91%CE%99%CE%A1%CE%99%CE%9D%CE%97%CE%A3.pdf

(τελευταία πρόσβαση στις 12/12/2018)

- Νικολοπούλου Αρτ. - Φωτοπούλου Ι., Θαλασσαιμικά δρεπανοκυτταρικά σύνδρομα [www.agandreashosp.gr/Aimodosia/thalass-synd.ppt](http://www.agandreashosp.gr/Aimodosia/thalass-synd.ppt) (τελευταία πρόσβαση στις 11/12/2018)

- Παπαδοπούλου Ελένη, Οικονόμου Μαρίνα (2009-2010). Περίπτωση ήπιου μεσογειακού συνδρόμου λόγω αλληλεπίδρασης Hb Adana με ετερόζυγη α+ μεσογειακή αναιμία. *Παρουσιάσεις παιδιατρικών περιπτώσεων*, Κεφάλαιο 10

- Τριανταφυλλίδης Κ. (2013). *"Η γενετική ιστορία της Ελλάδας, το DNA των Ελλήνων"*.

- Απομόνωση των κυτταρικών συστατικών του αίματος

<https://eclass.upatras.gr/modules/document/file.php/BIO297/%CE%9D%CE%BF>

%203%20%CE%94%CE%B9%CE%B1%CF%87%CF%89%CF%81%CE%B9%CF

%83%CE%BC%CF%8C%CF%82%20%CE%BA%CF%85%CF%84%CF%84%CE

%B1%CF%81%CE%B9%CE%BA%CF%8E%CE%BD%20%CF%84%CF%8D%CF

%80%CF%89%CE%BD%20%CE%B1%CE%AF%CE%BC%CE%B1%CF%84%CE%BF

%CF%82.pdf (τελευταία πρόσβαση στις 13/12/2018)

- Γονίδια/Μεταλλάξεις

<http://nf1.bioacademy.gr/index.php/nf-mainmenu-30/mainmenu-32/mainmenu-33>

(τελευταία πρόσβαση στις 13/12/2018)

