



ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ  
ΙΔΡΥΜΑ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

# Οξειδωτικό στρες σε Ασθενείς με Θαλασσαιμία: Σύγκριση δειγμάτων Σαρδηνίας-Θεσσαλονίκης

OXIDATIVE STRESS IN THALASSEMIC PATIENTS,  
A COMPARISON STUDY BETWEEN GREECE AND  
SARDINIA

πτυχιακή εργασία

του

Τσαμεσίδη Ιωάννη

(Tsamesidis Ioannis)

Επιβλέπουσα: Λυμπεράκη Ευγενία, επίκουρη Καθηγήτρια  
Χημείας - Κλινικής Χημείας

Π Τ Υ Χ Ι Α Κ Η Ε Ρ Γ Α Σ Ι Α

2014



## **ΤΙΤΛΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

**Οξειδωτικό στρες σε Ασθενείς με Θαλασσαιμία: Σύγκριση  
δειγμάτων Σαρδηνίας-Θεσσαλονίκης**

**OXIDATIVE STRESS IN THALASSEMIC PATIENTS, A  
COMPARISON STUDY BETWEEN GREECE AND SARDINIA**

πτυχιακή εργασία

ΤΟΥ

**Τσαμεσίδη Ιωάννη**

**Επιβλέπουσα: Λυμπεράκη Ευγενία, επίκουρη  
Καθηγήτρια Χημείας - Κλινικής Χημείας**

2014

Graduation thesis of Ioannis Tsamesidis

Supervisor: Dr. Eugenia Limperaki

Alexander Technological Educational Institute of Thessaloniki

Collaborating with Maria Daoudaki, Aristotle University of Thessaloniki, Vagdatli Eleni, Alexander Technological Educational Institute of Thessaloniki, Antonella Pantaleo, University of Sassari and Francesco Turrini, University of Turin.

Oxidative Stress in Thalassemic patients, a comparison study between Greece and Sardinia

**OXIDATIVE STRESS IN THALASSEMIC PATIENTS, A  
COMPARISON STUDY BETWEEN GREECE AND SARDINIA**

It is well known that Thalassemic patients with Ferritin levels above 1000 ng/ml or after the first 10 transfusions need to be identified in the appropriate dosage and the right Chelation therapy for them. The most common Chelation therapy is desferrioxamine (Desferal), deferiprone (Ferriprox) and deferasirox (Exjade). Knowing that iron overload is associated with the production of free radicals, which leads to a decrease in the body's defense, **the purpose of this study** was the correlation between total antioxidant and Ferritin with the different types of Chelation therapy in Thalassemic patients in two Mediterranean regions such as Central Macedonia and Sardinia with different techniques (TEAC, Proteomic analysis).

**Material and Method:** In 60 volunteers with Thalassemia, 30 from Sardinia and 30 from C. Macedonia aged 25-60 years was measured Ferritin and total antioxidant capacity (TAC) of the plasma, with the method TEAC (Trolox equivalence antioxidant capacity). In group A1-

A4, 7 people received Exjade, 7 Ferriprox, 8 Desferal and 8 combination of Desferal-Ferriprox (groups A1, A2, A3 and A4). In group B1-B2 11 people received Exjade and 19 Ferriprox (groups B1 and B2). In SPSS21 were compared TAC and Ferritin between groups A1, A2, A3 and A4 and B1 and B2 groups with t-student test. A different approach with the ghost samples followed this time using proteomic techniques, such as Sds-Page, Western Blotting, Mass spectrometry.

**Results:** The total average of antioxidants and Ferritin based at the Chelation therapy showed in Table 1. The values of TAC in Sardinia's found significantly lower and level of Ferritin higher than those of Greeks ( $p < 0.001$  both). There was no statistically significant difference in values of TAC between groups A1-A2 and B1-B2 and Ferritin between groups B1-B2. The group A3 had a statistically significant reduction in TAC and ferritin increased relative to A1 and A2, while in the group A4 observed increase of TACs and decrease of ferritin ( $p < 0.05$  in all cases). At the correlation between TAC and Ferritin, a strong negative correlation was found only in the B1 group ( $r: -0,78$ ), weakly strong in A1, A4 and B2 ( $r: -0,45, -0,44$  and  $-0,48$  respectively) while at groups A2 and A3 wasn't any correlation. The Proteomic analysis of Thalassemic patients shows as a high phosphorylation in a transmembrane protein called Band 3.

		<b>EXJADE</b>	<b>FERRIPROX</b>	<b>DESFERAL</b>	<b>DESFERAL-FERRIPROX</b>
		<i>A1</i>	<i>A2</i>	<i>A3</i>	<i>A4</i>
<b>SARDINIANS</b>	<b>TAC (mM)</b>	1,75	1,63	1,59	2,24
	<b>FERRITIN (ng/ml)</b>	2035	1639	2200	1396
		<i>B1</i>	<i>B2</i>		
<b>GREEKS</b>	<b>TAC (mM)</b>	2,6	2,3	-	-
	<b>FERRITIN (ng/ml)</b>	1047	1053	-	-

**Conclusions:** The analysis of our results shows that the best Chelation treatment for Thalassemic patients in Sardinia is the combination of Desferal-Ferriprox, because of a raise

in antioxidants and an increase of Ferritin, could be interesting to verify the same experiments with Greeks who have higher amounts of antioxidants and lower serum Ferritin compared with Sardinia's. Furthermore studies , of proteomic analysis is going to give us more precise results.

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Πρόλογος.....	5
Ευχαριστίες.....	6
<b>ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>7</b>
<b>1. ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΑΙΜΑΤΟΣ</b>	
1.1. Αίμα.....	8
1.2. Ερυθρά Αιμοσφαίρια.....	9
1.3. Band 3.....	9
1.4. Μεθαιμογλουβίνη (Hemicromes).....	9
1.5. Αιμοσφαιρίνη (δομή και λειτουργία).....	10
1.6. Ερυθροποίηση/ Ωριμα ερυθροκύτταρα.....	12
<b>2. ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΑΣ</b>	
2.1. Δομή και οργάνωση των γονιδίων των σφαιρινών του ανθρώπου.....	13
2.2. Μεταλλάξεις.....	14
<b>3. ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΑ</b>	
3.1. Ιστορική Αναδρομή.....	15
3.2. Παθοφυσιολογία της θαλασσαιμίας.....	16
3.3. Β-Θαλασσαιμία.....	16

3.3.1. Παθοφυσιολογία της β-ομόζυγης.....	17
3.3.2. Β-θαλασσαιμία και οικογενειακός προγραμματισμός.....	17
3.3.3. Παραλλαγές της β-θαλασσαιμίας.....	18
3.3.4. Συνέπειες της θαλασσαιμικής βλάβης.....	19
3.3.5. Κλινικές εκδηλώσεις β-ομόζυγης θαλασσαιμίας.....	19
3.3.6. Εργαστηριακά ευρήματα β-θαλασσαιμίας.....	20
3.3.7. Τα γονίδια στην β-θαλασσαιμία.....	21
3.4. Α-Θαλασσαιμία.....	22
3.4.1. Α-θαλασσαιμία και οικογενειακός προγραμματισμός.....	22
3.4.2. Γενετική βάση της α-θαλασσαιμίας.....	23
3.4.2.1. Τρόπος μεταβίβασης α-γονιδίων.....	23
3.4.2.2. Φορείς της α-θαλασσαιμίας.....	24
3.4.3. Εργαστηριακά ευρήματα α-θαλασσαιμίας.....	25
3.5. Θεραπευτική αντιμετώπιση.....	25
3.5.1. Αντιμετώπιση της αναιμίας.....	25
3.6. Επιδημιολογικά στοιχεία.....	26
3.6.1. Γενικά.....	26
3.6.2. Επιδημιολογικά χαρακτηριστικά και HCV.....	27
3.7. Αντιοξειδωτικά και συμπληρώματα βιταμινών.....	28
3.8. Συμπεράσματα για τις μεταλλάξεις και τα είδη της θαλασσαιμίας.....	28
<b>4. ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΚΑΙ ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΑ</b>	
4.1. Γλυκόζη.....	31
4.1.1. Αιτιοπαθογένεια.....	31
4.1.2. Διαγνωστικά Κριτήρια.....	32
4.2. Εψιδίνη.....	33
4.3. Βιταμίνη D.....	33
<b>5. ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΚΑΙ ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΑ</b>	
5.1. Διαβήτης και σίδηρος.....	34
5.2. HCV και διαβήτης.....	35
<b>6. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ</b>	
6.1. Ανιόντα και ακτιόντα.....	35
6.2. Ελεύθερες ρίζες.....	37
6.3. Οξειδωτικό στρες.....	39
6.4. Αντιοξειδωτικοί αμυντικοί μηχανισμοί.....	40

6.4.1. Ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.....	40
6.4.2. Βιολογική αντιοξειδωτική άμυνα.....	40
6.4.3. Ασκορβικό οξύ.....	41
6.4.4. Βιταμίνη Ε.....	41
6.4.5. Καροτενοειδή.....	41
6.5. Τροφές με την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα.....	41
6.6. Μέτρηση οξειδωτικού στρες.....	43

## ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

### 1. ΟΛΙΚΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΣΤΟ ΑΙΜΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΑ / ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ (Συγκριτική μελέτη Σαρδηνία/Θεσσαλονίκη)

1.1. Γενικά.....	47
1.2. Επίπεδα χολερυθρίνης.....	48
1.2.1. Φύλο (Γυναίκες/ Άντρες).....	49
1.3. Περιορισμοί.....	50
1.4. Συνοπτικά Μελέτες για το οξειδωτικό στρες σε θαλασσαιμικούς.....	50

### 2. ΤΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΩΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΓΩΓΗ

2.1. Oxidativestressandβ-thalassemicerythroidcellsbehindthemoleculardefect/ Οξειδωτικό Στρες και β-θαλασσαιμικά ερυθροκύτταρα.....	52
2.2. Τα αντιοξειδωτικά και η χρήση τους στην υπογονιμότητα των ανδρών/ University of Oakland.....	54

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	56
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	56
2.1. Υλικά.....	56
2.1.1. Μέθοδος προσδιορισμού αντιοξειδωτικών στο αίμα.....	57
2.2. Στατιστική ανάλυση.....	58
2.3. Ερωτηματολόγια.....	59
2.4. Αποτελέσματα.....	64
2.5. Συμπεράσματα.....	66

<b>3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΜΕ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ BAND 3.....</b>	<b>67</b>
3.1. Υλικά και μέθοδος.....	68
3.1.1. Υλικά.....	68
3.1.1.1. ΠρωτόκολλοGhost.....	69
3.1.1.2. Συνοπτική εικόνα.....	70
3.1.2. Μέθοδος.....	70
3.1.2.1. SDS-page.....	70
3.2. Δοκιμή ανίχνευσης μεθαιμογλουβίνης με στήλη υγρής χρωματογραφίας.....	72
3.2.1. Αποτελέσματα.....	72
3.2.2. Συμπεράσματα.....	73
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>74</b>

## **ΠΡΟΛΟΓΟΣ**

Ο έρωτας και η επιστήμη είναι από τις συναρπαστικότερες διαστάσεις της ζωής, δεδομένου ότι, ο μεν έρωτας συνδέεται με τη διαίωση της ίδιας της ζωής, η δε επιστήμη προκαλεί το ενδιαφέρον και την αφοσίωση των πιο ξεχωριστών πνευμάτων της ανθρωπότητας. Πολλοί ερευνητές λοιπόν, αφοσιώνονται στην έρευνα με στόχο θετικά αποτελέσματα.

Η παρούσα πτυχιακή εργασία αναλύει το οξειδωτικό στρες και την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα σε ασθενείς που πάσχουν από Θαλασσαιμία (Μεσογειακή αναιμία). Συγκρίνει δείγματα ασθενών από την Σαρδηνία και την Θεσσαλονίκη. Η συλλογή των δειγμάτων στην Σαρδηνία έγινε στο Κέντρο Μετάγγισης του Πανεπιστημιακού νοσοκομείου του Σάσσαρι και στην Θεσσαλονίκη σε τοπικό νοσοκομείο μεταγγίσεων της Πόλης.

Η εργασία αποτελείται από το Θεωρητικό, τα Ερευνητικά Δεδομένα και το Πειραματικό Μέρος. Στο Θεωρητικό μέρος παραθέτονται πληροφορίες για την Θαλασσαιμία, τα είδη της, την παθοφυσιολογία της καθώς και το Οξειδωτικό Στρες και τους παράγοντες που το καθιστούν πολυπαραγοντικό. Ενώ στα ερευνητικά Δεδομένα παραθέτονται επιστημονικές εργασίες από άλλα πανεπιστήμια και με βάση τις οποίες καθοδηγήθηκε η έρευνα που κάναμε. Στο Ειδικό μέρος παρουσιάζεται το υπό μελέτη υλικό της παρούσης εργασίας, οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν και τα αποτελέσματα που εξήχθησαν, ενώ ακολουθεί ερμηνεία των αποτελεσμάτων, συμπεράσματα και συζήτηση. Η υπόδειξη και



επίβλεψη του θέματος έγινε από την Επίκουρη Καθηγήτρια Χημείας και Κλινικής Χημείας Κα Λυμπεράκη Ευγενία.

Το ερευνητικό σκέλος της εργασίας εκπονήθηκε στο εργαστήριο «Κλινικής Χημείας» του τμήματος Ιατρικών Εργαστηρίων, της Σχολής Επαγγελματιών Υγείας και Πρόνοιας (Σ.Ε.Υ.Π.) του Αλεξάνδρειου Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος Θεσσαλονίκης και στο εργαστήριο «Φυσιολογίας» του τμήματος Βιοιατρικών Επιστημών, της σχολής Βιολογίας του Πανεπιστημίου του Σάσσαρι στο οποίο έκανα παράλληλα την πρακτική μου άσκηση.

Το οξειδωτικό στρες αποτελεί μια διαταραχή ως προς την ισορροπία μεταξύ της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου των ελευθέρων ριζών δηλαδή και την ικανότητα του οργανισμού να αδρανοποιεί τα τοξικά αυτά μόρια αλλά και να «επιδιορθώνει» τις βλάβες που αυτά προκαλούν. Η θαλασσαιμία ως το πιο βασικό κληρονομικό νόσημα που πλήττει τις μεσογειακές χώρες καταπολεμάτε με μεταγγίσεις και αγωγή αποσιδήρωσης με στόχο ένα ποιοτικό τρόπο ζωής. Το οξειδωτικό στρες σε ασθενείς με Θαλασσαιμία παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω των αιματολογικών διαταραχών που παρουσιάζουν και θα αποτελέσει το ενδιαφέρον της έρευνας μας.

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η εργασία αυτή εκπονήθηκε σε δυο διαφορετικές χώρες και αποτέλεσε το έναυσμα να ασχοληθώ με την έρευνα. Θέλω να ευχαριστήσω θερμά τον Ιατρό-Αιματολόγο, Claudio Fozza καθώς ήταν το πρώτο άτομο το οποίο ενθάρρυνε την προσπάθεια μου για να κάνω κάτι διαφορετικό. Μου επέτρεψε να συλλέξω δείγματα θαλασσαιμικών από το κέντρο μετάγγισης του αιματολογικού ινστιτούτου του Πανεπιστημίου το Σάσσαρι. Θερμότερα θέλω να ευχαριστήσω την επίκουρη καθηγήτρια Χημείας Κα Λυμπεράκη Ευγενία που χάρη στην υπομονή της, λόγω ότι δεν βρισκόμουν στην Ελλάδα κατάφερε και μου απαντούσε σε κάθε μου απορία. Επίσης την ευχαριστώ για την όρεξη και ανθρωπιά της καθώς αυτό αποτελεί τον κύριο παράγοντα να ξανά συνεργαστώ μαζί της, σαν άνθρωπος προς άνθρωπο! Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Τεχνολόγο Γιουβανναπού με βοήθησε στην συλλογή των δειγμάτων και στην φυγοκέντρωση τους στο αιματολογικό εργαστήριο του Πανεπιστημιακού νοσοκομείου του Σάσσαρι καθώς και στην Μαρία Παπαδοπούλου και τον Παναγιώτη Διμιτιούση οι οποίοι υπομονετικά μου απαντούσαν σε κάθε λεπτομέρεια για την ασθένεια τους. Με την σειρά

τους ευχαριστώ τους ανθρώπους που σύλλεξαν τα δείγματα από το νοσοκομείο του Αγίου Παύλου και την διευθύντρια της Αιμοδοσίας καθώς και την γιατρό των θαλασσαιμικών για την άψογη συμπεριφορά τους.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την ErasmusCoordinator μου και πλέον Μέντορα μου, AntonellaPantaleo, η οποία αποτέλεσε τον κρίκο για την περάτωση της παρούσας εργασίας με τις ιδέες της και την θετική ενέργεια της, δίνοντας μου κουράγιο να δοκιμάσω τις τεχνικές τους και να τις εφαρμόσω στα δείγματα μου. Ευχαριστώ ιδιαίτερα την Κα Χατζηδημητρίου που με βοήθησε να κάνω την πρακτική μου άσκηση στο Πανεπιστήμιο του Σάσσαρι καθώς αυτό αποτέλεσε το κίνητρο να κάνω την πτυχιακή μου ερευνώντας τους Σαρδήνιους.

Βέβαια, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στους γονείς μου και την κοπέλα μου που με στήριξαν ηθικά και ψυχολογικά σε όλο το διάστημα αυτό. Την παρούσα εργασία την αφιερώω στον αδερφό μου Παναγιώτη.

## **ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## **ΚΕΦ.1<sup>ο</sup>: ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ**

Για να μπορέσουμε να κατανοήσουμε πλήρως την παθοφυσιολογία της θαλασσαιμίας, ως προς το αιματολογικό επίπεδο της πρέπει πρώτα να γνωρίσουμε την φυσιολογία του αίματος και κυρίως των ερυθρών αιμοσφαιρίων.

### **1.1. Αίμα**



Εικόνα 1 (3000 φοιτητές του Πανεπιστημίου Baekseok σχημάτισαν μια σταγόνα αίματος σε χιονοδρομικό κέντρο ανατολικά της Σεούλ, με σκοπό την ευαισθητοποίηση για εθελοντική αιμοδοσία.

Το αίμα είναι είδος συνδετικού ιστού που βρίσκεται σε υγρή μορφή. Ο ολικός όγκος του αίματος εκφρασμένος σε λίτρα αντιστοιχεί με το 7% περίπου του σωματικού βάρους ενός άνδρα και το 5.5% περίπου του σωματικού βάρους μιας γυναίκας. Το pH του είναι ελαφρά αλκαλικό (7.33-7.45) και η σχετική του πυκνότητα ως προς το νερό είναι περίπου 1.06. Αποτελείται από κύτταρα (έμμορφα συστατικά) τα οποία αιωρούνται μέσα στο πλάσμα. Το πλάσμα

αποτελείται από νερό (90%) και ένα μεγάλο αριθμό οργανικών και ανόργανων ουσιών διαλυτών στο νερό.

**Οι πρωτεΐνες αποτελούν το 7% του πλάσματος :** Λευκωματίνες, ινωδογόνο και σφαιρίνες [α-σφαιρίνες (λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας, LDL)] [β-σφαιρίνες (πρωτεΐνες μεταφοράς, όπως τρανσφερίνη για την μεταφορά σιδήρου, σερουλοπλασμίνη για την μεταφορά χαλκού και πρωτεΐνες που προσδέχονται την ρετινόλη για τη μεταφορά της Βιταμίνης Α). Άλλα συστατικά του πλάσματος είναι, θρεπτικές ουσίες όπως η γλυκόζη, τα αμινοξέα, τα λιπίδια, βιταμίνες και ιχνοστοιχεία.

Επίσης ηλεκτρολύτες, όπως ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}^+\text{Cl}^-$ ), αλλά και αέρια όπως ( $\text{O}_2$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$ ). Τέλος περιέχονται παραπροϊόντα όπως η χολερυθρίνη, το ουρικό οξύ και η κρεατινίνη, όπως επίσης και οι πολύ σημαντικές ορμόνες.

Τα κύτταρα του αίματος είναι τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα λευκά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια. Μεταφορικά θα μπορούσαμε να θεωρήσουμε το αίμα ως το "μέσο μαζικής μεταφοράς" πολλών χρήσιμων και απαραίτητων στοιχείων του οργανισμού μας. Είναι σημαντικό να γνωρίζουμε τις μορφές αίματος τις οποίες θα συναντήσουμε αυτές είναι, πλάσμα, ορός και ολικό αίμα. Ολικό αίμα είναι η μορφή στην οποία βρίσκεται το αίμα όταν το παίρνουμε από τον αιμοδότη. Πλάσμα είναι το ολικό αίμα μείον τα έμμορφα συστατικά ενώ ορός είναι το πλάσμα μείον τους παράγοντες πήξης αφού δεν χρησιμοποιούμε αντιπηκτικό στην περίπτωση αυτή.

## 1.2. Ερυθρά αιμοσφαίρια

Είναι τα περισσότερα από τα κύτταρα του αίματος. Ο αριθμός τους κυμαίνεται από  $4.5 \cdot 10^6 - 6.2 \cdot 10^6 / \text{mm}^3$  αίματος στους άνδρες και από  $4 \cdot 10^6 - 5.4 \cdot 10^6 / \text{mm}^3$  αίματος στις γυναίκες. Προέρχονται από ωρίμανση του προερυθροβλάστη. Έχουν σχήμα αμφίκυκλου δίσκου, και διάμετρο περίπου  $7.5 \mu\text{m}$ . **Η κυτταρική μεμβράνη** των ερυθρών αιμοσφαιρίων έχει την κλασική δομή των κυτταρικών μεμβρανών και αποτελείται από διπλοστιβάδα φωσφολιπιδίων, χοληστερόλη, πρωτεΐνες και υδατάνθρακες. Οι πρωτεΐνες διακρίνονται σε διαμεμβρανικές, σε περιφερικές και στις γλυκοπρωτεΐνες που βρίσκονται προς την έξω μεριά της μεμβράνης και φέρουν τα αντιγόνα των ομάδων αίματος. Περιέχει ένζυμα αερόβιας και αναερόβιας γλυκόλυσης και αιμοσφαιρίνη, μια ειδική πρωτεΐνη που η κύρια λειτουργία της είναι η μεταφορά του οξυγόνου. Για την παραγωγή της αιμοσφαιρίνης είναι απαραίτητος ο σίδηρος, το φυλλικό οξύ και οι βιταμίνες  $\text{B}_6$  και  $\text{B}_{12}$ .

## 1.3. Band 3 / AE1

Ορισμένες πληροφορίες για την Band 3 τις οποίες θα χρησιμοποιήσουμε στην συνέχεια.. Η πρωτεΐνης Κυτταρικής μεμβράνης, με όνομα Band 3, το όνομα της οποίας προέρχεται από τη θέση που παίρνει σε πηκτώματα electrophoresis. Είναι η κυρίαρχη πρωτεΐνη-μεταφορέας μεμβράνης σε ερυθρά κύτταρα του αίματος και παίζει κεντρικό ρόλο στη δομή και τη λειτουργία αυτών των κυττάρων. Αυτή η πρωτεΐνη είναι επίσης γνωστή ως AE1. Χρησιμοποιείται ως μέσο σύνδεσης μέτρησης οξειδωτικού στρες σε ασθενείς με αιμοσφαιρινοπάθειες.

#### 1.4. Μεθαιμογλουβίνη

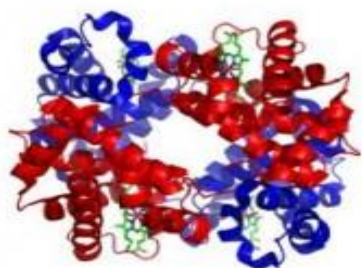
Η μεθαιμογλουβίνη είναι μια μορφή της μεταφοράς οξυγόνου της αιμοσφαιρίνης στην οποία ο σίδηρος στην ομάδα αίμης βρίσκεται στην κατάσταση  $Fe^{3+}$  (τρισθενούς σιδήρου) και όχι σε  $Fe^{2+}$  (σιδηρούχα) της κανονικής αιμοσφαιρίνης. Η μεθαιμοσφαιρίνη δεν μπορεί να δεσμεύσει το οξυγόνο, σε αντίθεση με την οξυαιμοσφαιρίνη. Έχει γαλαζωπό σοκολατοκαφέ χρώμα. Στο ανθρώπινο αίμα μια ποσότητα ίχνους μεθαιμοσφαιρίνης παράγεται κανονικά αυθόρμητα, αλλά όταν είναι σε περίσσεια το αίμα γίνεται ασυνήθιστα σκούρο μπλε καφέ. Το NADH-εξαρτώμενο ένζυμο της αναγωγής μεθαιμοσφαιρίνης (διαφοράση I) είναι υπεύθυνο για τη μετατροπή μεθαιμοσφαιρίνης σε αιμοσφαιρίνη. Κανονικά το 1-2% αιμοσφαιρίνης ενός ατόμου αποτελείται από μεθαιμοσφαιρίνη. Ένα υψηλότερο ποσοστό από αυτό μπορεί να είναι γενετικό ή να προκαλείται από την έκθεση σε διάφορες χημικές ουσίες και ανάλογα με το επίπεδο μπορεί να προκαλέσει προβλήματα υγείας γνωστά ως μεθαιμοσφαιριναιμία. Για τη θεραπεία της δηλητηρίασης με κυανιούχα, χορηγείται νιτρώδες αμύλιο. Λειτουργεί μετατρέποντας την αιμοσφαιρίνη σε μεθαιμοσφαιρίνη, η οποία επιτρέπει την πρόσδεση του κυανίου και το σχηματισμό των μη τοξικών κυανομεθαιμοσφαιρίνης.

Κορεσμός μεθαιμοσφαιρίνης: εκφράζεται ως το ποσοστό της αιμοσφαιρίνης στην κατάσταση μεθαιμοσφαιρίνης (MetHb).

1-2%	Φυσιολογικό
Λιγότερο από το 10% metHb	Δεν υπάρχουν συμπτώματα
10-20% metHb	Αποχρωματισμός του δέρματος (κυρίως στους βλεννογόνους)
<b>20-30% metHb</b>	<b>Άγχος, πονοκέφαλος, δύσπνοια στην κόπωση</b>
30-50% metHb	Κόπωση, σύγχυση, ζάλη, ταχύπνοια, ταχυκαρδία

50-70% metHb	Κώμα, σπασμοί, αρρυθμίες, οξέωση
Μεγαλύτερη από 70% metHb	Θάνατος

### 1.5.Αιμοσφαιρίνη



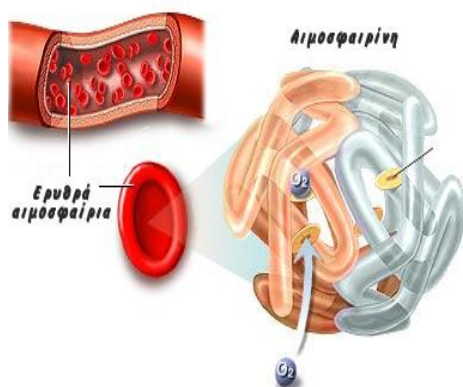
Εικόνα 2: Τρισδιάστατη δομή της αιμοσφαιρίνης (Hb). Με μπλε και κόκκινο απεικονίζονται οι 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες, ενώ με πράσινο οι ομάδες της αίμης που συγκρατούν τον δισθενή σίδηρο.

Η αιμοσφαιρίνη (Hb) είναι μια μεταλλοπρωτεΐνη που ανακαλύφθηκε από τον Hünefeld το 1840. Αποτελεί το βασικό συστατικό των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Το μακρομόριο αυτό έχει μελετηθεί εκτεταμένα σε όλα τα επίπεδα παραγωγής του στους ανώτερους οργανισμούς και

κυρίως στον άνθρωπο (*Homo sapiens*) και στο ποντίκι (*Mus musculus*). Οι αιμοσφαιρινοπάθειες λειτούργησαν ως φυσικά μοντέλα μελέτης και απέδωσαν άμεσες και σημαντικές

πληροφορίες σχετικά με την οργάνωση και τη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων καθώς και καθοριστικά στοιχεία για το πώς επηρεάζει η οντογένεση τη γονιδιακή έκφραση. Οι κύριοι τύποι αιμοσφαιρίνης σε ένα ενήλικα είναι η HbF, HbA, HbA<sub>2</sub>.

#### Δομή και λειτουργία αιμοσφαιρινών



Εικόνα 3: Αιμοσφαιρίνη και ερυθρά αιμοσφαίρια

Το 1959 ο Max Perutz, μετά από προσπάθειες πολλών ερευνητών (Otto Funke, Felix Hoppe-Seyler), προσδιόρισε τελικά τη δομή της αιμοσφαιρίνης με κρυσταλλογραφία ακτινών X. Η αιμοσφαιρίνη των θηλαστικών αποτελείται από δύο μικρότερες ουσίες, την αίμη και την σφαιρίνη. Αίμη είναι η ουσία που δίνει την κόκκινη χροιά στα ερυθρά. Σφαιρίνη είναι η ουσία που συνδέεται με το μόριο της αίμης για να σχηματίσει το μόριο της

αιμοσφαιρίνης. Υποδιαιρείται σε τέσσερα τμήματα που επειδή έχουν ήδη σχήμα αλυσίδας καλούνται αλυσίδες της σφαιρίνης. Οι αλυσίδες αυτές δεν είναι όλες ίδιες μεταξύ τους αλλά

ανά δύο. Στους ενήλικες, το μόριο της ανθρώπινης αιμοσφαιρίνης (Hb), είναι ένα τετραμερές (M.B 64.000 Da) που αποτελείται συνήθως από δύο α- και δύο β- πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Άλλες μορφές της αιμοσφαιρίνης είναι δυνατόν να παρατηρηθούν με εναλλαγή των δύο β-αλυσίδων με δύο γ- ή με δύο δ-αλυσίδες ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο του ατόμου. Παρόλο που τα δύο είδη αλυσίδων είναι παρόμοιου μεγέθους, διαφέρουν στην αλληλουχία των αμινοξικών τους καταλοίπων. Η τριτοταγής δομή κάθε πολυπεπτιδικής αλυσίδας δημιουργείται από μη ομοιοπολικούς δευτερεύοντες δεσμούς. Η τεταρτοταγής δομή τους καθορίζεται από την επιφάνειά τους, η οποία καλύπτεται από πολικές (υδρόφιλες) ομάδες, κυρίως προπιονικού οξέος (Perutz et al., 1968). Οι τέσσερις αυτές αλυσίδες συγκρατούνται με μη ομοιοπολικές έλξεις. Η κάθε αλυσίδα περιέχει μία ομάδα αίμης και μία θέση δέσμευσης οξυγόνου. Η αίμη είναι μια προσθετική ομάδα που αποτελείται από ένα άτομο σιδήρου, το οποίο είναι υπεύθυνο για την δέσμευση του οξυγόνου και εντοπίζεται στο κέντρο ενός μεγάλου ετεροκυκλικού οργανικού δακτυλίου, που ονομάζεται πορφυρίνη.

Συνοπτικά, κάθε αλυσίδα στο μόριο της αιμοσφαιρίνης συνδέεται :

α) με τις γειτονικές αλυσίδες

β) ένα μόριο αίμης

γ) ένα μόριο σιδήρου και

δ) ένα μόριο οξυγόνου (το οποίο δεν συμμετέχει στη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης, αλλά συνδέεται, μεταφέρεται και αποδίδεται στους ιστούς)

### **1.6.Ερυθροποίηση/Ωριμα Ερυθροκύτταρα**

Η ερυθροποίηση είναι η διαδικασία με την οποία παράγονται τα ερυθρά αιμοσφαίρια (ερυθροκύτταρα). Η ερυθροποίηση διεγείρεται από τα μειωμένα επίπεδα O<sub>2</sub> στην κυκλοφορία, τα οποία γίνονται αντιληπτά από τους νεφρούς, οι οποίοι στη συνέχεια εκκρίνουν την ορμόνη ερυθροποιητίνη. Η ερυθροποιητίνη διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των πρόδρομων ερυθροκυττάρων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη ερυθροποίηση στους αιμοποιητικούς ιστούς. Στα θηλαστικά,

συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου, μετά την γέννηση η ερυθροποίηση λαμβάνει χώρα στο μυελό των οστών.

Τα ώριμα ερυθροκύτταρα παράγουν κατά κύριο λόγο την αιμοσφαιρίνη των ενηλίκων, HbA. Η αιμοσφαιρίνη ( Hb ) συναντάται σε διάφορες μορφές με βάση την αλληλουχία των αμινοξέων σε κάθε υπομονάδα της. Στον ενήλικα υπάρχουν τρία είδη αιμοσφαιρίνης: Η HbA1 αποτελεί το 97%, η HbA2 το 2% και η HbF το 1% της αιμοσφαιρίνης σε υγιή άτομα. Στα νεογέννητα η HbF αποτελεί το 80%, αλλά σταδιακά αυτή η αναλογία ελαττώνεται και περίπου τον 8ο μήνα μετά τη γέννηση τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης φθάνουν αυτά των ενηλίκων. Παρόλα αυτά, υπάρχει φυσιολογικά ένας υποπληθυσμός ερυθροκυττάρων, στα οποία κατά την ανάπτυξη του ανθρώπου δεν ολοκληρώνεται η μετάβαση από την εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη, HbF, σε εκείνη των ενηλίκων, HbA. Αυτά τα ερυθροκύτταρα ονομάζονται F-κύτταρα.

## **ΚΕΦ. 2<sup>ο</sup>: ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΑΣ**

### **3.3. Δομή και οργάνωση των γονιδίων των σφαιρινών του ανθρώπου**



Εικόνα 1. Διπλή έλικα DNA

Το κάθε χαρακτηριστικό του σώματός μας συντονίζεται (ελέγχεται) από γονίδια (ή μονάδες DNA), τα οποία περιέχουν ένα λεπτομερή κώδικα που ελέγχει την ανάπτυξή μας, όπως επίσης και όλες τις σωματικές μας λειτουργίες από την εμβρυϊκή ηλικία.

Τα γονίδια αυτά βρίσκονται σε κάθε κύτταρο του σώματός μας. Δύο γονίδια είναι υπεύθυνα για κάθε χαρακτηριστικό μας, το ένα προέρχεται από τη μητέρα και το άλλο από τον πατέρα. Για τη σύνθεση της ανθρώπινης φυσιολογικής αιμοσφαιρίνης υπάρχουν

δύο γονίδια που ελέγχουν την παραγωγή του β μέρους και άλλα τέσσερα γονίδια που



ευθύνονται για την παραγωγή του α μέρους της πρωτεΐνης αυτής. Τα γονίδια στη Θαλασσαιμία δεν λειτουργούν φυσιολογικά, δηλαδή δεν παράγουν την κατάλληλη ποσότητα είτε του α μέρους (α-Θαλασσαιμία) είτε του β μέρους της αιμοσφαιρίνης (β-Θαλασσαιμία). Η έλλειψη φυσιολογικής αιμοσφαιρίνης οδηγεί στην παραγωγή μη φυσιολογικών ερυθροκυττάρων, τα οποία καταστρέφονται νωρίτερα από τα φυσιολογικά ερυθροκύτταρα ενός υγιούς ατόμου, με αποτέλεσμα να προκύπτει σοβαρή αναιμία, η οποία με τη σειρά της προκαλεί ελλιπή οξυγόνωση. Η λέξη αναιμία είναι ελληνική και σημαίνει απλά έλλειψη αίματος.

Τα γονίδια των ανθρωπίνων σφαιρινών είναι οργανωμένα σε πολυγονιδιακά συμπλέγματα (συστάδες) (clusters), το α- και το β-σφαιρινικό γονιδιακό σύμπλεγμα, αλλιώς γνωστοί και ως α- και β-γονιδιακοί τόποι. Η οργάνωση σε γονιδιακούς τόπους είναι ένας συνηθισμένος τρόπος οργάνωσης των γονιδίων των θηλαστικών. Ο γονιδιακός τόπος της α-σφαιρίνης βρίσκεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος **16**. Περιλαμβάνει μια περιοχή πλούσια σε GC, πλούσια σε γονίδια και η δομή χρωματίνης της παραμένει μόνιμα προσβάσιμη, παρόμοια με πολλά γονίδια κυτταρικής οικονομίας (housekeeping). Ο β-γονιδιακός τόπος βρίσκεται σε μια περιοχή πλούσια σε AT στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος **11**. Εντάσσεται σε μια ευρεία περιοχή απενεργοποιημένων γονιδίων του «ακουστικού υποδοχέα» (olfactory receptor (OR) genes). Κατά τα μεταγενέστερα στάδια της διαφοροποίησης των ερυθροκυττάρων, τα γονίδια του α- και του β- γονιδιακού τόπου εκφράζονται σε εξαιρετικά υψηλά επίπεδα. Αυτό είναι απαραίτητο προκειμένου να γεμίσει το τελικό διαφοροποιημένο ερυθροκύτταρο με αιμοσφαιρίνη. Το πώς τα β-σφαιρινικά γονίδια επιτυγχάνουν τα εξαιρετικά υψηλά επίπεδα έκφρασής τους παρά την θέση τους μέσα σε ένα κατασταλτικό περιβάλλον χρωματίνης, έχει αποτελέσει αντικείμενο εντατικής έρευνας.

Το μήκος των συμπλεγμάτων των α- και β-σφαιρινών, συμπεριλαμβανομένων και των κύριων ρυθμιστικών τους περιοχών είναι 60.000 και 70.000 ζεύγη βάσεων (bp) αντίστοιχα. Η σειρά εντοπισμού των γονιδίων στους δύο γονιδιακούς τόπους με κατεύθυνση 5' προς 3' καθορίζει και την διαδοχική τους, ιστική και χρονική έκφραση στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια κατά την οντογένεση.

### 3.4. Μεταλλάξεις

Οι θαλασσαιμίες δημιουργούνται από πολλές διαφορετικές μεταλλάξεις που οδηγούν στην απώλεια ή την ανώμαλη λειτουργία μίας αλυσίδας αιμοσφαιρίνης με διαφορετικούς τρόπους:

1. Απώλεια του γονιδίου
2. Το γονίδιο υπάρχει αλλά η σύνθεση ή η επεξεργασία του RNA δεν είναι φυσιολογική. Μεταλλάξεις μέσα στα ιντρόνια ή κοντά στα σημεία συνόρων ιντρονίων-εξονίων μπορεί να οδηγήσουν σε μη κανονικό μάτισμα του πρωτογενούς μεταγραφήματος RNA.
3. Το mRNA της αιμοσφαιρίνης παράγεται σε φυσιολογικές ποσότητες αλλά κωδικοποιεί μη φυσιολογική πρωτεΐνη. Για παράδειγμα, μετάλλαξη ενός κωδικονίου αμινοξέος σε κωδικόνιο λήξης έχει ως αποτέλεσμα τον πρόωρο τερματισμό της πρωτεϊνοσύνθεσης. Η απομάκρυνση ή η προσθήκη ενός νουκλεοτιδίου, που ονομάζεται πλαισιοκινητική μετάλλαξη, οδηγεί σε μια τελείως διαφορετική αλληλουχία αμινοξέων μετά την μετάλλαξη. Οι περισσότερες από αυτές τις αλυσίδες αιμοσφαιρίνης είναι ασταθείς και γρήγορα αποικοδομούνται.

## **ΚΕΦ. 3<sup>ο</sup>. ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΑ**

### **3.1.Ιστορική αναδρομή στην θαλασσαιμία**

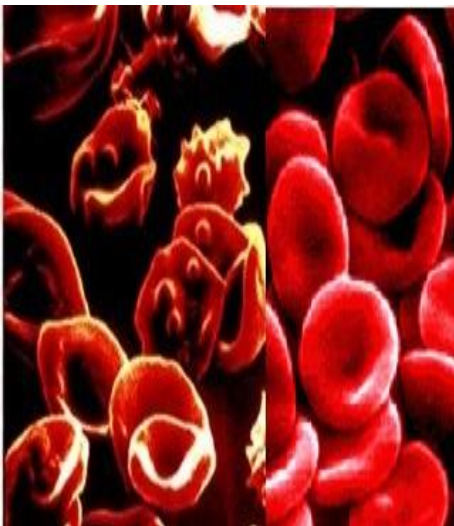
Η πρώτη εμπειριστατωμένη περιγραφή της νόσου έγινε σε άτομα καταγόμενα από χώρες της Μεσογείου, από τον αμερικανό παιδίατρο και αιματολόγο, TB Cooley το 1925, εξ ου και η ονομασία νόσος του Cooley. Έχει επικρατήσει διεθνώς η χρήση της λέξης θαλασσαιμία ,το όνομα αυτό επινοήθηκε στο Πανεπιστήμιο του Ρότσεστερ στα βόρεια της πολιτείας της Νέας Υόρκης από τον βραβευμένο με Νόμπελ παθολόγο George Whipple και τον καθηγητή Παιδιατρικής Γουίλιαμ Μπράντφορντ από την ελληνική λέξη θάλασσα (thalassa) και αίμα (emía). Αποτελεί μια απο τις σοβαρότερες αιμοσφαιρινοπάθειες και κληρονομικές ασθένειες παγκοσμίως. Στην Ελλάδα αποτελούν το σημαντικότερο γενετικό νόσημα.

Οι πρώτες δημοσιεύσεις, σχετικά με την ανακάλυψη ύπαρξης της νόσου, ανήκαν στον Von Jaksch το 1889, ο οποίος αποτέλεσε τον προπομπό της ουσιαστικής ανακάλυψης του Cooley το 1925. Ο Cooley και ο Lee περιεγραψαν πέντε περιπτώσεις αναιμίας σε παιδιά που έχουν

ασυνήθιστα ακτινολογικές αλλαγές στα οστά (χαρακτηριστικό γνώρισμα των θαλασσαιμικών). Ιδιαίτερα μεγάλο ενδιαφέρον είχε στραφεί προς αυτή την κατάσταση. Όπως έχουν αναφερθεί και άλλες περιπτώσεις, υπήρχε δυσκολία στην ταξινόμηση αυτού του τύπου της αναιμίας. Όταν ο Cooley περιέγραψε τις ιδιόμορφες αλλαγές στα οστά που συμβαίνουν στις πρώτες περιπτώσεις του, ανέφερε ότι αυτού του είδους η αναιμία δεν διέφερε με εκείνη που περιέγραψε πρώτος ο von Jaksch. Ωστόσο, είναι προφανές ότι οι κλινικοί γιατροί συνεχίζουν να διαφωνούν λόγω της αόριστης κατάταξης της αναιμίας που περιέγραψε τότε ο von Jaksch.

Τα μεσογειακά σύνδρομα (θαλασσαιμία) κατατάσσονται σύμφωνα με το είδος της αλυσίδας της οποίας η σύνθεση υπολείπεται. Ανάλογα με την αλυσίδα που αφορά το γενετικό πρόβλημα, τα θαλασσαιμικά σύνδρομα διακρίνονται σε α/θαλασσαιμίες και β/θαλασσαιμίες κυρίως ενώ υπάρχουν και πιο σπάνιες μορφές όπως οι γ και οι δ θαλασσαιμίες. Οι α-θαλασσαιμίες σε ομόζυγο μορφή δεν είναι συμβατές με τη ζωή, ενώ οι α-ετερόζυγες μορφές δεν προκαλούν ιδιαίτερα κλινικά προβλήματα. Οι β-θαλασσαιμίες είναι περισσότερο συχνές και με μεγαλύτερη κλινική βαρύτητα. Οι α-θαλασσαιμίες είναι περισσότερο συχνές στη νοτιο-ανατολική Ασία και στην Κίνα, ενώ οι β-θαλασσαιμίες απαντώνται συχνότερα στους λαούς που κατοικούν γύρω από τη Μεσόγειο θάλασσα. Η γ-μεσογειακή αναιμία δεν παρατηρείται λόγω του ότι έμβρυο με έλλειψη των γ-αλυσίδων αποβάλλεται αυτόματα. Στην δ-θαλασσαιμία ανιχνεύονται μεταλλάξεις που αφορούν το γονίδιο της δ-σφαιρίνης. Είναι μια “αθώα” μορφή αναιμίας στην οποία ανιχνεύεται έλλειψη της HbA<sub>2</sub>, που βρίσκεται ούτως ή άλλως σε πολύ μικρά ποσοστά στο φυσιολογικό ενήλικο άτομο.

### 3.2. Παθοφυσιολογία της Θαλασσαιμίας



Εικόνα 1: Ερυθρά αιμοσφαίρια

Συγκεκριμένα λοιπόν, γνωρίζοντας ότι τα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι ο πιο πολυπληθής τύπος κυττάρου του αίματος και ο βασικός μηχανισμός που διαθέτουν τα σπονδυλωτά για την μεταφορά οξυγόνου (O<sub>2</sub>) στους διάφορους ιστούς του οργανισμού μέσω της ροής του αίματος, χάρη στην αιμοσφαιρίνη κατανοούμε ότι στην περίπτωση της Θαλασσαιμίας λόγω της ελλειψόμενης σύνθεσης είτε των α είτε των β αλυσίδων οι οποίες

σχηματίζουν το κανονικό μόριο της αιμοσφαιρίνης του ενήλικα (HbA,  $\alpha_2\beta_2$ ) έχουμε σαν αποτέλεσμα την μείωση της πλήρωσης των ερυθρών κυττάρων με αιμοσφαιρίνη και αναιμία. Οπότε πρόκειται για αδυναμία παραγωγής φυσιολογικών μορίων αιμοσφαιρίνης, λόγω βλάβης του γονιδίου που ελέγχει την παραγωγή της.

### 3.3. Βήτα θαλασσαιμία

Αποτελεί μια ομάδα κληρονομικών νοσημάτων ευρέως διαδεδομένη στον ελλαδικό χώρο, η οποία οφείλεται σε ελαττωμένη σύνθεση της β-αλυσίδας λόγω μεταλλάξεων του β-γονιδίου. Το γονίδιο της β αλυσίδας, αιμοσφαιρίνης (Hb β) βρίσκεται στο σύμπλεγμα των β-γονιδίων στο βραχύ σκέλος του χρωματοσώματος 11. Η σοβαρότητα της νόσου εξαρτάται από την φύση της μετάλλαξης, οι οποίες έχουν σαν συνέπεια την μειωμένη παραγωγή β-αλυσίδων, με αποτέλεσμα η περίσσεια των α-αλυσίδων να σχηματίζει τετραμερή με σφαιρίνες δ ή γ, σχηματίζοντας αντίστοιχα τις A2 και F. Από μελέτες που έχουν γίνει σε ασθενείς με β-M.A και σε μεγάλο αριθμό ετεροζυγωτών έχουν καταγραφεί περίπου 35 σημειακές μεταλλάξεις που εντοπίζονται στο β-γονίδιο αιμοσφαιρίνης από τις οποίες οι 11 εξ αυτών καλύπτουν περίπου το 98% των παθολογικών αλληλόμορφων.

Οι μεταλλάξεις οι οποίες περιορίζουν τη σύνθεση των β-αλυσίδων αιμοσφαιρίνης είναι γνωστές ως μεταλλάξεις  $\beta^+$ , ενώ αυτές οι οποίες καταργούν ολοκληρωτικά τη σύνθεση τους χαρακτηρίζονται ως μεταλλάξεις  $\beta^0$ . Κάποιες μεταλλάξεις που επιτρέπουν σε ένα μεγάλο βαθμό τη σύνθεση των β αλυσίδων είναι γνωστές ως μεταλλάξεις  $\beta^{++}$ .

#### 3.3.1. Παθοφυσιολογία της β-ομόζυγης θαλασσαιμίας

Η αντιμετώπιση της θαλασσαιμίας έγινε ευκολότερη όταν κατανοήθηκε η παθοφυσιολογία της νόσου από την επιστημονική και ιατρική κοινότητα. Η σοβαρή δυσαναλογία των αλυσών της σφαιρίνης και η συσσώρευση επιπλέον α-αλυσών είναι η αιτία της μη αποδοτικής ερυθροποίησης, της επέκτασης του μυελού των οστών, των σκελετικών παραμορφώσεων και της αυξημένης απορρόφησης σιδήρου. Οπωσδήποτε, το τελικό αποτέλεσμα της θαλασσαιμικής διαταραχής είναι ο πρόωρος μαζικός θάνατος ερυθροβλαστών στον μυελό και η παραγωγή ελάχιστων μισοάδειωνερυθροκυττάρων, που καταστρέφονται, επίσης πρόωρα, στον σπλήνα. Ο βαθμός της ανισορροπίας των αλυσών της σφαιρίνης καθορίζεται από τη

φύση της μετάλλαξης του β-γονιδίου. Το σύμβολο β υποδηλώνει τη πλήρη απουσία της παραγωγής της β-σφαιρίνης από τα παθολογικά γονίδια και το σύμβολο β<sup>+</sup> υποδηλώνει το αλληλίο με υπολειπόμενη παραγωγή β-σφαιρίνης (περίπου 10%). Στην β<sup>++</sup> ο περιορισμός της παράγωγης είναι πολύ ήπιος. Μέχρι σήμερα, έχουν αναφερθεί περισσότερες από 200 θαλασσαιμικές μεταλλάξεις σε όλο τον κόσμο.

### 3.3.2. Β-θαλασσαιμία και οικογενειακός προγραμματισμός

Τα γονίδια για την β θαλασσαιμία είναι διαδεδομένα σε ανθρώπους μεσανατολικής, μεσογειακής, ινδικής/χερσονήσου και νοτιοανατολικής ασιατικής καταγωγής. Τα ζευγάρια που προγραμματίζουν να κάνουν οικογένεια, ή νωρίς στην εγκυμοσύνη, πρέπει να κάνουν μια εξέταση αίματος για να δουν κατά πόσο είναι φορείς ή όχι, εάν η καταγωγή μιας εκ των οικογενειών τους είναι από τις περιοχές που αναφέρονται παραπάνω, ή εάν έχουν οικογενειακό ιστορικό οποιασδήποτε διαταραχής αίματος ή αναιμίας. Αυτή η εξέταση χρειάζεται για να καθοριστεί εάν υπάρχει οποιοσδήποτε κίνδυνος να έχει το παιδί επιπτώσεις από μια γενετική διαταραχή αίματος. Τα άτομα που διατρέχουν τον κίνδυνο να έχουν επηρεασμένο παιδί έχουν επιλογές. Αυτή η πάθηση μπορεί να διαγνωστεί ακόμη και από την 12η εβδομάδα της εγκυμοσύνης. Εάν κριθεί απαραίτητο, μπορεί μετά να εξεταστεί ο τερματισμός της εγκυμοσύνης. Οι άνθρωποι μπορούν να υιοθετήσουν ή μπορούν να εξετάσουν τις υποβοηθούμενες αναπαραγωγικές τεχνικές (όπως η προεμφυτευτική γενετική διάγνωση, χρήση ωαρίων δωρητών ή σπέρμα δωρητών) ενώ άλλοι ίσως επιλέξουν να διακινδυνεύσουν να έχουν επηρεασμένο παιδί.

### 3.3.3. Παραλλαγές της β-θαλασσαιμίας

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

Στα αλληλόμορφα αυτά περιλαμβάνονται ένα πλήθος μοριακών βλαβών από παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις έως δημιουργία «κολοβών» β αλυσίδων σαν αποτέλεσμα μη νοσηματικών μεταλλάξεων. η νουκλεοτιδική αλλαγή που εντοπίζεται σε όλες τις περιπτώσεις προκαλεί σύνθεση ιδιαίτερα ασταθών β αλυσίδων οι οποίες είναι, συνήθως, μη ανιχνεύσιμες σε πρωτεϊνικό επίπεδο, και η ύπαρξή τους εντοπίζεται μόνο στο DNA. η κλινική βαρύτητα αυτής της μορφής β μΑ εξαρτάται από την αστάθεια των παθολογικών β αλυσίδων αιμοσφαιρίνης<sup>28</sup>. Σε πολλές οικογένειες η ανάλυση σύνδεσης απέδειξε ότι ο φαινότυπος της β μΑ κληρονομείται ανεξάρτητα από το σύμπλεγμα των β αλυσίδων αιμοσφαιρίνης, υποδεικνύοντας ότι η γενετική διαταραχή ανήκει σε παράγοντες που επιδρούν από άλλες περιοχές του γονιδιώματος (trans-acting). Περίπου το 1% των περιπτώσεων της β-M μπορεί να ανήκει σε αυτή την κατηγορία. μεταλλάξεις στον αντιγραφικό παράγοντα GATA 1 στο χρωμόσωμα X έχει αναφερθεί ότι προκαλεί β μΑ μαζί με θρομβοπενία. Αυτό ήταν το πρώτο παράδειγμα β μΑ στον άνθρωπο που οφείλονταν σε μετάλλαξη ενός ερυθροειδικού μεταγραφικού παράγοντα<sup>29</sup>. Πρόσφατα βρέθηκε ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο XPD που προκαλεί μελαχρωματική ξηροδερμία συχνά συνοδεύονται από φαινότυπο ετερόζυγης β μΑ, δηλαδή μειωμένη παραγωγή β αλυσίδων και μειωμένα επίπεδα β mRNA. Έχει διαπιστωθεί ότι η πρωτεΐνη XPD αποτελεί μια υπομονάδα του βασικού μεταγραφικού παράγοντα TF11H ο οποίος εμπλέκεται και στη διόρθωση του DNA.

#### **3.3.4. Συνέπειες της θαλασσαιμικής βλάβης**

Αναμφισβήτητα, η κύρια συνέπεια της μη αποδοτικής ερυθροποίησης στον μυελό σε συνδυασμό με την αυξημένη αιμόλυση στο περιφερικό αίμα είναι η αναιμία. η ιστική ανοξία ωθεί ολοένα και περισσότερο την παραγωγή ερυθροποιητίνης και αυτή, με την σειρά της, επεκτείνει τον ερυθροποιητικό μυελό, όσοι και όπου αυτό είναι δυνατό. Αυτό επιφέρει τη βαρεία οστεοπόρωση των ασθενών, την διαπλάτυνση της διπλής και των ζυγωματικών οστών του κρανίου, και την ανάπτυξη εξωμυελικών εστιών ερυθροποίησης στον σπλήνα και το ήπαρ και τις εντυπωσιακές μάζες εξωμυελικής αιμοποίησης, συνήθως κοντά στους σπονδύλους, που συχνά αποδεικνύονται εξαιρετικά επικίνδυνες με την πίεση που επιφέρουν σε ζωτικά όργανα και τον νωτιαίο μυελό. Όμως η αντιρροπιστική αυτή προσπάθεια δεν επαρκεί. Οι θαλασσαιμικοί ασθενείς έχουν αναιμία ποικίλης βαρύτητας με επίπεδα αιμοσφαιρίνης που άλλοτε πανικοβάλλουν τους θεράποντες και άλλοτε τους εντυπωσιάζουν γιατί επιτρέπουν μια σχετικά καλή επιβίωση. Εμφανείς συνέπειες της αναιμίας είναι η δύσπνοια και η κόπωση στην προσπάθεια και η ταχυκαρδία, προοδευτικά όμως αυτές εξελίσσονται σε καρδιακή ανεπάρκεια με δύσπνοια στην ηρεμία,, οίδημα κάτω άκρων και

επικίνδυνες αρρυθμίες. Τα καρδιακά αυτά προβλήματα επιβαρύνονται και με άλλους μηχανισμούς, όπως η πρωτοπαθής και δευτεροπαθής αιμοσιδήρωση, διάφοροι λοιμώδεις παράγοντες και η πνευμονική υπέρταση, απότοκη των μικροεμβολών από ράκη ερυθροκυττάρων και αιμοπετάλια, που κυκλοφορούν άφθονα, ιδιαίτερα μετά από σπληνεκτομή.

### 3.3.5. Κλινικές εκδηλώσεις β-ομόζυγης θαλασσαιμίας

- Προδιάθεση στις λοιμώξεις
- Ηπατομεγαλία
- Μογγολοειδές προσωπείο
- Σακχαρώδης διαβήτης
- Αναιμία που εμφανίζεται από τους πρώτους μήνες της ζωής
- Καθυστέρηση της ανάπτυξης του παιδιού, αισθητή στην ηλικία των 9-10 χρόνων

Beta Thalassemia Major – bone changes



- Χολολιθίαση

Εικόνα 2: Τύπος μογγολοειδούς προσώπου χαρακτηριστική η προβολή του μετώπου και οι διαταραχές της θέσης έκφυσης των δοντιών. Επίσης αύξηση του εύρους της διπλής του κρανίου ( χαρακτηριστική η ακτινολογική εικόνα που μοιάζει με βούρτσα).

- Υπερσπληνισμός

### 3.3.6. Εργαστηριακά ευρήματα β-θαλασσαιμίας

	ΕΤΕΡΟΖΥΓΟΣ β.Μ.Α.	ΕΝΔΙΑΜΕΣΗ β.Μ.Α.	ΟΜΟΖΥΓΟΣ β.Μ.Α.
Ερυθροκυτταρικοί δείκτες	↓ (RDW: κ.φ)	↓	↓↓ (↑RDW)
Επίκρισμα περιφερικού αίματος	ανισοκυττάρωση, ποικιλοκυττάρωση, μικροκυττάρωση (1)	Ευρήματα ετερόζυγης και εμπύρηνων ερυθρών (2)	(1+2), δακρυοκύτταρα, σχιστοκύτταρα
Επίπεδα Hb	Hb > 10 gr/dl	7-10 g/dl	Hb 2-7 g/dl εφόσον δεν γίνουν μεταγγίσεις
RBC	↑		
Μυελός	Ηπια ερυθροβλαστική α	Έντονη ερυθροβλαστική	Έντονη ερυθροβλαστική
Ηλεκτροφόρηση Hb	HbA <sub>2</sub> ↑ (3,5-6,5%) HbF ↑ (R/R <sup>0</sup> 7%)	HbF 30-50% HbA <sub>1</sub> ~4%	β <sup>0</sup> /β <sup>0</sup> HbF 100% R+/R+ HbF 70-80%

Στις δομικές αιμοσφαιρινοπάθειες, οι δείκτες των ερυθρών είναι σημαντικοί για τη διάγνωση των αιμοσφαιρινοπαθειών. Αυτοί οι δείκτες περιλαμβάνουν την αιμοσφαιρίνη, τον αριθμό των ερυθρών και την κατανομή των ερυθρών. Είναι γνωστό ότι, οι θαλασσαιμίες ανήκουν στις υπόχρωμες μικροκυτταρικές αναιμίες. ο μέσος όγκος ερυθρών (MCV) είναι το κλειδί και ένας από τους σημαντικότερους δείκτες της διάγνωσης. Οι θαλασσαιμικοί ασθενείς έχουν ελαττωμένο MCV και μία μελέτη έχει δείξει ότι MCV 72fL είναι ένας δείκτης πολύ ευαίσθητος και ειδικός για μια πιθανή διάγνωση θαλασσαιμικού συνδρόμου. Το RDW (εύρος κατανομής όγκου των ερυθρών) είναι ένας δείκτης που φανερώνει την ποικιλία του μεγέθους των ερυθρών (ανισοκυττάρωση). Πολλές υπόχρωμες μικροκυτταρικές αναιμίες χαρακτηρίζονται από αύξηση του RDW, ενώ αντίθετα στις θαλασσαιμίες παράγεται ένας μοναδικός μικροκυτταρικός πληθυσμός ερυθρών, χωρίς συνεπακόλουθη αύξηση του RDW με εξαίρεση την αιμοσφαιρινοπάθεια ή και την ετερόζυγη δβ-μεσογειακή αναιμία. Παρ' όλα αυτά το RDW είναι ένας χρήσιμος δείκτης αλλά όχι μοναδικός για τη διάγνωση των θαλασσαιμικών συνδρόμων. Ένας άλλος δείκτης που είναι επίσης χρήσιμος, είναι ο αριθμός των ερυθρών, γιατί η μικροκυτταρική αναιμία της μεσογειακής αναιμίας συνοδεύεται από αυξημένο αριθμό ερυθρών αιμοσφαιρίων. Επίσης στη μείζονα και ενδιάμεση μεσογειακή αναιμία υπάρχει μέτρια ή σοβαρή ελάττωση της συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης.

### **3.3.7. Τα γονίδια στην β-θαλασσαιμία**

Στις β-θαλασσαιμίες, η σύνθεση των αλυσίδων της β-γλοβίνης είναι ελαττωμένη ή ανύπαρκτη, ενώ η σύνθεση των αλυσίδων της α-γλοβίνης είναι φυσιολογική. Οι αλυσίδες α-γλοβίνης δεν μπορούν να σχηματίσουν σταθερά τετραμερή και επομένως κατακρημνίζονται, προκαλώντας τον πρόωρο θάνατο των κυττάρων που αρχικά προορίζονταν να γίνουν ώριμα ερυθροκύτταρα. Επειδή υπάρχουν μόνο δύο αντίγραφα κάθε γονιδίου β- γλοβίνης, άτομα με ελαττωματικά γονίδια έχουν είτε στίγμα β-θαλασσαιμίας (ελάσσων β-θαλασσαιμία) αν έχουν μόνο ένα ελαττωματικό γονίδιο β-γλοβίνης, ή μείζονα β-θαλασσαιμία, αν και τα δύο γονίδια είναι ελαττωματικά. Επειδή το γονίδιο της β-γλοβίνης δεν εκφράζεται παρά σε προχωρημένα στάδια της κύησης, οι σωματικές εκδηλώσεις της β- θαλασσαιμίας εμφανίζονται μόνο μετά τη γέννηση. Τα άτομα εκείνα με ελάσσονα β-θαλασσαιμία, παράγουν μερικές β-αλυσίδες και



συνήθως δεν απαιτούν ειδική θεραπεία. Αντίθετα, τα βρέφη εκείνα που γεννιούνται με μείζονα β-θαλασσαιμία είναι φαινομενικά υγιή κατά τη γέννηση, αλλά γίνονται σοβαρά αναιμικά συνήθως κατά τη διάρκεια του πρώτου ή του δεύτερου έτους της ζωής τους. Οι ασθενείς αυτοί απαιτούν τακτικές μεταγγίσεις αίματος.

### 3.4.A-θαλασσαιμία

Η διαφορά της α-Θαλασσαιμίας από τη β-Θαλασσαιμία είναι ότι υπάρχει έλλειψη στο α-μέρος του μορίου της αιμοσφαιρίνης αντί του βήτα. Το αποτέλεσμα είναι πάλι μία αναιμία αλλά συνήθως πιο ήπια από τη β-Θαλασσαιμία. Περιγράφονται 4 μορφές της α-Θαλασσαιμίας ανάλογα με την αλλαγή στο DNA (μετάλλαξη) που την προκαλεί.

1. Η φορεία της  $\alpha^+$ -Θαλασσαιμίας.
2. Η φορεία της  $\alpha^0$ -Θαλασσαιμίας.
3. Η νόσος H, που αποτελεί μια Χρόνια Αναιμία.
4. Ο Εμβρυϊκός Ύδρωπας που είναι η πιο βαριά μορφή της α-Θαλασσαιμίας.

#### 3.4.1. Α-θαλασσαιμία και οικογενειακός προγραμματισμός

Τα γονίδια για την α-θαλασσαιμία είναι διαδεδομένα σε ανθρωπίνους ασιατικής καταγωγής, καθώς επίσης και ατόμων αφρικανικής, μεσανατολικής και μεσογειακής καταγωγής. Τα ζευγάρια που προγραμματίζουν να κάνουν οικογένεια, ήνωρίς στην εγκυμοσύνη, πρέπει να κάνουν μια εξέταση αίματος για να δουν κατά πόσο είναι φορείς ή όχι, εάν η καταγωγή μιας εκ των οικογενειών τους είναι από τις περιοχές που αναφέρονται παραπάνω, ή εάν έχουν οικογενειακό ιστορικό οποιασδήποτε διαταραχής αίματος ή αναιμίας. Αυτή η εξέταση χρειάζεται για να καθοριστεί εάν υπάρχει οποιοςδήποτε κίνδυνος να έχει το παιδί επιπτώσεις από μια γενετική διαταραχή αίματος. Τα άτομα που διατρέχουν κίνδυνο να έχουν επηρεασμένο παιδί έχουν επιλογές. Αυτές οι παθήσεις μπορούν να διαγνωστούν από τη 12η εβδομάδα της εγκυμοσύνης. Εάν κριθεί απαραίτητο, μπορεί μετά να εξεταστεί ο τερματισμός της εγκυμοσύνης. Οι άνθρωποι μπορούν να υιοθετήσουν ή μπορούν να εξετάσουν τις υποβοηθούμενες αναπαραγωγικές τεχνικές (όπως η προεμφυτευτική γενετική διάγνωση, χρήση ωαρίων δωρητών ή σπέρμα δωρητών). Άλλοι ίσως επιλέξουν να διακινδυνεύσουν να έχουν επηρεασμένο παιδί. Όλες αυτές οι επιλογές μπορούν να συζητηθούν με Γενετικό Σύμβουλο. Η εξέταση μπορεί να κανονιστεί από τον οικογενειακό σας γιατρό ή

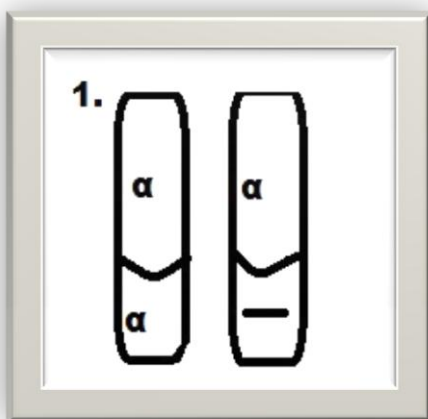
επικοινωνώντας με τα νοσοκομεία που αναφέρονται στο τέλος αυτού του ενημερωτικού φυλλαδίου.

### 3.4.2. Γενετική βάση της α-θαλασσαιμίας

Οι α-θαλασσαιμίες είναι ανωμαλίες κατά τις οποίες η σύνθεση των αλυσίδων α-σφαιρίνης είναι ελαττωμένη ή ανύπαρκτη. Επειδή το γένωμα κάθε ατόμου περιέχει τέσσερα αντίγραφα του γονιδίου κάθε γλοβίνης, υπάρχουν διάφορα επίπεδα έλλειψης των αλυσίδων α-γλοβίνης. Αν ένα από τα τέσσερα γονίδια είναι ελαττωματικό, το άτομο χαρακτηρίζεται ως «σιωπηλός φορέας» της α-θαλασσαιμίας, επειδή δε συμβαίνει καμία σωματική εκδήλωση της νόσου. Αν δύο γονίδια α-γλοβίνης είναι ελαττωματικά, το άτομο θεωρείται ότι φέρει το στίγμα της α-θαλασσαιμίας. Αν τρία είναι ελαττωματικά, το άτομο έχει τη νόσο της αιμοσφαιρίνης H, μια ήπια έως μέσης σοβαρότητας αιμολυτική αναιμία. Αν και τα τέσσερα γονίδια της α-γλοβίνης είναι ελαττωματικά, εμφανίζεται εμβρυϊκός ύδρωψ οπότε το έμβρυο πεθαίνει γιατί οι αλυσίδες της α-γλοβίνης απαιτούνται για τη σύνθεση της HbF.

#### 3.4.2.1. Τρόπος Μεταβίβασης α-γονιδίων

Πιο κάτω περιγράφονται οι τρόποι μεταβίβασης των γονιδίων, με επεξηγήσεις καθώς και στοιχεία που αφορούν την κλινική τους έκβαση:



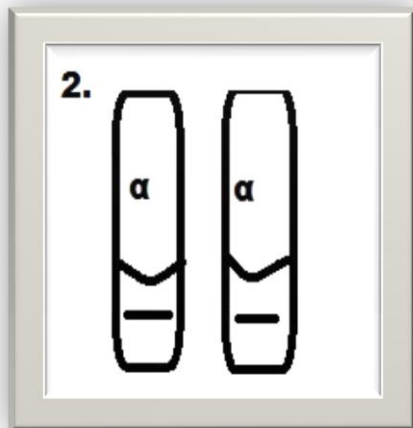
Εικόνα 1 Γραφική αναπαράσταση, γονιδίων α-θαλασσαιμίας, σιωπηλός φορέας της α-θαλασσαιμίας

Το άτομο που έχει μόνο ένα γονίδιο α-Θαλασσαιμίας από τα τέσσερα, ονομάζεται φορέας της 'άλφα-Θαλασσαιμίας' (α+-Θαλασσαιμία). Τα άλλα τρία γονίδια, τα οποία είναι απολύτως φυσιολογικά και λειτουργούν, έχουν τη δυνατότητα να παράγουν σχεδόν φυσιολογική ποσότητα αιμοσφαιρίνης. Το ένα γονίδιο α-Θαλασσαιμίας μπορεί να μειώσει, όμως ελάχιστα ή και καθόλου το μέγεθος των ερυθροκυττάρων. Η διάγνωση

συνεπώς του φορέα αυτού με τη συνήθη μικροσκοπική

εξέταση του αίματος στο εργαστήριο, καθίσταται πολύ δύσκολη, εξού και ο χαρακτηρισμός αυτών των φορέων ως «σιωπηλών». Μόνο εξειδικευμένες εργαστηριακές εξετάσεις, που

βασίζονται στην ανάλυση του γενετικού υλικού, δηλαδή του DNA, μπορούν να θέσουν έγκαιρα και έγκυρα τη διάγνωση.



Εικόνα 2 Γραφική αναπαράσταση γονιδίων α-θαλασσαιμίας, φορέας α-θαλασσαιμίας

Το άτομο που έχει δύο γονίδια α-Θαλασσαιμίας από τα τέσσερα γονίδια του α-μέρους της αιμοσφαιρίνης είτε να απουσιάζουν ή να είναι μη-λειτουργικά, ονομάζεται φορέας της ‘άλφα μηδέν Θαλασσαιμίας’ (α<sup>0</sup>- Θαλασσαιμίας). Τα δύο γονίδια α-Θαλασσαιμίας που απουσιάζουν ή είναι μη-λειτουργικά μπορεί να βρίσκονται στο ίδιο χρωμόσωμα (θέση cis) ή σε διαφορετικά χρωμοσώματα (θέση trans), όπως φαίνεται στην εικόνα.

### 3.4.2.2.Φορείς της α-θαλασσαιμίας

Οι φορείς της α-Θαλασσαιμίας (α<sup>+</sup> και α<sup>0</sup>), όπως και εκείνοι της β-Θαλασσαιμίας, δεν πάσχουν από τη νόσο. Δεν παρουσιάζουν κανένα σωματικό ή ψυχικό σύμπτωμα και δε χρειάζονται ειδική διαίτα, ιατρική παρακολούθηση ή θεραπεία. Τα ερυθροκύτταρα στο αίμα τους μπορεί να είναι και είναι συνήθως μικρότερα (ειδικά στην περίπτωση της α<sup>0</sup>-Θαλασσαιμίας) από εκείνα των μη φορέων, και η ποσότητα της αιμοσφαιρίνης μπορεί να είναι και αυτή μειωμένη. Επιπλέον, όταν τα ερυθροκύτταρα εξετάζονται στο μικροσκόπιο ενδέχεται να είναι πιο ωχρά και να έχουν άνισα μεγέθη (ανισοκυττάρωση) και διάφορα σχήματα (ποικιλοκυττάρωση) συγκριτικά με τα φυσιολογικά ερυθροκύτταρα. Η φορεία δεν μπορεί να εξελιχθεί σε νόσο με την πάροδο του χρόνου. Στην πραγματικότητα, οι περισσότεροι φορείς δε θα μάθουν καν ότι είναι φορείς, εκτός αν υποβληθούν σε ειδική εργαστηριακή εξέταση. Ωστόσο, μερικοί φορείς μπορεί να αναπτύξουν ελαφρά αναιμία, η οποία μπορεί να διαγνωστεί εσφαλμένα ως αναιμία λόγω έλλειψης σιδήρου (σιδηροπενική). Με ειδικές εργαστηριακές εξετάσεις είναι όμως δυνατή η διάκριση ανάμεσα στις δύο καταστάσεις. Συνοψίζοντας, ο φορέας της α-Θαλασσαιμίας δεν έχει καμία σοβαρή επίπτωση στην υγεία, τη διάρκεια ή την ποιότητα ζωής του.

### 3.4.3. Εργαστηριακά Ευρήματα

	<b>α-θαλασσαιμία-2 (σιωπηλόςφορέας)</b>	<b>α-θαλασσαιμία-1 (ελάσσων)</b>	<b>Αιμοσφαιρινοπάθεια Η (ενδιάμεση)</b>
Ερυθροκυτταρικοί δείκτες	Κ.φ./ ↓	↓	↓
Επίχρσιμα Περιφερικού αίμ.	Κ.φ.	Μικροκυττάρωση,υποχρωμία	Ανισοποικιοκυττάρωση Υποχρωμία,στοχοκύτταρα
Ευρήματα από την Γ.Α	Σπάνια Αναιμία	Ήπια Αναιμία ↑ RBC	Αναιμία ΔΕΚ ↑
Ερυθροκύτταρα Έγκλειστα	ΟΧΙ	ΣΥΧΝΑ	ΠΑΝΤΑ

### 3.5.Θεραπευτική αντιμετώπιση

Η αντιμετώπιση των ασθενών με θαλασσαιμία πρέπει να εξατομικεύεται, μια και οι ασθενείς παρουσιάζουν σημαντική κλινική ετερογένεια. η αντιμετώπιση έχει δύο παράλληλους στόχους: την βελτίωση των παθογενετικών μηχανισμών, που θα οδηγήσει και σε πρόληψη μακροχρόνιων προβλημάτων και την αντιμετώπιση των επιπλοκών. Ριζική θεραπεία με σκοπό την ίαση μπορεί να γίνει μόνο μέσω μεταμόσχευσης αρχηγόνων αιμοποιητικών κυττάρων. Δεδομένου όμως της τοξικότητας της επέμβασης, η θεραπεία εαυτή πρέπει να γίνεται μόνο σε ασθενείς με βαριά κλινική εικόνα και επισφαλή πρόγνωση και μόνο με απόλυτασυμβατό συγγενή δότη. μεταμοσχεύσεις από εναλλακτικούς δότες αποτελούν άκρα πειραματικές μέθοδες με αδικαιολόγητα υψηλή τοξικότητα.

### 3.5.1. Αντιμετώπιση της αναιμίας

Η αναιμία αποτελεί το πρωταρχική αιτία της νόσου, η αντιμετώπιση της οδηγεί σε βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών και μπορεί να αποτρέψει τις επιπλοκές της νόσου. Η χρόνια αντιμετώπιση της αναιμίας αποτελεί μια θεραπευτική πρόκληση. Πολλαπλοί παράγοντες πρέπει να λαμβάνονται υπόψη προτού αποφασιστεί ο τρόπος αντιμετώπισης της. Οι παράγοντες αυτοί σχετίζονται με το βαθμό της αναιμίας, την διαχρονική της εξέλιξη, τις επιπλοκές που έχει επιφέρει, καθώς και την ηλικία του ασθενούς και τον τρόπο ζωής του. Ενδελεχή ανάλυση των παραγόντων που επηρεάζουν το βαθμό αναιμίας και υποξίας, όπως το ποσοστό της εμβρυικής αιμοσφαιρίνης, ο ακριβής γονότυπος, η συνύπαρξη πολυμορφισμών που επάγουν την έκφραση των γονιδίων των γ-αλύσεων (κυρίως ο πολυμορφισμός XmnI), οι δείκτες ερυθροποίησης μπορούν να συμβάλλουν σε καλύτερη πρόβλεψη της πορείας του ασθενούς και αντίστοιχη εξατομίκευση της θεραπείας του. Ο βασικός τρόπος αντιμετώπισης της αναιμίας είναι οι μεταγγίσεις συμπυκνωμένων ερυθρών. Πριν ξεκινήσουν οι μεταγγίσεις είναι απαραίτητα να γίνει εκτενής φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των ερυθροκυττάρων, δεδομένου ότι τα ποσοστά αλλοανοσοποίησης στους ασθενείς αυτούς είναι ιδιαίτερα υψηλότερα σε σχέση με ασθενείς με μείζονα μεσογειακή αναιμία. Οι μεταγγίσεις χορηγούνται επί συγκεκριμένων ενδείξεων και πρέπει να γίνονται με φειδώ. Κατά κανόνα, στην θαλασσαιμία μεταγγίσεις απαιτούνται σε απότομη πτώση αιμοσφαιρίνης, όπως κατά τη διάρκεια λοιμώξεων, για χειρουργικές επεμβάσεις και σε εγκυμοσύνη. Τακτικές μεταγγίσεις είναι απαραίτητες για παιδιά με καθυστέρηση ανάπτυξης ή σοβαρές οστικές αλλοιώσεις ή για την αντιμετώπιση επιπλοκών, όπως κλινικά σημαντικές εξωμυελικές εστίες και πνευμονική υπέρταση. Το χρονικό διάστημα των τακτικών μεταγγίσεων ποικίλλει ανάλογα με το υποκείμενο αίτιο. Είναι γεγονός ότι η βελτίωση της θεραπείας αποσιδήρωσης έχει κάνει τις ενδείξεις για μεταγγίσεις λιγότερο αυστηρές.

Ενδεικτικό αυτού είναι ότι για αρκετούς ασθενείς με οριακό φαινότυπο μεταξύ μείζονας και ενδιάμεσης μεσογειακής αναιμίας, υπάρχει η τάση για έναρξη συστηματικών μεταγγίσεων σε αντίθεση με ότι συνέβαινε παλαιότερα. Η τάση αυτή υποστηρίζεται και από νεότερα δεδομένα από εκτενείς μελέτες που δείχνουν ότι ασθενείς με ΕμΑ που έχουν λάβει μεταγγίσεις έχουν λιγότερα προβλήματα από αυτούς που δεν έχουν λάβει.

### 3.6.Επιδημιολογικά στοιχεία



Εικόνα 1 Χάρτης Θαλασσαιμίας

### 3.6.1. Γενικά

Η Θαλασσαιμία επηρεάζει άνδρες και γυναίκες εξίσου και εμφανίζεται σε περίπου 4.4 ανά 10.000 γεννήσεις. Αποτελούν το πιο κοινό μονογονιδιακό νόσημα με 270 εκατομμύρια φορείς παγκοσμίως. Η α-θαλασσαιμία είναι πιο συχνή σε άτομα της Αφρικής και της Νοτιοανατολικής Ασίας, ενώ η β-μεσογειακή αναιμία είναι πιο συχνή σε άτομα της Μεσογείου, της Αφρικής και της Νοτιοανατολικής Ασίας. Περίπου το 5% του παγκόσμιου πληθυσμού έχει μια παραλλαγή σφαιρίνης, αλλά μόνο το 1,7% έχει α-ή β-θαλασσαιμία. Ο επιπολασμός της β-θαλασσαιμίας είναι υψηλότερος σε περιοχές όπου η ελονοσία είναι ή ήταν ενδημική! Παρόμοια με την β-θαλασσαιμία, η α-θαλασσαιμία είναι διαδεδομένη σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές, όπου η ελονοσία ήταν ή εξακολουθεί να είναι ενδημική. Θεωρείται ότι οι μεταφορείς των αιμοσφαιρινοπάθειών έχουν ένα βαθμό προστασίας έναντι της ελονοσίας, αν και ο υποκείμενος μηχανισμός της προστασίας αυτής είναι άγνωστος. Η μετακίνηση των πληθυσμών όμως, καθώς και η εφαρμογή αποτελεσματικών προγραμμάτων πρόληψης έχουν αλλάξει τον επιδημιολογικό χάρτη της γής για τα μεσογειακά σύνδρομα. Μεγάλος αριθμός πολλών paper ασχολούνται με την επιδημιολογική κατάσταση εμφάνισης της θαλασσαιμίας. Πρόσφατα δημοσιεύτηκε σε επιστημονικό περιοδικό το “Informahealthcare” εργασία κατά την οποία γίνεται εκτενή αναφορά στην εμφάνιση β-θαλασσαιμίας στην Κύπρο και τη συσχέτιση της με την Ελονοσία. Ο τίτλος της επιδημιολογικής έρευνας είναι: *The changing epidemiology of β-Thalassemia in the Greek-Cypriot population*. Αντίστοιχα στοιχεία υπάρχουν και για τα άλλα μεγάλα νησιά της Μεσογείου, την Σαρδηνία και την Κρήτη. Η εξάλειψη της Ελονοσίας φαίνεται ότι παρουσιάζεται ως κοινή παράμετρο μείωσης της εμφάνισης της θαλασσαιμίας. Βασισμένοι

στην υπόθεσή του Haldane ότι η ελονοσία μπορεί αποτελεί επιλεκτικό παράγοντα που είναι υπεύθυνος για τη διατήρηση των υψηλών επιπέδων της θαλασσαιμίας σε πολλούς πληθυσμούς σε όλο τον κόσμο, φαίνεται ότι μετά την εξάλειψη της ασθένειας στην Κύπρο το 1948, οι φορείς της β - thal άρχισαν να μειώνονται από γενιά σε γενιά.

### **3.6.2. Επιδημιολογικά χαρακτηριστικά και HCV**

Τα άτομα που πάσχουν από ομόζυγο β μεσογειακή αναιμία και υφίστανται συχνά μεταγίσεις είναι πιο επιρρεπή σε ιογενείς λοιμώξεις όπως στον ιό της ηπατίτιδας Β και C, τον HIV κ.α. η επίπτωση αυτών σχετίζεται, όπως είναι φυσικό, με τον επιπολασμό των λοιμώξεων στη δεξαμενή των αιμοδοτών και εμφανίζει μια αύξουσα τάση με την πάροδο της ηλικίας. Στην ηλικία των 7 ετών περίπου, το HBsAg ανιχνεύεται σε ποσοστό που κυμαίνεται μεταξύ 7-14% και τα αντισώματα έναντι του HCV σε ποσοστό 12.5%. Σε μεγαλύτερες ηλικίες (μέχρι 15 ετών) αναφέρεται συχνότητα ηπατίτιδας Β 20% και C 30%, ενώ σε ενήλικους ασθενείς με μέση ηλικία 26 έτη αντί-HCV ανιχνεύονται σε ποσοστά 35-91%, θετική PCR εμφανίζει το 72%, ενώ το 30% αυτής της ομάδας έχει φυσιολογικές αμινοτρανσφεράσες. Ο συστηματικός εμβολιασμός έναντι της ηπατίτιδας Β έχει περιορίσει σημαντικά τον επιπολασμό της νόσου, ενώ η συλλοίμωξη με τους δύο ιούς δεν είναι ιδιαίτερα συχνή. Ωστόσο υπάρχει αναφορά για συνύπαρξη των δύο λοιμώξεων, σε λιγότερο αναπτυγμένες χώρες, μέχρι και στο 14% του συνόλου των πολυμεταγχιζόμενων.

### **3.7. Αντιοξειδωτικά και συμπληρώματα βιταμινών/Θαλασσαιμία**

Πολλαπλές μελέτες έχουν δείξει διαταραχές στην ισορροπία οξειδωτικών/ αντιοξειδωτικών παραμέτρων που φαίνεται να συμβάλλουν στην παθοφυσιολογία της νόσου προκαλώντας ιστική βλάβη και επάγοντες διεργασίες από τη ανάπτυξη ινώδους ιστού και την υπερπηκτικότητα. Αν και σε θεωρητικό επίπεδο η χρήση αντιοξειδωτικών ουσιών αναμένεται να έχει σημαντικά αποτελέσματα, δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα από κλινικές μελέτες που να το επιβεβαιώνουν. οι μελέτες αυτές έχουν χρησιμοποιήσει αντιοξειδωτικές ουσίες όπως βιταμίνη E, N-acetylcysteine και πολλές άλλες ουσίες φυτικής προέλευσης ή ουσίες που βοηθούν στο μεταβολισμό των λιπιδίων (π.χ. καρνιτίνη). οι μελέτες αυτές έχουν κατά κανόνα μικρό αριθμό ασθενών, την μη ύπαρξη ομάδας έλεγχου με placebo, την αδυναμία καθορισμού αντικειμενικών δεικτών μέτρησης της αποτελεσματικότητας και συχνά την

αδυναμία χορήγησης δόσεων αρκετά υψηλών που να προκαλούν θετικό αποτέλεσμα. Ως εκ τούτου, δεν είναι επαρκή τα στοιχεία για να γίνουν γενικευμένες συστάσεις.

Σε αντίθεση, σε ασθενείς με επιβεβαιωμένη έλλειψη βιταμινών ή ιχνοστοιχείων είναι επιβεβλημένη η χορήγηση των αντίστοιχων συμπληρωμάτων. Ενδεικτικά αναφέρεται η συχνή ανάγκη χορήγησης ψευδαργύρου ή βιταμίνης D. καθημερινή χορήγηση τουλάχιστον 1 mg φυλλικού οξέος είναι συνηθισμένη πρακτική για τους ασθενείς αυτούς με σκοπό την κάλυψη των αναγκών που προκαλούνται από τον έντονη ερυθροποιητική δράση.

### 3.8. Συμπεράσματα για τις μεταλλάξεις και τα είδη της θαλασσαιμίας

Ο χαρακτηρισμός περισσότερων από 200 μεταλλάξεων που προκαλούν β-MA και των περίπου 100 που προκαλούν α-MA έχει συμβάλει σε μεγάλο βαθμό στην κατανόηση της μοριακής βάσης των μεσογειακών συνδρόμων που λειτούργησαν ως πρότυπο στη μελέτη άλλων νοσημάτων αλλά κυρίως αποτέλεσαν τη βάση για την εφαρμογή προγραμμάτων πρόληψης για την εξάλειψη ενός γενετικού νοσήματος. Παρ' όλα αυτά, τα μεσογειακά σύνδρομα παραμένουν ακόμα και σήμερα ως πρόβλημα για την υγεία σε ολόκληρο τον κόσμο. η τεράστια κλινική ποικιλομορφία τους (κυρίως των συνδρόμων της β-MA) σε συνδυασμό με την αλληλεπίδρασή τους με άλλους γενετικούς τροποποιητικούς παράγοντες καθώς και το περιβάλλον, καθιστούν την πρόληψη των συνδρόμων αυτών δύσκολη υπόθεση. η περαιτέρω κατανόηση της μοριακής βάσης των μεσογειακών συνδρόμων και των παραγόντων που τα επηρεάζουν θα επιτρέψει καλύτερα την πρόληψη, την πρόγνωση της βαρύτητας των ασθενών αλλά και τον εκσυγχρονισμό των θεραπευτικών πρωτοκόλλων που εφαρμόζονται σήμερα.

Σύμφωνα με τον αριθμό των α γονιδίων των οποίων έχει επηρεαστεί η λειτουργικότητα, έχουν χαρακτηριστεί **τέσσερις βασικοί διαφορετικοί αιματολογικοί και κλινικοί φαινότυποι:**

α) Φορείς που παρουσιάζουν από καθόλου έως ελάχιστες διαταραχές στα ερυθροκύτταρά τους. Αυτοί έχουν ένα επηρεασμένο α γονίδιο είτε λόγω ελλείμματος είτε λόγω μιας σημειακής μετάλλαξης που προκαλεί  $\alpha^+$  MA (τύπος α MA 2).

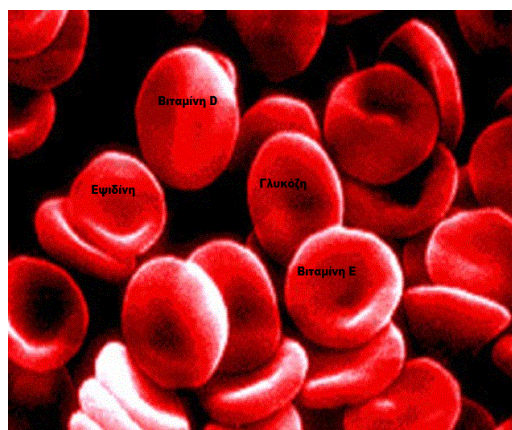
β) Φορείς με αιματολογικά ευρήματα, κυρίως μικροκυτταρικά και υπόχρωμα ερυθροκύτταρα και φυσιολογικά ή σχεδόν φυσιολογικά επίπεδα αιμοσφαιρίνης. Αυτοί είτε φέρουν μεταλλάξεις που προκαλούν  $\alpha^0$  MA (τύπος α MA 1), είτε είναι ομοζυγώτες για ελλείμματα που προκαλούν  $\alpha^+$  MA.



γ) Ασθενείς με μια ενδιάμεσης βαρύτητας κλινική συμπτωματολογία και αιματολογική εικόνα γνωστή ως αιμοσφαιρινοπάθεια η (Hb H). η αιμοσφαιρινοπάθεια η είναι η σοβαρότερη, συμβατή με τη ζωή, μορφή α μΑ, αν και είναι κλινικά είναι μικρότερης βαρύτητας από τους περισσότερους τύπους β μΑ. Προκαλείται όταν μεταλλάξεις α μΑ συγκληρονομηθούν, με αποτέλεσμα τη μείωση της σύνθεση των α αλυσίδων σε επίπεδο σχεδόν ισοδύναμο με αυτό που αντιστοιχεί σε ένα λειτουργικό α γονίδιο.

δ) Εμβρυϊκός υδρωπας που οφείλεται συνήθως στην συγκληρονόμηση δύο μεταλλάξεων α0 μΑ και επομένως στην ολοκληρωτική απουσία της παραγωγής της α αλυσίδας αιμοσφαιρίνης<sup>8,21</sup>. Έχουν αναφερθεί κάποιες σπάνιες μορφές εμβρυϊκού υδρωπα λόγω ομόζυγης κατάστασης μιας υπερασταθούς α αλυσίδας αιμοσφαιρίνης ή συνύπαρξη υπερασταθούς αλυσίδας με έλλειμμα α<sup>0</sup>μΑ<sup>11,12</sup>. το εμβρυϊκό αίμα αποτελείται κυρίως από την Hb Bart's (γ4), η οποία λειτουργικά είναι ανίκανη να μεταφέρει οξυγόνο, και μικρές ποσότητες από Hb Portland I και Portland II (ζ2γ2, ζ2β2), οι οποίες υποστηρίζουν την επιβίωση του εμβρύου στο τελευταίο στάδιο της εγκυμοσύνης. Βαριά αναιμία του εμβρύου οδηγεί σε ασφυξία, εμβρυϊκό υδρωπα, και θάνατο αμέσως μετά τη γέννηση ή στο νεογνό. η προγεννητική διάγνωση μπορεί να εντοπίσει και κατά συνέπεια να αποτρέψει τις σοβαρές επιπλοκές που δημιουργούνται συχνά στις εγκυμοσύνες ενός υδρωπικού εμβρύου.

#### ΚΕΦ. 4<sup>ο</sup>: ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΚΑΙ ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΑ



Εικόνα 1: Οι τιμές των αναλύσεων του αίματος και των ούρων επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες όπως, την διατροφή, τα φάρμακα και τις ασθένειες.

Όταν μιλάμε για βιοχημικούς δείκτες, αναφερόμαστε σε μόρια, όπως ορμόνες, ένζυμα, αντισώματα, πρωτεΐνες, μέταλλα, ιχνοστοιχεία ή οποιαδήποτε άλλη ουσία που ανιχνεύεται στο αίμα, τα ούρα ή άλλα υγρά και ιστούς του οργανισμού και αποτελούν ενδείξεις καλής ή διαταραγμένης λειτουργίας του οργανισμού. Τα δεδομένα της σύγχρονης επιδημιολογίας τονίζουν το ρόλο της διατροφής και του τρόπου ζωής, στον κίνδυνο

εμφάνισης διάφορων χρόνιων νοσημάτων. Η εκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης είναι εξαιρετικά δύσκολη, αν σκεφτούμε τον μεγάλο αριθμό των πηγών, από όπου μπορεί κάποιος

να πάρει την τροφή του, αλλά και τη διαφορετική περιεκτικότητα των ίδιων τροφίμων σε θρεπτικά συστατικά. Επομένως, οι βιοχημικοί δείκτες χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο για την εκτίμηση της διατροφικής κατάστασης του οργανισμού. Οι διατροφικοί βιοχημικοί δείκτες ερμηνεύονται ως την βιολογική επέκταση της διατροφικής πρόσληψης και των διάφορων διατροφικών προτύπων. Το διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο του κάθε οργανισμού και ο διαφορετικός τρόπος με τον οποίο μπορεί να μεταβολίζει κάθε συστατικό, διαφοροποιεί την ερμηνευτική ικανότητα του κάθε δείκτη, όμως η χρήση των βιοχημικών δεικτών, εάν γίνει σωστά μπορεί να προσφέρει πολύτιμες πληροφορίες για την κατάσταση του οργανισμού.

Η πλειοψηφία των δεικτών που αξιολογούν τη διατροφική κατάσταση καλούνται «δείκτες συγκέντρωσης», δηλαδή δείκτες που αντιπροσωπεύουν την ποσότητα στην οποία ανιχνεύονται διάφορες ουσίες στον οργανισμό. Οι χρήσεις των βιοχημικών δεικτών περιλαμβάνουν την αξιολόγηση των μεθόδων διατροφικής εκτίμησης, όπως το ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων ή την 24ωρη ανάκληση, αλλά κυρίως την αξιολόγηση των επιπέδων της διατροφικής πρόσληψης διάφορων συστατικών, του κινδύνου εμφάνισης νοσημάτων που σχετίζονται με τη διατροφή, όπως η υπερλιπιδαιμία ή ο σακχαρώδης διαβήτης ή του τρόπου με τον οποίο μεταβολίζεται κάποιο συστατικό.

#### 4.1.Γλυκόζη



Εικόνα 2: Απεικονίσεις του εγκεφάλου δείχνουν πως όταν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα ελαττώνονται, μία περιοχή του εγκεφάλου που είναι γνωστό ότι ρυθμίζει τα συναισθήματα και τις παρορμήσεις χάνει την ικανότητά του να περιορίσει την επιθυμία για τρόφιμα υψηλής θερμιδικής αξίας.

Η γλυκόζη σχηματίζεται από τους καταναλισκόμενους υδατάνθρακες και τη μετατροπή του γλυκογόνου σε γλυκόζη στο ήπαρ. Αυξημένα επίπεδα νηστείας ενδεικτικά ΣΔ, επιβεβαιώνεται με δοκιμασία ανοχής γλυκόζης. Υπάρχουν διαταραχές στον μεταβολισμό της γλυκόζης που σχετίζονται με την ομόζυγη β-θαλασσαιμία. Η συχνότητα του σακχαρώδους διαβήτη μεταξύ των θαλασσαιμικών ασθενών κυμαίνεται από 4.93 έως 22.64%. Η

ετερογένεια αυτή οφείλεται στις ιδιαιτερότητες του πληθυσμού κάθε μελέτης. Αυτές αφορούν στη χώρα και στην κλινική νοσηλεία στη διαφορετική θεραπευτική προσέγγιση, στις διαφορετικές ηλικιακές ομάδες των ασθενών, στις διαφορές στον τρόπο ζωής, αλλά και στις

κλινικές ιδιαιτερότητες των ποικίλων μορφών της νόσου (π.χ.μικρότερη επίπτωση στην ενδιάμεση μορφή). Συνήθως όμως, ο Σακχαρώδης Διαβήτης (ΣΔ) παρουσιάζεται στο 7-10% και εγκαθίσταται κυρίως από τη 2η δεκαετία της ζωής και έπειτα. Η Διαταραγμένη Ανοχή στη γλυκόζη (IGT) εμφανίζεται στο 26-29% των ασθενών, ενώ η υπεργλυκαιμία νηστείας (IFG) είναι επίσης συχνή.

#### **4.1.1. Αιτιοπαθογένεια**

Στην αιτιοπαθογένεια του ΣΔ στην ομόζυγο β-θαλασσαιμία, πρωτεύοντα ρόλο κατέχει η βαρύτητα και η διάρκεια της αιμοσιδήρωσης. Η τοξική επίδραση του σιδήρου στο πάγκρεας οδηγεί σε σταδιακή καταστροφή των ινσουλινοπαραγωγών β-κυττάρων και κατά συνέπεια σε ινσουλινοπενία, η οποία εμφανίζεται κυρίως σε προχωρημένη βλάβη του αδένου. Αντίθετα, στα αρχικά στάδια, παρατηρείται αυξημένη παραγωγή και έκκριση ινσουλίνης, που έχει ως στόχο την αντιρρόπηση των υψηλών τιμών γλυκόζης. Η αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης είναι ηπιότερη από ότι στα άτομα χωρίς ομόζυγο β-Θαλασσαιμία και εμφανίζεται συνηθέστερα κατά την εφηβεία. Παραμένει μάλιστα συγκριτικά χαμηλότερη και κατά την ενήλικη ζωή. Επιπλέον, η τοξική δράση του σιδήρου στο ήπαρ, η ηπατική ίνωση και η υψηλή επίπτωση ηπατίτιδας-C των ασθενών, προκαλούν ηπατική δυσλειτουργία, ελαττωμένη ηπατική αποδόμηση ινσουλίνης και περαιτέρω επίταση της υπερινσουλιναμίας και της ινσουλινοαντίστασης. Σε ένα δεύτερο επίπεδο, η βαριά αιμοσιδήρωση των μυών διαταράσσει την πρόσληψη και χρησιμοποίηση της γλυκόζης από αυτούς. Άλλοι παράγοντες που σχετίζονται αιτιολογικά ή προδιαθέτουν στην ανάπτυξη ΣΔ στη θαλασσαιμία, είναι η τοξικότητα των χημικών παραγόντων αποσιδήρωσης, η γενετική προδιάθεση, η καθιστική ζωή, το stress, η κακή διατροφή, ιογενείς λοιμώξεις, καθώς και η εκάστοτε συννοσηρότητα. Τέλος, ορισμένα βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν την παρουσία και αυτοάνοσου μηχανισμού, που συμμετέχει στην παθογένεια του ΣΔ στους πάσχοντες.

#### **4.1.2. Διαγνωστικά Κριτήρια**

Η διάγνωση των διαταραχών του μεταβολισμού της γλυκόζης τίθεται με τα διαγνωστικά κριτήρια του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (W.H.O, 1999) και της Αμερικανικής Διαβητολογικής Εταιρίας. Στα πλαίσια του τακτικού ελέγχου, απαιτείται συχνός προσδιορισμός των επιπέδων γλυκόζης νηστείας, ινσουλίνης και c-πεπτιδίου, προκειμένου να

εκτιμηθούν σωστά τόσο η κατάσταση γλυκαιμίας, όσο και η αντίσταση στην ινσουλίνη. Επιπλέον, συνιστάται να διενεργείται από του στόματος δοκιμασία ανοχής στη γλυκόζη σε όλους τους μη διαβητικούς ασθενείς άνω των 10 ετών, σε ετήσια βάση. Σε ηλικίες κάτω των 10 ετών, η ετήσια O.G.T.T. λαμβάνει χώρα μόνο εάν διαπιστωθεί σε τυχαίο έλεγχο γλυκόζη νηστείας μεγαλύτερη από 100 mg/dl. Επιπλέον, για τους ασθενείς με ήδη εγκατεστημένο ΣΔ, απαιτείται έλεγχος με Φρουκτοζαμίνη (Fructosamine test) τουλάχιστον ανά 3 μήνες, προκειμένου να εκτιμηθεί η επάρκεια της εκάστοτε αγωγής στη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης, κατά το διάστημα των τελευταίων 45 ημερών πριν την εξέταση. Η συγκεκριμένη δοκιμασία αντιστοιχεί σε αυτήν της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (HbA1c) και προτιμάται έναντι αυτής στους θαλασσαιμικούς ασθενείς, διότι η HbA1c λόγω της παθοφυσιολογίας της αιμοσφαιρινοπάθειας και των συχνών μεταγίσεων, υποεκτιμά το πραγματικό μέσο επίπεδο γλυκαιμίας.

#### **4.2.Επιδίνη**

Η επιδίνη είναι πρωτεΐνη που παράγεται από το ήπαρ. Η έκφρασή της ρυθμίζεται από τα επίπεδα Fe. Είναι αυξημένη στην αναιμία χρόνιων νόσων και μπορεί να εμπλέκεται σε δευτερογενείς διαταραχές αύξησης της συγκέντρωσης Fe όπως θαλασσαιμίας. Στις συγγενείς (κληρονομικές) αναιμίες με υπερφόρτωση σιδήρου, όπως η μείζονα β-θαλασσαιμία, η μη αποδοτική ερυθροποίηση απορυθμίζει την ομοιοστασία του σιδήρου, παρεμποδίζοντας τη σύνθεση της επιδίνης στο ήπαρ. Η σχέση επιδίνης /φεριτίνης, έχει επίσης βρεθεί να είναι χαμηλή στους παραπάνω πάσχοντες, και ανάλογη με τα επίπεδα υπερφόρτωσης του σιδήρου. Η μέτρηση των επιπέδων της επιδίνης στα βιολογικά υγρά είναι ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο στη διάγνωση και την αντιμετώπιση των διαταραχών, κατά τις οποίες επηρεάζεται ο μεταβολισμός του σιδήρου.

#### **4.3.Βιταμίνη D / Χοληκαλσιφερόλη**

Η βιταμίνη D περιλαμβάνει μία σειρά χημικών ενώσεων και έχει ταξινομηθεί τόσο στις λιποδιαλυτές βιταμίνες, όσο και στις ορμόνες. Η φυσιολογικά ενεργή μορφή της είναι η



καλσιτριόλη, η οποία συνιστά την ορμόνη αυτής της βιταμίνης. Η υπεριώδης ακτινοβολία του ηλιακού φωτός μετατρέπει μία ένωση που υπάρχει στο δέρμα σε χοληκαλσιφερόλη (βιταμίνη D3), μία προορμόνη, η οποία απελευθερώνεται στο αίμα και τελικά μετατρέπεται στο ήπαρ και τα νεφρά στην ενεργή ορμόνη, την καλσιτριόλη. Δρα ως ορμόνη, αυξάνοντας την εντερική απορρόφηση ασβεστίου, καθώς επίσης προάγει τον σχηματισμό των οστών και των δοντιών. Συμπτώματα υπερβολικής κατανάλωσης είναι η ανορεξία, η ναυτία, η ευερεθιστότητα, καθώς και η αρθραλγία. Η συνιστώμενη ποσότητα δίνεται σε μικρογραμμάρια χοληκαλσιφερόλης και είναι 5 μg για νέους άντρες και γυναίκες. Πιο υψηλή για ηλικιωμένους: 10 μg για ηλικίες 51-70 και 15 για μεγαλύτερες ηλικίες. Τρόφιμα εμπλουτισμένα σε βιταμίνη D, είναι τα γαλακτοκομικά προϊόντα, η μαργαρίνη, καθώς και τα ιχθυέλαια. Επίσης ο ήλιος είναι πηγή της βιταμίνης D.

Σε πρόσφατη έρευνα που έγινε, με στόχο την εκτίμηση του επιπολασμού της μη κανονικής ομοιόστασης του ασβεστίου, δόθηκε μεγάλη δόση βιταμίνης D3 σε 40 έφηβους με μείζων θαλασσαιμία, όπου διαπιστώθηκε η απόλυτη ανεπάρκεια της βιταμίνης D στο σύνολο αυτών μετά την πάροδο 3 μηνών από την έγχυση της. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιελάμβανε μια ομάδα από 40 υγιή άτομα τα οποία αποτέλεσαν την ομάδα control και στα οποία δόθηκε εξίσου ενδοφλεβίως μεγάλη ποσότητα βιταμίνης D3. Διαχωρίστηκαν αρχικά ως προς την έλλειψη βιταμίνης D που είχαν αρχικά πριν την έγχυση της δόσης και βρέθηκαν 38 θαλασσαιμικοί με μεγάλη έλλειψη της και 26 από την ομάδα control με μεγάλη έλλειψη της εξίσου. Στην συνέχεια προχώρησε η διαδικασία με την έγχυση της Βιταμίνης και συνεχή παρακολούθηση και των 80 εφήβων επί 6 μήνες. Τα αποτελέσματα όπως ήδη ανέφερα ήταν ιδιαίτερα ενδιαφέρον, παρατηρήθηκε 100% έλλειψη της βιταμίνης στους θαλασσαιμικούς μετά από πάροδο 6 μηνών, σαν να μην έγινε ποτέ η έγχυσή της ενδοφλεβίως.

## **ΚΕΦ. 5<sup>ο</sup>: ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΚΑΙ ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΑ**

### **5.1. Διαβήτης και σίδηρος - Fe :**

Η συνεχής συσσώρευση του σιδήρου (Fe) στον οργανισμό παραμένει ένα σημαντικό πρόβλημα στη Θαλασσαιμία. Ακόμα και σε χώρες όπου εφαρμόζονται, σύμφωνα με τα ισχύοντα πρωτόκολλα, εντατικά σχήματα αποσιδήρωσης. Ήδη από την παιδική ηλικία, ο σίδηρος αρχίζει να συσσωρεύεται σε όργανα όπως το ήπαρ αλλά και το πάγκρεας. Το ήπαρ θεωρείται το κύριο όργανο – στόχος στη δράση της ινσουλίνης. Η συσσώρευση του σιδήρου στο ήπαρ και η διαταραχή της φυσιολογικής δομής του οργάνου, θα προκαλέσει στην πορεία, συνεχώς αυξημένη αντίσταση στην ινσουλίνη, δυσκολία δηλαδή της ινσουλίνης που φυσιολογικά παράγεται στα β- κύτταρα του παγκρέατος, να συνδεθεί με το υποδοχέα της στη κυτταρική μεμβράνη και να δημιουργήσει έτσι, δύο βασικές λειτουργίες: την είσοδο της γλυκόζης στο ηπατικό κύτταρο αλλά και την αναστολή της παραγωγής γλυκόζης από αυτό.

Αν δεχτούμε τη σχέση που υπάρχει ανάμεσα στο T2\* του ήπατος και στο συνολικό σωματικό σίδηρο, είναι ξεκάθαρο πως η αντίσταση στην ινσουλίνη εξαρτάται από το σωματικό σίδηρο γενικά. Επιπλέον, η αυξημένη συσσώρευση σιδήρου στο πάγκρεας σε συνδυασμό με το χρόνια οξειδωτικό stress θα προκαλέσει ‘απώλεια’ παραγωγής και έκκρισης της ινσουλίνης.

### **5.2.HCV και Διαβήτης:**

Η σχέση της χρόνιας HCV λοίμωξης και του διαβήτη είναι τόσο στενή, ώστε να θεωρείται ως «μεταβολική διαταραχή». Έχει αποδειχτεί πως αντίσταση στην ινσουλίνη θα εμφανίσει το 32%-35% των ασθενών με χρόνια HCV, ενώ διαβήτη θα παρουσιάσουν έως και το 50% των ασθενών με HCV που βρίσκονται σε κερρωτικό στάδιο. Από την άλλη είναι γνωστή η σχέση της θαλασσαιμίας με τη HCV λοίμωξη: το ποσοστό αυτής κυμαίνεται από 16% έως και 80%, ανάλογα το Κέντρο. Φαίνεται πως η HCV παρεμβαίνει άμεσα (μέσω μιας ή περισσότερων πρωτεϊνών της) είτε και έμμεσα (αυξομειώνοντας την παραγωγή ειδικών κυτοκινών όπως της TNFα) στη διαταραχή του μεταβολισμού των υδατανθράκων και στο ΣΔ.

## **ΚΕΦ.6<sup>0</sup>:ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ**

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species) [ROS] ταξινομούνται στις εξής κατηγορίες:1. Ελεύθερες ρίζες, όπως η ρίζα υδροξυλίου,2. Ιόντα, όπως το υποχλωριώδες

ανιόν ( $\text{ClO}^-$ ), 3. Συνδυασμούς ελευθέρων ριζών και ιόντων, όπως το ανιόν σουπεροξειδίου, 4. Μόρια, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Αρχικά πρέπει να κατανοήσουμε την σημασία των ανιόντων και των κατιόντων για τον άνθρωπο, τον τρόπο δημιουργίας των ελευθέρων ριζών και τον ρόλο που παίζουν στην ύπαρξη του οξειδωτικού στρες.

### 6.1.Ανιόντα και Κατιόντα



Τα Ανιόντα/ιόντα είναι τα αρνητικά ηλεκτρικά φορτισμένα σωματίδια που υπάρχουν στον αέρα που αναπνέουμε. Εκτός από τα ανιόντα/ιόντα, υπάρχουν και τα θετικά ηλεκτρικά φορτισμένα σωματίδια, που ονομάζονται κατιόντα, αλλά και τα ουδέτερα. Τα ανιόντα λοιπόν, είναι αρνητικά ηλεκτρικά φορτισμένα μόρια, που αποτελούνται και από οξυγόνο. Τα κατιόντα, λόγω της ατμοσφαιρικής ρύπανσης στα μεγάλα αστικά κέντρα, χάνουν τα ηλεκτρόνια τους.

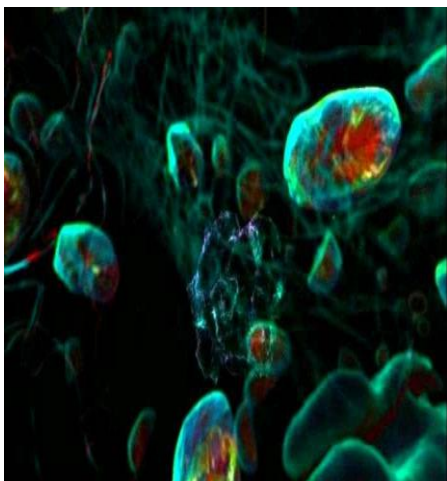
Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να μαγνητίζουν, να δημιουργούν και να αναπαράγουν μικρόβια, ιούς, βακτήρια, σκόνη και γενικά ότι είναι επιβλαβές και μετατρέπεται σε ασθένεια για τον ανθρώπινο οργανισμό. Ο σημερινός τρόπος ζωής μας, δυστυχώς δημιουργεί πολλές περισσότερες πηγές θετικών ιόντων (κατιόντων), από ότι αρνητικών ιόντων (ανιόντων). Όλες οι «σύγχρονες» τεχνολογικά συσκευές παράγουν κατιόντα. Ηλεκτρικές συσκευές, κινητά τηλέφωνα, εξατμίσεις αυτοκινήτων και πολλές άλλες, είναι οι αιτίες της πλεονάζουσας ποσότητας κατιόντων στην ατμόσφαιρα. Η υγεία μας λοιπόν, εξαρτάται άμεσα από την περιεκτικότητα των ανιόντων στον αέρα.

Τα ανιόντα εξουδετερώνουν τη σκόνη, τους ιούς οι οποίοι αποτελούνται και από θετικά ιόντα, τα μικρόβια, αποτρέποντας έτσι τις αρνητικές τους συνέπειες για τον ανθρώπινο οργανισμό. Όσο πιο πολλά ανιόντα υπάρχουν στον αέρα, τόσο λιγότερα είναι τα μικρόβια. Όταν η συγκέντρωση των ανιόντων φτάνει σε συγκεκριμένο επίπεδο, η περιεκτικότητα των μικροβίων φτάνει στο μηδέν. Αν η περιεκτικότητα των ανιόντων μέσα σε έναν χώρο αυξηθεί έως 1500 ανιόντα ανά 1 κυβικό cm του αέρος, αισθανόμαστε αμέσως καλύτερα, λειτουργούμε και εργαζόμαστε με διπλάσια ενέργεια αυξάνοντας την παραγωγικότητα μας.

Μελέτες έχουν δείξει πως, υπό ορισμένες συνθήκες του περιβάλλοντος πχ. σε ορεινές περιοχές, οι άνθρωποι μπορούν να μην πάσχουν ποτέ στη ζωή τους από παθήσεις των

εσωτερικών οργάνων. Συνήθως αυτοί οι άνθρωποι ζουν πολλά χρόνια και παραμένουν υγιείς καθ' όλη τους τη ζωή και αυτό είναι αποτέλεσμα της περιεκτικότητας του μεγάλου αριθμού των ανιόντων στον αέρα που αναπνέουν. Τα αρνητικά ιόντα (ανιόντα) δημιουργούνται στη φύση μέσω φυσικών φαινομένων, όπως οι βροχοπτώσεις, οι καταιγίδες, ο άνεμος κλπ. Πολλά ανιόντα θα συναντήσουμε κοντά σε ρυάκια – μέχρι και 3.000 ανά κυβικό εκατοστό, δίπλα στη θάλασσα όπου φτάνουν τα 4.000, στον φρέσκο αέρα που υπάρχει στην κορυφή ενός βουνού όπου υπάρχουν μέχρι και 8.000, δίπλα σε έναν μεγάλο καταρράκτη που μπορεί να φτάσουν και τα 50.000 ανά κυβικό εκατοστό. Αντίστοιχα ο αριθμός των ανιόντων στα αστικά κέντρα είναι: στο κέντρο της πόλης 100 ανά κυβικό εκατοστό, σε ένα κλειστό χώρο μέχρι και 20, ενώ μέσα στο αυτοκίνητο υπάρχουν μόνο 14 ανιόντα ανά κυβικό εκατοστό.

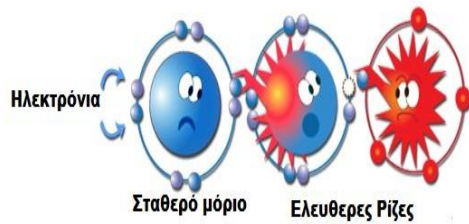
## 6.2.Ελεύθερες Ρίζες



Τα μόρια τα οποία έχουν στο μοριακό τροχιακό τους ασύζευκτο ηλεκτρόνιο, υψηλά ενεργό καλούνται ελεύθερες ρίζες. Οι ελεύθερες ρίζες απελευθερώνονται φυσιολογικά στον ανθρώπινο οργανισμό από τα μιτοχόνδρια τα οποία αποτελούν για τα κύτταρα το εργοστάσιο παραγωγής ενέργειας ως προϊόν του φυσιολογικού μεταβολισμού.

Στα κυτταρικά αυτά οργανίδια λαμβάνει χώρα η οξείδωση των τροφών (η μετατροπή δηλαδή της τροφής σε ενέργεια). Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου παράγονται λοιπόν ως υποπροϊόντα, κατά την διάρκεια παραγωγής ενέργειας με την χρησιμοποίηση οξυγόνου. Για να εξισορροπήσουν την δομή τους, αποσπών ηλεκτρόνια από γειτονικά μόρια, μετατρέποντας τα μόρια αυτά σε ελεύθερες ρίζες, με αποτέλεσμα να ξεκινούν μια καταστρεπτικά ενεργή αλυσίδα και να προκαλούν έτσι βλάβη σε μεγάλης σημασίας κυτταρικές δομές (πρωτεΐνες, κυτταρική μεμβράνη, DNA).



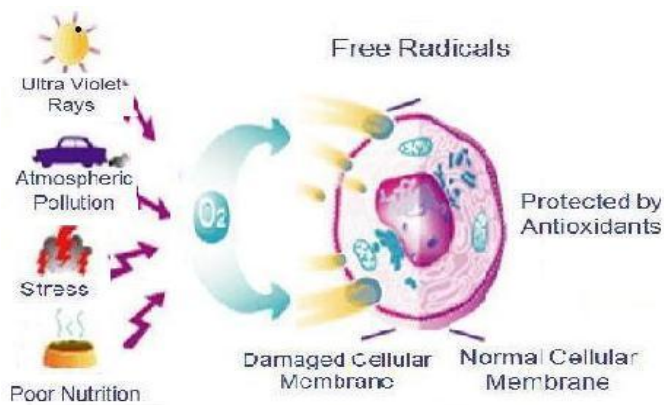


Εικόνα 3 Τρόπος Δημιουργίας της Ελευθερης Ρίζας

Πιο συγκεκριμένα, μια ρίζα είναι πολύ δραστική χημικά, διότι το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο της εξώτατης στοιβάδας έχει την τάση να συζευχθεί με ένα άλλο ηλεκτρόνιο και με αυτό τον τρόπο να σταθεροποιηθεί. Μια ρίζα A αντιδρά προσλαμβάνοντας ένα  $e^-$  από ένα άλλο μόριο B σε μια δεύτερη ρίζα :  $A+B \rightarrow A +B$  Στην συνέχεια, μπορεί η δεύτερη ρίζα B να αντιδράσει με ένα άλλο μόριο C προς εξουδετέρωση της ίδιας και αναγέννηση τρίτης ρίζας C :  $B + C \rightarrow B + C$ . Αν η τρίτη ρίζα C αντιδράσει με το μόριο A προς παραγωγή της αρχικής ρίζας A τότε ξεκινάει μια αλυσιδωτή αντίδραση ελευθέρων ριζών η οποία συνεχίζεται μέχρις ότου λάβει χώρα μια τερματική αντίδραση. Αν δεν συμβεί αυτό, η αλυσιδωτή αντίδραση των ριζών μπορεί να βλάψει βιολογικά συστήματα. Η τερματική αντίδραση συμβαίνει όταν 2 ρίζες αντιδρούν μεταξύ τους προς παραγωγή εξουδετερωμένων μορφών:  $R+ R=RR$ , όπου R αντιπροσωπεύει A,B,C.

#### Πότε αυξάνεται η παραγωγή ελευθέρων ριζών;

Η πλειονότητα των ελευθέρων ριζών παράγεται από τον ίδιο τον οργανισμό μας, όταν: **1)** υπάρχει αυξημένη ανάγκη για αποτοξίνωση (π.χ. υπερβολική έκθεση του οργανισμού σε τοξικές ουσίες) και **2)** αυξημένη παραγωγή ενέργειας (υπερβολική κατανάλωση θερμίδων και ιδιαίτερα λίπους και «κενών» θερμίδων). **3)** Επίσης όταν υπάρχει παρατεταμένη ανοσολογική απάντηση και αυξημένη παραγωγή στεροειδών (π.χ. σε καταστάσεις στρες – όπως η έντονη φυσική δραστηριότητα -, εφηβεία, διαταραχές εμμήνου ρύσεως κ.α.). **4)** Μετά από έκθεση οργανισμού σε συντηρητικά τροφίμων, και μολυσματικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες (π.χ. καπνός τσιγάρου, ρύποι που μολύνουν την ατμόσφαιρα). **5)** Κατά την έκθεση σε ακτινοβολία (π.χ. υπεριώδης ακτινοβολία UV). **6)** Κατά την αυτοοξείδωση διαφόρων χημικών ουσιών και βιομορίων (π.χ. πολυακόρεστα λιπαρά οξέα). **7)** Κατά την λιπιδική υπεροξείδωση (δηλαδή την επίδραση ελευθέρων ριζών επί των λιπιδίων που υπάρχουν στις μεμβράνες των κυττάρων, και ιδιαίτερα των πολυακόρεστων, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό υπεροξειδίων). **8)** Σε αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ.



Εικόνα 4 Παράγοντες δημιουργίας Οξειδωτικού Στρες

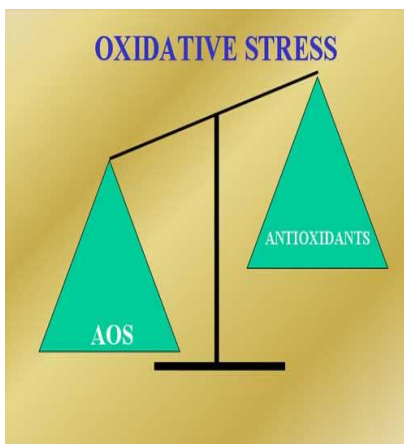
Οι ελεύθερες ρίζες, δεν δρουν ανεξέλεγκτα. Ο οργανισμός μας είναι εφοδιασμένος με αντιοξειδωτικά συστήματα από την φύση του για να αμύνεται στην δράση των ελευθέρων ριζών και ενεργών παραγώγων οξυγόνου: Αυτά είναι τα ένζυμα (Υπεροξειδική δισμουτάση – SOD, Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, Καταλάση), τα διαιτητικά αντιοξειδωτικά ( Βιταμίνη C, Σελήνιο, Βιταμίνη E, Καροτενοειδή).

Σήμερα πιστεύεται ότι αντιδράσεις ελεύθερων ριζών λαμβάνουν χώρα σε μια σειρά από παθοφυσιολογικές καταστάσεις όπως στην επανοξυγόνωση μετά από μια περίοδο ισχαιμίας, στην δημιουργία αθηρωματώδους πλάκας, στις πνευμονικές παθήσεις οι οποίες προκαλούνται από το μολυσμένο περιβάλλον. Οι οργανισμοί είναι συνεχώς εκτεθειμένοι στην τοξική δράση αυτών των ενώσεων και για το λόγο αυτό έχουν αναπτύξει μηχανισμούς ενζυμικούς και μη, ακριβώς για την αντιμετώπιση των ελεύθερων ριζών αλλά και άλλων ισχυρών οξειδωτικών παραγόντων οι οποίοι μπορούν να προκαλέσουν τη δημιουργία ελεύθερων ριζών. Η λειτουργία των οργανισμών αυτών, ονομάζεται αντιοξειδωτική ικανότητα. Σε περιπτώσεις διαταραχής της ισορροπίας μεταξύ των προοξειδωτικών μηχανισμών από την μια πλευρά και από την άλλη, εις βάρος του δεύτερου σκέλους, προκαλείται το φαινόμενο του Οξειδωτικού στρες.

### 6.3.Οξειδωτικό Στρες

Σε περίπτωση που η παραγωγή ελεύθερων ριζών υπερβεί την προστατευτική ικανότητα του αντιοξειδωτικού συστήματος του οργανισμού, δημιουργείται το φαινόμενο της οξειδωτικής καταστροφής, το λεγόμενο οξειδωτικό στρες. Το οξειδωτικό στρες αποτελεί μια διαταραχή ως προς την ισορροπία μεταξύ της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου των ελευθέρων ριζών δηλαδή και την ικανότητα του οργανισμού να αδρανοποιεί τα τοξικά αυτά μόρια αλλά και να «επιδιορθώνει» τις βλάβες που αυτά προκαλούν. Αποτελεί την κύρια αιτία

καταστροφής των ιστών και γήρανσης, ενώ οι απόψεις δίστανται για το αν ευθύνεται για τον καρκίνο. Η κυτταροτοξική δράση του οξειδωτικού στρες αποδίδεται στην προσβολή πρωτεϊνών ζωτικής σημασίας, όπως είναι μερικά ένζυμα, νουκλεϊνικών οξέων, ορισμένων πολυσακχαριτών και κυρίως στην υπεροξειδωση των λιπαρών οξέων της κυτταρικής μεμβράνης. Οι βλάβες αυτές οδηγούν σε βιοχημικές και δομικές αλλοιώσεις του κυττάρου και τελικά τον θάνατο του. Ο οργανισμός εκτός από τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς διαθέτει και μηχανισμούς πλήρους επιδιόρθωσης ή πλήρους αποικοδόμησης των πρωτεϊνών, των νουκλεϊκών οξέων και των λιπαρών οξέων που έχουν υποστεί βλάβη από το οξειδωτικό στρες.



Εικόνα 5: Αντιοξειδωτικά σύμμαχος στο οξειδωτικό στρες

#### 6.4. Αντιοξειδωτικοί Αμυντικοί μηχανισμοί

Το οξειδωτικό στρες αναμφίβολα μπορεί να βλάψει τους οργανισμούς. Πιστεύεται πως οι αερόβιοι οργανισμοί διαθέτουν μηχανισμούς άμυνας τόσο αντιοξειδωτικούς όσο και επιδιόρθωση βλαβών. Η αντιοξειδωτική άμυνα αποτελείται από ενζυμικούς και βιολογικούς μηχανισμούς.

##### 6.4.1. Ενζυμικοί Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Συμπεριλαμβάνουν τη Δυσμουτάση του Σουπεροξειδίου(SOD), την καταλάση, την Υπεροξειδάση της Γλουταθιόνης και την Τρανσφεράση της Γλουταθιόνης.

Η καταλάση μετατρέπεται σε H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε νερό και οξυγόνο : 2H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+2 H<sub>2</sub>O+O<sub>2</sub>

Η υπεροξειδάση της γλουταθιόνης(GSH-Px) ανάγει τα υδρουπεροξειδία(ROOH) σε αλκοόλες (ROH) και επίσης ανάγει το υπεροξειδίο του υδρογόνου σε νερό ενώ η ίδια μετατρέπεται σε οξειδωμένη μορφή (GSSG) :  $2\text{GSH} + 2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$  .

#### 6.4.2. Βιολογική αντιοξειδωτική άμυνα

Αποτελείται από υδατοδιαλυτά και λιποδιαλυτά αντιοξειδωτικά. Τα υδατοδιαλυτά συμπεριλαμβάνουν την ανοιγμένη γλουταθιόνη, το ασκορβικό οξύ, και το ουρικό οξύ. Τα λιποδιαλυτά αποτελούνται από την βιταμίνη Ε, τις ουβικινόνες και τα καροτενοειδή. Η ανοιγμένη γλουταθιόνη δρα σαν αναγωγικός παράγοντας μετατρέποντας τις δισουλφυδρικές ομάδες σε θιόλες. Επίσης αποτελεί υπόστρωμα για την υπεροξειδάση και την τρανσφεράση της γλουταθιόνης. Το ασκορβικό οξύ είναι άλλος ένας αναγωγικός παράγοντας ικανός να προστατεύσει τα κυτταρικά συστατικά από ισχυρά οξειδωτικά.

$\text{Asc} + \text{Asc} \rightarrow \text{Asc} + \text{DHAsc}$

#### 6.4.3. Ασκορβικό Οξύ

Η χαμηλή δραστηριότητα της ρίζας του ασκορβικού φαίνεται να αποτελεί το σημαντικότερο παράγοντα για την κεντρική του θέση μεταξύ των φυσικών αντιοξειδωτικών. Σε διάφορα πειράματα έχει δειχθεί ότι το ασκορβικό οξύ αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας εναντίων των ελεύθερων ριζών στο υδατοδιαλυτό μέρος. Το ουρικό οξύ και τα καροτενοειδή συμπεροφέρονται σαν καθαριστές των ριζών, το ίδιο και η α-τοκοφερόλη και οι ουβικινόνες οι οποίες υπάρχουν κυρίως στις μεμβράνες.

#### 6.4.4. Βιταμίνη Ε

Η βιταμίνη Ε αποθηκεύεται σε διάφορους ιστούς (ήπαρ , καρδιά, πνεύμονες, λιπώδης ιστός) ενώ δεν βρίσκεται σε ιδιαίτερα μεγάλη ποσότητα στους μύς. Παρόλο την μικρή ποσότητα αποθηκευμένης βιταμίνης Ε στους ιστούς, η συγκέντρωση της είναι σταθερή και δύσκολα παρατηρείται απώλεια. Αυτό συμβαίνει επειδή η βιταμίνη Ε αφού οξειδωθεί και μετατραπεί σε ρίζα συνήθως επανέρχεται στην ανοιγμένη της μορφή μέσω ασκορβικού οξέος ή της GSH, ενζυμικά ή μη.

### 6.4.5. Καροτενοειδη

Είναι ευρέως διαδεδομένα στο φυτικό βασίλειο από όπου λαμβάνονται από τα ανώτερα θηλαστικά και συσσωρεύονται σε ορισμένους ιστούς. Η σημαντικότερη αντιοξειδωτική ιδιότητα των καροτενοειδών είναι η ικανότητα τους να απενεργοποιούν το μονήρες. In vitro μελέτες έχουν δείξει ότι τα καροτενοειδή υπό χαμηλή μερική πίεση O<sub>2</sub> μπορούν να αναστείλουν τη λιπιδιακή υπεροξειδωση. Έχει επίσης παρατηρηθεί ότι μπορούν να αντιδράσουν με διάφορους οξειδωτικούς παράγοντες σαν δότες ηλεκτρονίων. Οι δημιουργούμενες ρίζες των καροτενοειδών μπορούν είτε να αντιδράσουν μεταξύ τους σε μια αντίδραση, είτε να αντιδράσουν με άλλες αντιοξειδωτικές ουσίες.

### 6.5. Τροφές με την υψηλότερη αντιοξειδωτική περιεκτικότητα

Παραθέτω μια πολύ ενδιαφέρουσα λίστα, τα στοιχεία της οποίας αντλούνται από την επιστημονική εργασία \*Content of redox-active compounds (ie, antioxidants) in foods consumed in the United States\* και περιέχει τις τροφές με την υψηλότερη περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικά.

Προϊόντα	Περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικά(mmol/100g)
1. Γαρύφαλλο (στο φαγητό)	<i>125,549 mmol</i>
2. Ρίγανη	<i>40,299 mmol</i>
3. Τζίντζερ	<i>21,571 mmol</i>
4. Κανέλα	<i>17,647 mmol</i>
5. Καρύδια	<i>13,126 mmol *</i>
6. Βασιλικός	<i>12,307 mmol</i>
6. Κάρυ	<i>9,980 mmol</i>
7. Μαύρο Πιπέρι	<i>4,444 mmol</i>
8. Αγκινάρες	<i>4,237 mmol *</i>

9. Μαύρη Σοκολάτα	<i>4,188 mmol</i>
10. Βατόμουρα (Blackberries)	<i>3,990 mmol *</i>

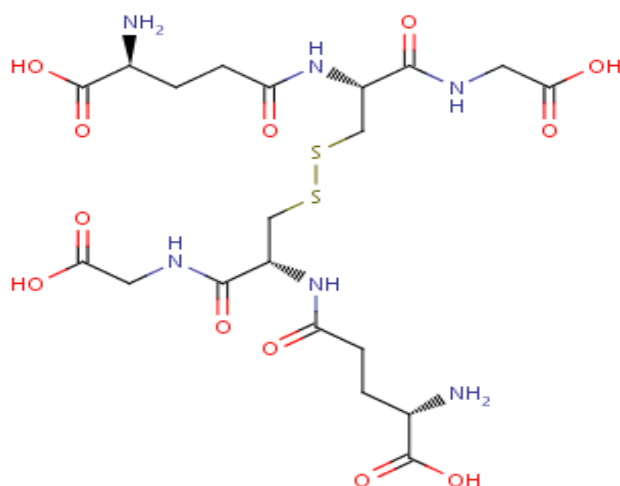
Ο Παρακάτω πίνακας είναι βασισμένος στην περιεκτικότητα των αντιοξειδωτικών σε μερίδα φαγητού, για αυτό και συναντάμε διαφορές στην περιεκτικότητα των αντιοξειδωτικών σε ορισμένα προϊόντα \* Εάν εφαρμοστεί η απλή μέθοδος των τριών στα προϊόντα με αστερίσκο και στους δύο πίνακες, θα παρατηρήσουμε ότι ταυτίζονται απόλυτα, πράγμα που δηλώνει την αξιόπιστα της δουλειάς.

<b>Προϊόντα</b>	<b>Περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικά (mmol/serving) / (270ml)</b>
1. Βατόμουρα	<i>5,5746 mmol στα 140 gr*</i>
2. Καρύδια	<i>3,721 mmol στα 28,35 gr*</i>
3. Φράουλες	<i>3,584 mmol</i>
4. Αγκινάρες	<i>3,559 mmol στα 84 gr*</i>
5. Μούρα	<i>3,125 mmol</i>
6. Καφές	<i>2,959 mmol</i>
7. Κόκκινο κρασί	<i>2,199 mmol</i>
8. Χυμός Πορτοκάλι	<i>1,510 mmol</i>
9. Ανανάς	<i>1,276 mmol</i>

### **6.6.Μέτρηση Οξειδωτικού Στρες**

Για την αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες οι περισσότεροι ερευνητές έχουν εξετάσει παραμέτρους στο αίμα και στα ούρα ενώ πολύ λίγες μελετητές έχουν εξετάσει το οξειδωτικό στρες στο μυϊκό ιστό των ανθρώπων. Οι πιο κοινοί παράμετροι που έχουν κατά

καιρούς μετρηθεί είναι τα παραπροϊόντα της υπεροξειδάσης των λιπιδίων, προϊόντα οξείδωσης των πρωτεϊνών και DNA, ικανότητα παραγωγής ΔΜΟ από τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα, ενεργότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων, καθώς και οι αλλαγές στην κατάσταση των αντιοξειδωτικών παραγόντων όπως η γλουταθειόνη.



Εικόνα 6: Γλουταθειόνη

Η Γλουταθειόνη είναι ένα αμινοξύ που μετατρέπεται στον οργανισμό σε υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, και αποτελεί ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό παράγοντα. Φάρμακα όπως η ακεταμινοφαίνη και η ιβοπροφαίνη (ανήκουν στα παυσίπονα) εξαντλούν τα αποθέματα της γλουταθειόνης. Η γλουταθειόνη είναι ένας πολύ σημαντικός εκκαθαριστής των κυττάρων και των ελεύθερων ριζών και η ύπαρξή της σε μεγάλες συγκεντρώσεις στον οργανισμό είναι πολύ αποτελεσματικός τρόπος για να βελτιώσουμε τη λειτουργία του ανοσοποιητικού επειδή, ενδεικτικά: βοηθάει το ήπαρ στην αποτοξίνωση (και αυτό επαληθεύεται με εξετάσεις στις τρανσαμινάσες). Επίσης αναζωογονεί και ενδυναμώνει το ανοσοποιητικό σύστημα στους ηλικιωμένους και τους ασθενείς, καθώς μπορεί να βελτιώσει τα επίπεδα της LDL (χοληστερίνη). Η παρουσία της, σε φυσιολογικά επίπεδα, βοηθά στην προστασία μας από τις τοξικές μορφές του οξυγόνου. Αν τα επίπεδα συγκέντρωσης δεν είναι φυσιολογικά, ο οργανισμός μας αυξάνει τα επίπεδά της για να μεταβολίσει, μεταξύ άλλων το αλκοόλ, τα καυσαέρια, τα εντομοκτόνα και τις καρκινογόνες ουσίες. Δυστυχώς, με την πάροδο των χρόνων τα επίπεδα της Γλουταθειόνης αρχίζουν και μειώνονται στον οργανισμό μας αποδυναμώνοντας το ανοσοποιητικό μας σύστημα. Πολλοί είναι οι επιστήμονες που πιστεύουν ότι τα επίπεδα της Γλουταθειόνης στο σώμα, καθορίζουν και το πόσα χρόνια θα

ζήσουμε. Μετά από έρευνες σε ανθρώπους που ζουν 100 και πλέον χρόνια διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα γλουταθειόνης στο αίμα τους ήταν πολύ υψηλά και πλέον την χρησιμοποιούμε ως παράγοντα πρόβλεψης μακροζωίας.

## **ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ**



Σύμφωνα με ότι υποστηρίζει ο καθηγητής Θεοφανίδης, ο έρωτας και η επιστήμη είναι από τις συναρπαστικότερες διαστάσεις της ζωής, δεδομένου ότι, ο μεν έρωτας συνδέεται με τη διαίωσή της ίδιας της ζωής, η δε επιστήμη προκαλεί το ενδιαφέρον και την αφοσίωση των πιο ξεχωριστών πνευμάτων της ανθρωπότητας.



Για την οριοθέτηση της ερευνητικής εργασίας μου με θέμα "Διερεύνηση ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας σε δείγματα ασθενών από την Σαρδηνία και την Θεσσαλονίκη με θαλασσαιμία" χρησιμοποίησα δεδομένα από επιστημονικές εργασίες άλλων πανεπιστημίων. Τα δεδομένα τα οποία χρησιμοποίησα παραθέτονται παρακάτω και αποτέλεσαν κινητήριο μοχλό για την έναρξη της έρευνας μου.

## **ΚΕΦ. 1<sup>ο</sup>: ΟΛΙΚΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΣΤΟ ΑΙΜΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΑ / ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ (Συγκριτική μελέτη Σαρδηνία/Θεσσαλονίκη)**

### **1.1. Γενικά**



Η επιλογή και η οριοθέτηση του αντικειμένου της έρευνας έγινε με βάση τα ερεθίσματα τα οποία δέχτηκα στην διάρκεια της πρακτικής μου άσκησης στην Σαρδηνία. Μεγάλος αριθμός των ανθρώπων που γνώρισα κατά την παραμονή μου ήταν θαλασσαιμικοί, ετερόζυγοι και ομόζυγοι. Η διατροφή των κατοίκων της τοπικής κοινωνίας καθώς και το ενδιαφέρον μου για την κλινική εικόνα τους, συνετέλεσαν στην επιλογή της πτυχιακής μου με θέμα: "Οξειδωτικό Στρες σε ασθενείς με Θαλασσαιμία, Σύγκριση Δειγμάτων Σαρδηνίας-Θεσσαλονίκη".

Μετά από συζητήσεις με την υπεύθυνη καθηγήτρια μου Ευγενία Λυμπεράκη, θεωρήσαμε ενδιαφέρον να συγκρίνουμε Θαλασσαιμικούς που ζουν στην Σαρδηνία και στην Θεσσαλονίκη αντίστοιχα. Οι κύριες έννοιες που επιλέξαμε να προσδιορίζουμε αφορούν το Οξειδωτικό στρες που δημιουργείται στους θαλασσαιμικούς

ασθενείς και κατά πόσο η αντιοξειδωτική τους ικανότητα τους είναι ικανή να περιορίσει το οξειδωτικό στρες, το οποίο αναμφίβολα δημιουργείται λόγω της πάθησης τους.

Η επιστημονική εργασία *Total antioxidant Status in Patients with Major  $\beta$ -Thalassemia /Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα σε ασθενείς με Ομόζογη  $\beta$ -θαλασσαιμία* έγινε στο Πανεπιστήμιο της Τεχεράνης στο Ιράν από την Sedigh Shams και τους συνεργάτες της και αποτελεί μια εργασία που αναμένει τα αποτελέσματά μας.

Η Δρ. Sedigh Shams και η ομάδα της χρησιμοποίησαν 66 δείγματα θαλασσαιμικών με καταγωγή από το Ιράν και αντίστοιχα 66 δείγματα φυσιολογικών που δεν πάσχουν από θαλασσαιμία. Μετρήθηκαν τα Ολικά αντιοξειδωτικά (TAS), η χολερυθρίνη, το ουρικό οξύ και η αλβουμίνη (λευκωματίνη) τους. Τα αποτελέσματα έδειξαν αυξημένα τα επίπεδα ολικών αντιοξειδωτικών στους ασθενείς με Θαλασσαιμία σε σύγκριση με την ομάδα Ελέγχου. Η ύπαρξη οξειδωτικού στρες σε αυτούς τους ασθενείς και τα ολικά αντιοξειδωτικά είναι το κέντρο μελέτης που μας ενδιαφέρει. Παρόλα αυτά, τα υψηλά επίπεδα των ολικών αντιοξειδωτικών μπορεί να οφείλονται σε αυξημένα ενδογενή αντιοξειδωτικά όπως η φερριτίνη, το ουρικό οξύ και η χολερυθρίνη.

Γνωρίζουμε λοιπόν, ότι οι ασθενείς με  $\beta$ -θαλασσαιμία εκτίθενται κυρίως σε οξειδωτικό στρες λόγω της υπερφόρτωσης σιδήρου. Ως εκ τούτου, η αξιολόγηση και η



Εικόνα 2 Ιράν

συντήρηση της αντιοξειδωτικής άμυνας μπορεί να είναι χρήσιμη στην προστασία τους από πιο σοβαρές επιπλοκές της νόσου. Στην παρούσα μελέτη, η αντιοξειδωτική άμυνα αξιολογήθηκε με μέτρηση της ολικής αντιοξειδωτικής κατάστασης (TAS) στον ορό. Η μέτρηση των διαφόρων αντιοξειδωτικών μορίων ξεχωριστά θα αποτελούσε δαπανηρή και χρονοβόρα εργασία. Επιπλέον, ορισμένοι ερευνητές προτείνουν ότι η εκτίμηση της συνολικής αντιοξειδωτικής

ικανότητας του πλάσματος μπορεί να είναι πιο χρήσιμη από τη μέτρηση των αντιοξειδωτικών μεμονωμένα, αφού θα μπορούσε να προσδιοριστεί η συνολική αλληλεπίδραση τους, τεχνική που επιλέξαμε στην παρούσα έρευνα.

Υπάρχουν πολλές υποθέσεις για να εξηγήσουν την ενισχυμένη TAS στους ασθενείς. Η απόκριση αντιοξειδωτικής αντιστάθμισης που προκύπτει από το υπερβολικό οξειδωτικό στρες και την απαραίτητη μετάγγιση του αυξημένου ποσοστού των νεότερων ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBC) θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως δύο πιθανοί σχετικοί μηχανισμοί.

Ένας άλλος μηχανισμός για να δικαιολογήσει την αύξηση της αξιολογημένης αντιοξειδωτικής ικανότητας μπορεί να είναι σχετικός με τη θεραπεία αποσιδήρωσης με δεφεροξαμίνη (DFO). Η αυξημένη χολερυθρίνη και το ουρικό οξύ (UA) στους θαλασσαιμικούς ασθενείς, όπως η αντιοξειδωτική εμπλοκή στα TAS, θα μπορούσε να είναι ένας λόγος για την παρατηρούμενη αύξηση της.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει την επίδραση του UA στη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα σε ασθενείς με νεφρική δυσλειτουργία, η οποία είναι σύμφωνη με αυτή την υπόθεση. Ως εκ τούτου, προκειμένου να μειωθεί αυτή η επίδραση, χρησιμοποιήσαμε cTAS, η οποία υπολογίζεται σύμφωνα με την ποσότητα αλβουμίνης, UA και της χολερυθρίνης. Ωστόσο, το χάσμα μεταξύ της μετρημένης και υπολογιζόμενης TAS, το οποίο συνεπάγεται από τους υπόλοιπους μη μετρημένους αντιοξειδωτικούς παράγοντες, ήταν σημαντικά υψηλότερο στην ομάδα των ασθενών σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, η οποία θα μπορούσε να υποδηλώνει ότι η αύξηση της TAS δεν μπορεί να εξηγηθεί μόνο ως αποτέλεσμα της αύξησης του UA και της χολερυθρίνης. Τέλος, η σημαντική διαφορά επιπέδου ουρικού οξέος μεταξύ των ασθενών και των ομάδων ελέγχου, μπορεί να επηρεάσει το μετρημένο αντιοξειδωτικό με την αναστολή της παραγωγής ABTS.

## **1.2. Επίπεδα χολερυθρίνης**

Τα σημαντικά αυξημένα επίπεδα χολερυθρίνης που παρατηρήθηκαν στους ασθενείς με β-θαλασσαιμία, σε αντίθεση με την ομάδα ελέγχου θα μπορούσαν να οφείλονται σε αιμόλυση που παρατηρείται στους ασθενείς αυτούς. Επιπλέον, η υπερφόρτωση σιδήρου θα μπορούσε δυνητικά να επάγει την ηπατική τοξικότητα, και κατά συνέπεια το αυξημένο επίπεδο χολερυθρίνης, το οποίο προκύπτει από την μείωση της δραστηριότητας του κυτοχρώματος c της οξειδάσης διαταράσσοντας την μιτοχονδριακή αναπνοή. Η ηπατική βλάβη που προκαλείται από υπερφόρτωση σιδήρου θα μπορούσε να οδηγήσει σε μείωση του επιπέδου της βιταμίνης E στον ορό σε απουσία αύξησης τρανσαμινάσης.

### **1.2.1. Φύλο (Γυναίκες/Άντρες)**

Στη μελέτη αυτή, σημαντικά υψηλότερο επίπεδο χολερυθρίνης βρέθηκε στους άνδρες σε σύγκριση με τις γυναίκες στην ομάδα των ασθενών. Αυτή η διαφορά μεταξύ των φύλων αναφέρεται στις προηγούμενες μελέτες σε φυσιολογικό πληθυσμό με εύρος ηλικίας άνω των 10 ετών, το οποίο δικαιολογείται από το αποτέλεσμα των ορμονικών αλλαγών που οφείλονται στην εφηβεία επί του μεταβολισμού της χολερυθρίνης. Παρόλο που αυτή η διαφορά μπορεί να εξηγηθεί από τις ορμονικές διαφορές λόγω του μέσου όρου ηλικίας των ασθενών ( $14,7 \pm 6,9$  έτη), η έλλειψη κοινών αποτελεσμάτων με την ομάδα control είναι αινιγματική. Η σημαντική παρατηρηθείσα αντιοξειδωτική άνοδος στα αρσενικά σε σύγκριση με τα θηλυκά έχει αναφερθεί και σε ποντίκια. Μια άλλη μελέτη επίσης αποκάλυψε ότι η οξειδωτική πίεση στα αρσενικά είναι ελαφρώς μεγαλύτερη από ότι στα θηλυκά, το οποίο μπορεί να εξηγηθεί από την αντισταθμιστική αντιοξειδωτική άνοδο στα αρσενικά. Επομένως, αυτή η εύρεση ίσως να οφείλεται στη σημαντική άνοδο χολερυθρίνης στο αρσενικό σε σύγκριση με το θηλυκό.

### 1.3.Περιορισμοί

Εντούτοις, η επιβεβαίωση της ένωσης μεταξύ της οξειδωτικής πίεσης και της αντισταθμιστικής αύξησης στο TAS απαιτεί την ταυτόχρονη μέτρηση τους. Αυτή η μελέτη είχε κάποιους περιορισμούς, για παράδειγμα, τα ηπατικά ένζυμα και τα επίπεδα φερριτίνης δεν έχουν ελεγχθεί στην ομάδα ελέγχου. Πράγματι, αν και η ομάδα ελέγχου ήταν φαινομενικά φυσιολογική, δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο κάποιων βαθμών από μεταβολικές διαταραχές ή λανθάνουσα νόσο.

#### *Δημογραφικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά ασθενών και Control (πίνακας 1)*

<b>Παράμετροι</b>	<b>Ασθενείς</b>	<b>Control</b>	<b>P-value</b>
Φύλο (Ανδρας/Γυναίκα)	34/32	34/32	-
Ηλικία	14.73	15.15	0.735
<b>TAS(mmol/l)</b>	<b>1.50</b>	<b>1.36</b>	<b>&lt;0.001</b>
<b>Ουρικό οξύ (mg/dl)</b>	<b>4.11</b>	<b>3.27</b>	<b>&lt;0.001</b>
Αλβουμίνη (g/dl)	4.58	4.65	0.328

<i>Χολερυθρίνη</i>	<i>1.25</i>	<i>0.67</i>	<i>&lt;0.001</i>
Φερριτίνη	2291	-	-
AST	31.72	-	-
ALT	30.73	-	-

#### 1.4. Συνοπτικά Μελέτες για το οξειδωτικό στρες σε θαλασσαιμικούς

Υπάρχουν περιορισμένες μελέτες για την εκτίμηση των επιπέδων ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας σε θαλασσαιμικούς ασθενείς. Σε μια μελέτη στην Ιταλία, αναφέρθηκε μια



σημαντική μείωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) σε θαλασσαιμικούς ασθενείς σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Μια σημαντικά χαμηλότερη συγκέντρωση παρατηρήθηκε σε TAC (ολική αντιοξειδωτική κατάσταση) θαλασσαιμικών ασθενών που ακολουθούν θεραπεία αποσιδήρωσης με δεσφεριοξαμίνη (DFO) σε σύγκριση με τους ασθενείς οι οποίοι δεν ακολουθούσαν θεραπεία αποσιδήρωσης με DFO.

Ωστόσο, ο Cakmak και οι συνεργάτες του δεν ανέφεραν καμία σημαντική διαφορά στα TAC μεταξύ των θαλασσαιμικών και των ομάδων ελέγχου, παρά το αυξημένο επίπεδο οξειδωτικής εικόνας (OS) και του δείκτη οξειδωτικού (OSI) στρες.

#### *EffectsofVitaminEandZincSupplementationon Antioxidants inBeta thalassemia majorPatients / Επιπτώσεις της βιταμίνης E και του ψευδαργύρου στην αντιοξειδωτική κατάσταση των ασθενών με θαλασσαιμία*

Σε αυτή την έρευνα, η οποία πήρε μέρος στο Πανεπιστήμιο του Ταπρίζ του Ιράν, οι θαλασσαιμικοί χωρίστηκαν τυχαία σε τέσσερις ομάδες, των 30 ατόμων. Η πρώτη και η δεύτερη ομάδα πήρε ένα συμπλήρωμα 220 mg θεικού ψευδαργύρου για τρεις μήνες και 400 mg συμπληρώματος βιταμίνης E ημερησίως για τρεις μήνες. Η τρίτη ομάδα πήρε και τα δύο συμπληρώματα σε παρόμοιες δόσεις. Η τέταρτη ομάδα (ελέγχου) δεν έλαβε τίποτα. Ελήφθησαν δείγματα αίματος μετά από μια 12-ωρη νηστεία, λίγο πριν την μετάγγιση στην αρχή και στο τέλος της μελέτης, και φυλάχθηκαν στους -70 C έως τον ποσοτικό

προσδιορισμό. Τα επίπεδα της βιταμίνης E στον ορό μετρήθηκαν με HPLC. Εκατόν είκοσι άτομα, συμπεριλαμβανομένων 57 άνδρες και 63 γυναίκες συμμετείχαν σε αυτή τη μελέτη. Η μέση ηλικία για όλες τις ομάδες ήταν 21,1 ( $\pm$  9,7) έτη. Μέση τιμή ηλικίας των αντρών ήταν 21,6  $\pm$  3,8 και για τις γυναίκες 22,2  $\pm$  4,6 έτη.

Ο προσδιορισμός του TAC δεν έδειξε σημαντικές μεταβολές σε οποιαδήποτε από τις ομάδες που μελετήθηκαν. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην τέταρτη ομάδα (ελέγχου), στην οποία δεν χρησιμοποιήσαν συμπληρώματα.

***Total antioxidant capacity and ischemia modified albumin in beta thalassemia / Ολική αντιοξειδωτική κατάσταση και τροποποιημένη ισχαιμική λευκωματίνη σε β-θαλασσαιμία.***

Σε άλλη έρευνα που διενεργήθηκε από τον Awadallah S. σε ασθενείς με θαλασσαιμία η ολική αντιοξειδωτική κατάσταση τους βρέθηκε σημαντικότερα χαμηλή σε σύγκριση με την ομάδα control, με κοινή βιοχημική μέθοδο (mM Trolox).

***Αντιοξειδωτική ικανότητα στο πλάσμα σπέρματος των ασθενών με β-θαλασσαιμία.***

Στην συγκεκριμένη έρευνα που διεξήχθη στο Πανεπιστήμιο του Παλέρμο από τον Carpino A. Και την ομάδα του αξιολογήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα του σπέρματος ασθενών με θαλασσαιμία. Χρησιμοποιήθηκαν 10 δείγματα θαλασσαιμικών και 10 φυσιολογικών. Τα αποτελέσματα έδειξαν κοινή αντιοξειδωτική κατάσταση μεταξύ των θαλασσαιμικών και της ομάδας Ελέγχου.

Εν κατακλείδι τα δεδομένα αυτά μας οδήγησαν σε διφορούμενα συμπεράσματα. Δυο έρευνες είχαν σαν αποτέλεσμα μειωμένη αντιοξειδωτική κατάσταση ασθενών με θαλασσαιμία ενώ μια έρευνα είχε σημαντικά αυξημένη την αντιοξειδωτική ικανότητα τους, αναμένοντας μάλιστα τα δικά μας αποτελέσματα γεγονός που θεωρείται σημαντικό λόγω της διαφορετικής καταγωγής των πασχόντων.

## 2.1.Oxidative stress and $\beta$ -thalassemic erythroid cells behind the molecular defect/ Οξειδωτικό Στρες και $\beta$ -θαλασσαιμικά ερυθροκύτταρα

Σεπτέμβριος 2013



Εικόνα 1

Δεδομένου ότι το οξειδωτικό στρες παίζει έναν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της  $\beta$ -θαλασσαιμίας, η χρήση διαφόρων μορίων με αντιοξειδωτικές ιδιότητες αποτελεί όσο το δυνατόν θεραπευτική στρατηγική στη  $\beta$ -θαλασσαιμία. Σε ερευνητική μελέτη που έγινε σε ένα τροποποιημένο μοντέλο ποντικού για την  $\beta$ -μεσογειακή αναιμία έδειξε ότι μετά την έγχυση ρεσβερατρόλης στον οργανισμό του, βελτιώθηκε η αναποτελεσματική

ερυθροποίηση που προυπήρχε χάρη στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα, FOXO3, ο οποίος είχε σαν αποτέλεσμα την μείωση του οξειδωτικού στρες στα κυκλοφορούντα  $\beta$ -θαλασσαιμικά ερυθροκύτταρα. Σε μία άλλη μελέτη που πήρε μέρος σε θαλασσαιμικούς με ενδιάμεση μεσογειακή αναιμία δώθηκαν, από του στόματος, συμπληρώματα βιταμίνης E όπου είχε σαν αποτέλεσμα την βελτίωση του οξειδωτικού στρες στο πλάσμα. Ένα άλλο αντιοξειδωτικό μόριο που έχει αξιολογηθεί είναι η ζυμωμένη παπάγια (FPP). Μελέτες in vitro αλλά και in vivo σε τροποποιημένα μοντέλα ποντικών για  $\beta$ -θαλασσαιμία έδειξαν ότι η ζυμωμένη παπάγια μειώνει το οξειδωτικό στρες στα  $\beta$ -θαλασσαιμικά κύτταρα, την υπεροξειδωση των λιπιδίων της μεμβράνης και το ποσοστό των θετικών PS ερυθροκυττάρων παράλαυτα όμως αυξάνει την γλουταθειόνη (GSH). Η βελτίωση των χαρακτηριστικών ερυθρών κυττάρων που προκαλείται από την παπάγια συνδέεται επίσης με το μειωμένο δείκτη κυτταρικής φαγοκυτταρώσης, υποδηλώνοντας έτσι την πιθανή μείωση που προκύπτει από την απομάκρυνση της παπάγιας στα  $\beta$ -θαλασσαιμικά ερυθροκύτταρα από την περιφερική κυκλοφορία του συστήματος μακροφάγων. Σε αντίθεση όμως στην κουρκουμίνη (πολυφαινόλη), παρά την σημαντική αναστολή της υπεροξειδωσης των λιπιδίων στα  $\beta$ -θαλασσαιμικά ερυθροκύτταρα και την



βελτίωση των επιπέδων της μεθαιμοσφαιρίνης, δεν παρατηρείται καμία επίδραση στα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης των ασθενών αυτών.



Εικόνα 2 Αντιοξειδωτικά

**Ρεσβερατρόλη:** είναι μια φαινόλη που παράγεται από φυτά όταν αυτά δεχτούν επίθεση από μύκητες ή από ιούς.

**Κουρκουμίνη:** είναι μια πολυφαινόλη που απομονώνεται από τις ρίζες του φυτού *Curcuma longa*.

**Ζυμωμένη Παπάγια:** Πρόκειται για προϊόν από ζύμωση μαγιάς του φυτού *Carica Papaya*. Για τα *in vitro* πειράματα η σκόνη της παπάγιας, διαλύονταν μέσα σε διπλόαποσταγμένο νερό.

## 2.2. Τα αντιοξειδωτικά και η χρήση τους στην υπογονιμότητα των ανδρών/ University of Oakland

2013



Η Δρ Μάριαν Σογουελ από το Πανεπιστήμιο του Όκλαντ στη Νέα Ζηλανδία, ηγήθηκε έρευνας που έγινε με θέμα «την λήψη αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων ως παράγοντες αύξησης των πιθανοτήτων σύλληψης, κατά τη διάρκεια μιας θεραπείας γονιμότητας». Η κύηση ή η απόκτηση ζώντος νεογνού είναι πιθανότερη για τα ζευγάρια που

ο άνδρας παίρνει συγκεκριμένες βιταμίνες ή άλλα αντιοξειδωτικά. Ερευνητές της ‘‘TheCochrane Library’’ μελέτησαν στοιχεία από έρευνες που είχαν γίνει σε περισσότερα από 1.000 ζευγάρια που είχαν αποταθεί σε κλινικές γονιμότητας, όπου στις περισσότερες περιπτώσεις ο άνδρας είχε μειωμένο αριθμό σπερματοζωαρίων. Η μελέτη είχε ως αφορμή την

τάση πολλών κλινικών να υπερασπίζονται την χρήση των αντιοξειδωτικών, ως φυτικά και συνθετικά χημικά συστατικά, περιλαμβανομένων συγκεκριμένων βιταμινών και ιχνοστοιχείων. Η χρήση των αντιοξειδωτικών βασίζεται στη θεωρία των ελεύθερων ριζών που μπορεί να προκαλέσουν βλάβες στο DNA του σπέρματος, το οποίο είναι ζωτικής σημασίας για την δημιουργία του εμβρύου. Το αποτέλεσμα είναι μειωμένος αριθμός σπερματοζωαρίων και εξασθενημένη ικανότητα γονιμοποίησης του ωαρίου. Η ανασκόπηση επικεντρώθηκε σε 34 ελεγχόμενες μελέτες με ζευγάρια που έκαναν θεραπεία υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, όπως εξωσωματική γονιμοποίηση και σπερματεγχύσεις. Οι περισσότεροι άνδρες είχαν μειωμένη κινητικότητα σπέρματος ή μικρό αριθμό σπερματοζωαρίων. Εκ των 214 ζευγαριών, 20 απέκτησαν απόγονο, όταν οι άνδρες πήραν αντιοξειδωτικά. Οι άνδρες που είχαν πάρει αντιοξειδωτικά σε μορφή δισκίου είχαν στατιστικά σημαντική αύξηση του ποσοστού ζώντων γεννήσεων, όταν συγκρίθηκαν με άνδρες που άνηκαν στην ομάδα ελέγχου. Οι γεννήσεις είχαν αναφερθεί σε τρεις ξεχωριστές μελέτες. Εκ των 964 ζευγαριών, κήσεις καταγράφηκαν σε 96 περιπτώσεις. Η χρήση αντιοξειδωτικών σχετίστηκε με στατιστικά σημαντική αύξηση του ποσοστού κήσης, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Οι κήσεις αφορούσαν 15 ξεχωριστές μελέτες. Οι έρευνες διερευνούσαν επίσης της χρήση πολλών διαφορετικών τύπων αντιοξειδωτικών δισκίων, περιλαμβανομένης της βιταμίνης E, της L-καρνιτίνης, του ψευδαργύρου και του μαγνησίου.

## **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

---

## **ΚΕΦ. 1<sup>ο</sup>: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

---

Η ομόζυγη β-θαλασσαιμία οδηγεί σε σημαντική ελάττωση της παραγωγής β-αλυσίδων και μεγάλη περίσσεια των α. Μια κρίσιμη συνιστώσα στην οξειδωτική ευαισθησία των ερυθρών αιμοσφαιρίων των θαλασσαιμικών είναι η απελευθέρωση της αίμης και του σιδήρου από τις αταίριαστες αλυσίδες. Αυτή η απελευθέρωση μπορεί να εκκινήσει οξειδωαναγωγικές αντιδράσεις οι οποίες οξειδώνουν επιπροσθέτως την αιμοσφαιρίνη και επιταχύνουν την καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Επιπλέον οι ασθενείς βρίσκονται υπό συνεχείς μεταγγίσεις οι οποίες οδηγούν σε υπερφόρτωση σιδήρου με αποτέλεσμα εμφάνιση οξειδωτικού στρες. Η μελέτη αυτή σχεδιάστηκε με στόχο να διερευνηθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα των θαλασσαιμικών. Η σύγκριση θαλασσαιμικών με διαφορετική καταγωγή στοχεύει στις διαφορές των δύο λαών καθώς γνωρίζουμε ότι το οξειδωτικό στρες είναι πολυπαραγοντικό. Τα αποτελέσματα αυτά στοχεύουν στην δημιουργία μιας ολοκληρωμένης εικόνας για την αντιοξειδωτική ικανότητα των Σαρδηνίων και Θεσσαλονικιών θαλασσαιμικών και σύγκριση των μεταξύ τους αποτελεσμάτων.

---

## **ΚΕΦ. 2<sup>ο</sup>: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ**

---

### **2.1.Υλικά**

Στον εργαστηριακό έλεγχο για την διερεύνηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC), χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 80 δείγματα πλάσματος. Τα δείγματα αυτά συλλέχθηκαν στα πλαίσια συνεργασίας με το πανεπιστημιακό νοσοκομείο του Σάσσαρι της Σαρδηνίας και τοπικού νοσοκομείου της Θεσσαλονίκης.

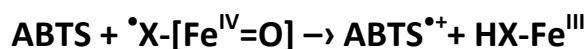
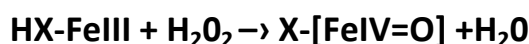
Η μεταφορά των δειγμάτων από την Σαρδηνία στην Ελλάδα έγινε μέσα σε ξηρό πάγο αφού πριν είχα κρατήσει το πλάσμα από το ολικό αίμα που συλλέχθηκε στο κέντρο αιμοδοσίας του νοσοκομείου. Η αντίστοιχη διαδικασία έγινε και στο τοπικό νοσοκομείο Θεσσαλονίκης.

Ο προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης έγινε με χρήση του Antioxidant Assay Kit της Sigma (Product Code CS0790). Η μέτρηση της απορρόφησης (405nm) έγινε με χρήση του μηχανήματος Elisa Reader.

Χρησιμοποιήθηκε ένα κοινό ερωτηματολόγιο για τους Έλληνες και τους Σαρδήνιους ασθενείς με θαλασσαιμία., ανάλογα διαμορφωμένα στην μητρική τους γλώσσα. Ένα στα ιταλικά το οποίο απευθύνονταν στους Σαρδήνιους και ένα στα ελληνικά για τους Έλληνες. Τα ερωτηματολόγια περιλάμβαναν ερωτήσεις που αφορούσαν το είδος της θαλασσαιμίας, την φαρμακευτική αγωγή τους, την αιματολογική κατάσταση τους η οποία συμπληρώθηκε από τον θεράπων ιατρό καθώς και ερωτήσεις σχετικές με την διατροφή τους τις οποίες απάντησαν οι ίδιοι. Οι ερωτήσεις που τέθηκαν είχαν ως στόχο τη συλλογή πληροφοριών σχετικά με την λήψη αντιοξειδωτικών και με σκοπό την πιθανή συσχέτιση της αυξημένης ολικής αντιοξειδωτικής κατάστασης τους με την παθοφυσιολογία της ασθένειας τους καθώς και την διαφορετική διατροφή την οποία ακολουθούν.

### 2.1.1. Μέθοδος προσδιορισμού αντιοξειδωτικών στο αίμα

Ο προσδιορισμός των αντιοξειδωτικών στηρίζεται στον σχηματισμό ρίζας ferryl-μυοσφαιρίνης από μεθμυοσφαιρίνη και υπεροξείδιο του υδρογόνου η οποία οξειδώνει το ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)) και παράγει κατιονικές ρίζες,  $ABTS^{\bullet+}$ , ένα διαλυτό χρωμογόνο το οποίο έχει πράσινο χρώμα και προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά στα 405 nm.

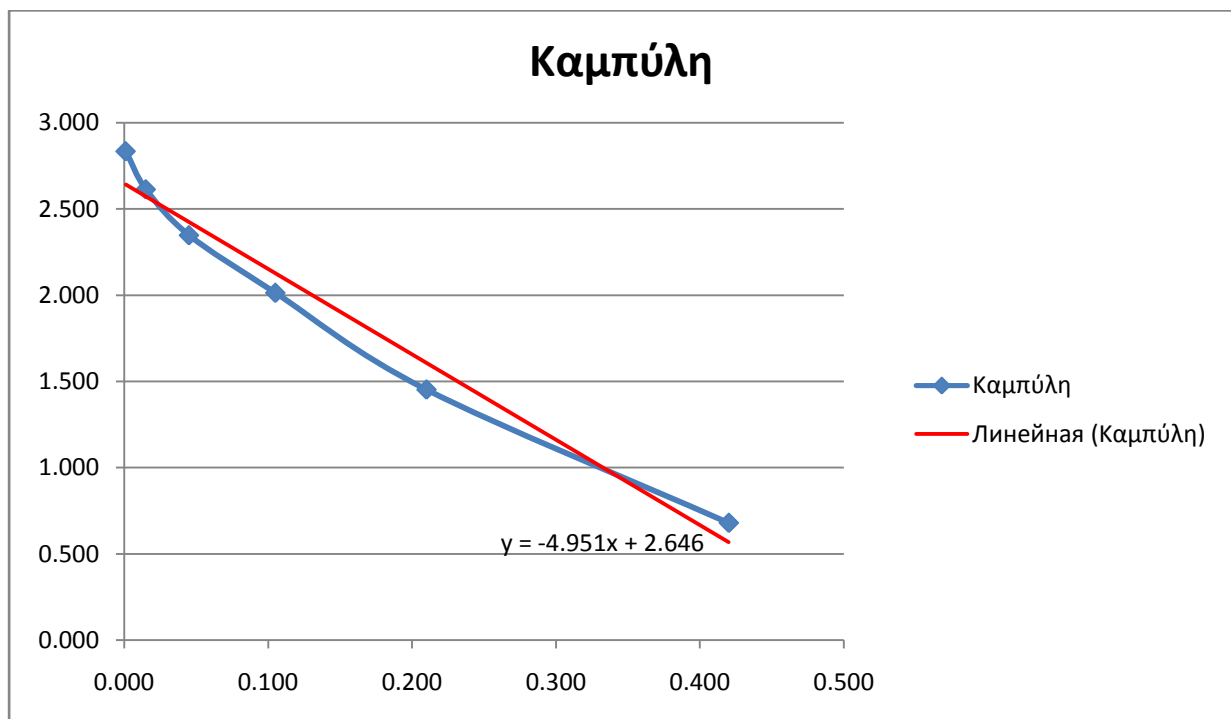


Όπου σε αυτή την εξίσωση  $HX-Fe^{III}$  είναι η μεθμυοσφαιρίνη και  $\bullet X-[Fe^{IV}=O]$  είναι η ferryl-μυοσφαιρίνης. Τα αντιοξειδωτικά καταστέλλουν την παραγωγή των κατιονικών ριζών  $ABTS^{\bullet+}$  με τρόπο που εξαρτάται από τη συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού, ενώ η ένταση του χρώματος μειώνεται αναλογικά. Το Trolox, ένα υδατοδιαλυτό ανάλογο της βιταμίνης E, χρησιμεύει ως πρότυπο αντιοξειδωτικό για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης. Με τη χρήση της πρότυπης καμπύλης η απορρόφηση που παίρνουμε για κάθε δείγμα μετατρέπεται σε ισοδύναμα συγκέντρωσης Trolox.

Το kit είναι κατάλληλο για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος του ορού, των ούρων, του σάλιου και των κυττάρων. Παρακάτω δίνεται η πρότυπη καμπύλη Trolox, με βάση το kit που χρησιμοποιήσαμε στο πείραμα και το πιάτο λίγο πριν την μέτρηση των απορροφήσεων.

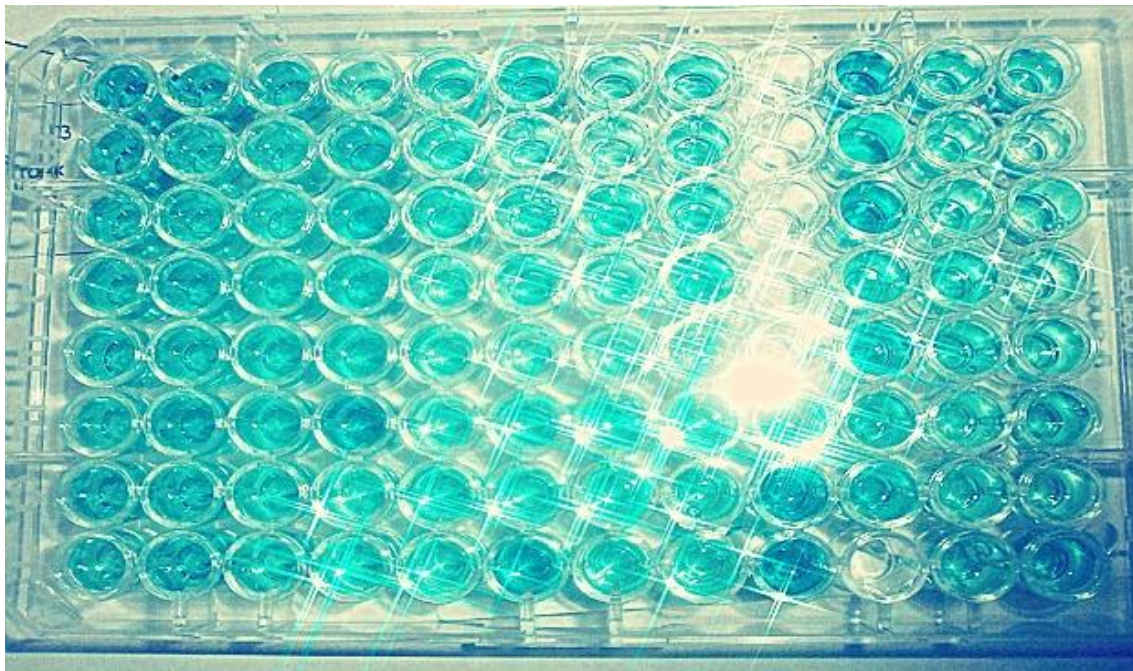
## 2.2. Στατιστική ανάλυση

Χρησιμοποιήσαμε το πρόγραμμα Microsoft Office Excel και συγκεκριμένα το T-test με κατανομή Gauss. Η μέθοδος χρησιμοποιείται για την σύγκριση των μέσων τιμών δυο ανεξάρτητων και κανονικών πληθυσμών με μέσες τιμές  $\mu_1$  και  $\mu_2$ . Εφαρμόσαμε δίπλευρη t-test για να δούμε αν οι δύο μέσοι όροι έχουν την τάση να είναι ίσοι. Εφαρμόζουμε μονόπλευρη t-test για να δούμε αν ο μεγαλύτερος ΜΟ έχει και την τάση να είναι μεγαλύτερος.



Εικόνα 1 Πρότυπη καμπύλη πειράματος με βάση την εξίσωση,  $\psi = \alpha x + \beta$

## Elisa Plate



Εικόνα 2 Το αποτέλεσμα των αντιδράσεων, λίγο πριν την μέτρηση των απορροφήσεων.

### 2.3.Ερωτηματολόγια

#### Questionario Talassemia/Sardegna

Potete scegliere più di una opzione, se volete.

**Numero Paziente:**

**Prima della**

**Trasfusione / Dopo la Trasfusione**

**Stato ematologico:**

**Emoglobina**

**Bilirubina**

**Acido Urico**

**Ferritina**

**Albumina**

**Emolisi SI/NO**

**1. Eta':**

**2. Tipo di Lavoro:**

**3. Tipo di Talassemia:**

$\alpha$ -talassemia

$\beta$ -talassemia

Altro Tipo

Minore

Intermedio

Maggiore

**4. Quante volte in un mese fate trasfusioni di Sangue?**

**5. Stato di Famiglia**

Celibe/Nubile

Coniugato

Coniugato con figli

**6. Fumatore: SI/NO**

**7. Quali Farmaci chelanti usate?**

**8. Uso Integratori Dietetici? SI/NO se SI quali**

**9. Patologie Croniche SI/NO** (Per es. Diabete/Carenza(Favismo)G6pd/Artrite reumatoide/ Colesterolo/Altro)

**10. Avete subito un intervento chirurgico? SI/NO****11. Farmaci Antidolorifici: Nimesulide/Aspirina/Tachipirina/Moment/Voltaren****12. Carne/Pesce - Quante volte mangiate in una settimana** Mai 1 2 3 4 5**13. Tipo di Pesce e tipo di Carne maggiormente consumato:****14. Come cucinate i cibi?** Bolliti/A Vapore /Al Forno /Barbecue /Fritti/ Forno a microonde**15. I tuoi prodotti sono:**

	1	2	3	4	5	
Conservati	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Freschi
Select a value from a range from 1,Pastorizzati, to 5,Freschi,.						

**16. I succhi che bevete:**

	1	2	3	4	5	
Pastorizzati	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Freschi
Select a value from a range from 1,Pastorizzati, to 5,Freschi.						

**17. Tipi di verdura e Frutta consumati e quanto spesso?****18. Tipi di prodotti consumati fuori pasto?**

	Ogni giorno	3-4 volte a settimana	1-2 volte a settimana	Raramente	Mai
Miele	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Cioccolato	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Cereali	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Biscotti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Prodotti integrali	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

**19. Che bevande consumate?**

	Ogni Giorno	3-4 volte a settimana	1-2 volte a settimana	Raramente	Mai
Caffe' greco	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Caffe' espresso	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
The/ che tipo?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Bibite	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Cioccolata	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>



19. Che bevande consumate?	Ogni Giorno	3-4 volte a settimana	1-2 volte a settimana	Raramente	Mai
Caffè solubile/Frappe'	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

20. Che tipo di alcolici consumate e quanto spesso in una settimana?	Ogni Giorno	3-4 volte a settimana	1-2 volte a settimana	Raramente	Mai
Vino (Bianco,Rosso,Rose)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Birra	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Mirto/Ouzo/Raki/Tsipouro (Cerchiare)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Vodka/Wisky (Cerchiare)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

21. Che tipo di olio usate? (olio d'oliva/olio di girasole/olio di arachidi/altro)  
 22. Quanto spesso consumate i prodotti ?

	Ogni giorno	Giorni Alterni	2-3 volte a settimana	1-2 volte a settimana	Quasi Raramente)	Mai( Mai)
Garofano	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Origano	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Cannella	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Zenzero	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Noccioline	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Basilico	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Cioccolato	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Curry	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Paprika	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Chili	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Pepe Nero	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Lamponi	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Spinaci	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Carciofi	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Prugna	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Soia	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Arancia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Ερωτηματολόγιο Θαλασσαιμία/Ελλάδα Μπορείτε να επιλέξετε παραπάνω απο μια επιλογή, αν θέλετε.

Νούμερο ασθενή: **Πριν την μετάγγιση/ Μετά την μετάγγιση**

Αιμόλυση Ναι /Οχι

Αιμοσφαιρίνη Χολερυθρίνη Ουρικό Οξύ Φεριτίνη Ο.Πρωτεΐνες Κρεατινίνη

1.Ηλικία: 2.Εργασία: 3. Τύπος Θαλασσαιμίας: 4. Πόσες φορές το μήνα κάνετε μεταγγίσεις αίματος;

5. Οικογενειακή κατάσταση: 6. Κάπνισμα: ΝΑΙ/ΟΧΙ

7. Φάρμακο αποσιδήρωσης: 8. Συμπληρώματα Διατροφής:

9. Χρόνιες παθήσεις; ΝΑΙ / ΟΧΙ(π.χ. Διαβήτης, έλλειψη G6pd, ρευματοειδή αρθρίτιδα, χοληστερόλη, άλλο)

10. Έχετε υποβληθεί σε χειρουργική επέμβαση;

11. Πανσίοπνα: Mesulid/ Ασπιρίνη/Depon

12. Κρέας / Ψάρι – Πόση ποσότητα καταναλώνετε σε μια εβδομάδα;

13. Τύπος κρέατος μια ψαριού που καταναλώνετε συνήθως?

14. Πώς μαγειρεύετε ; Βρασμένα/ στον ατμό/ στο φούρνο/ μπάμπεκιου/ τηγανιτά

15.Τα προϊόντα σας είναι: Φρέσκα / Κονσερβοποιημένα

16.16. Οι χυμοί που πίνετε είναι: Φρέσκοι / Τυποποιημένοι

17. Ποια φρούτα και λαχανικά καταναλώνετε και πόσο συχνά;

18. Τύποι των προϊόντων που καταναλώνονται ανάμεσα στα γεύματα

Κάθε μέρα 3-4 φορές τη βδομάδα 1-2 φορές τη βδομάδα Σπάνια Ποτέ

Μέλι	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Σοκολάτα	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Δημητριακά	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Μπισκότα	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Προϊόντα ολικής αλέσεως	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

19.Ποια ποτά καταναλώνετε?

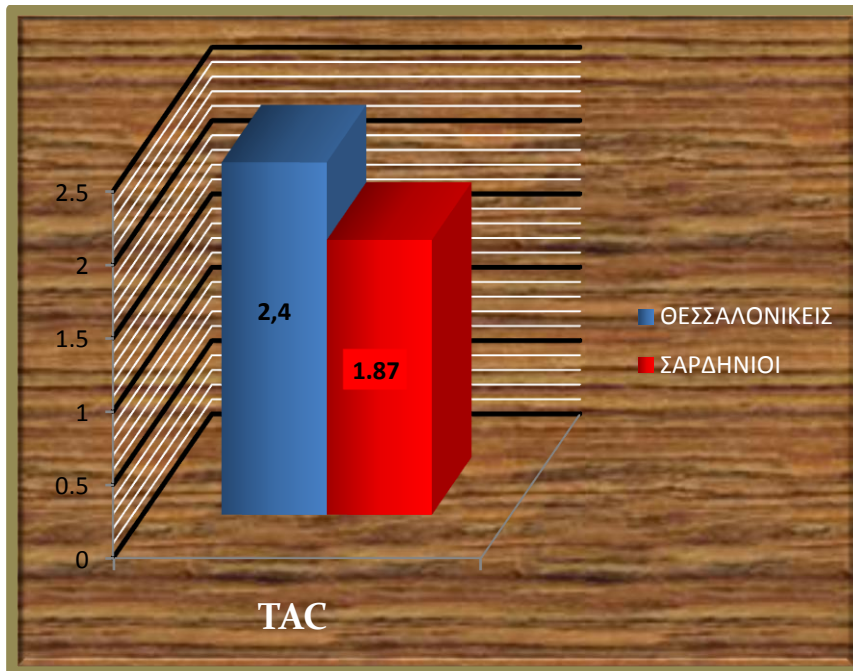
Κάθε μέρα 3-4 φορές τη βδομάδα 1-2 φορές τη βδομάδα Σπάνια Ποτέ

Ελληνικό καφέ	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
---------------	----------------------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------



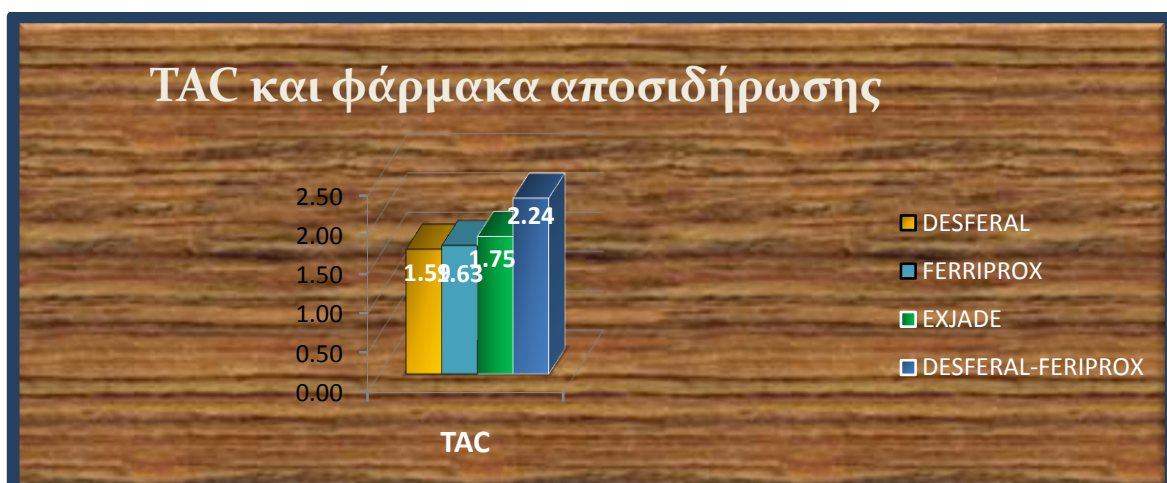
Σπανάκι							
Αγκινάρες	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Δαμάσκηνα	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Χ.Πορτοκάλι	<input type="radio"/>						

## 2.4.Αποτελέσματα



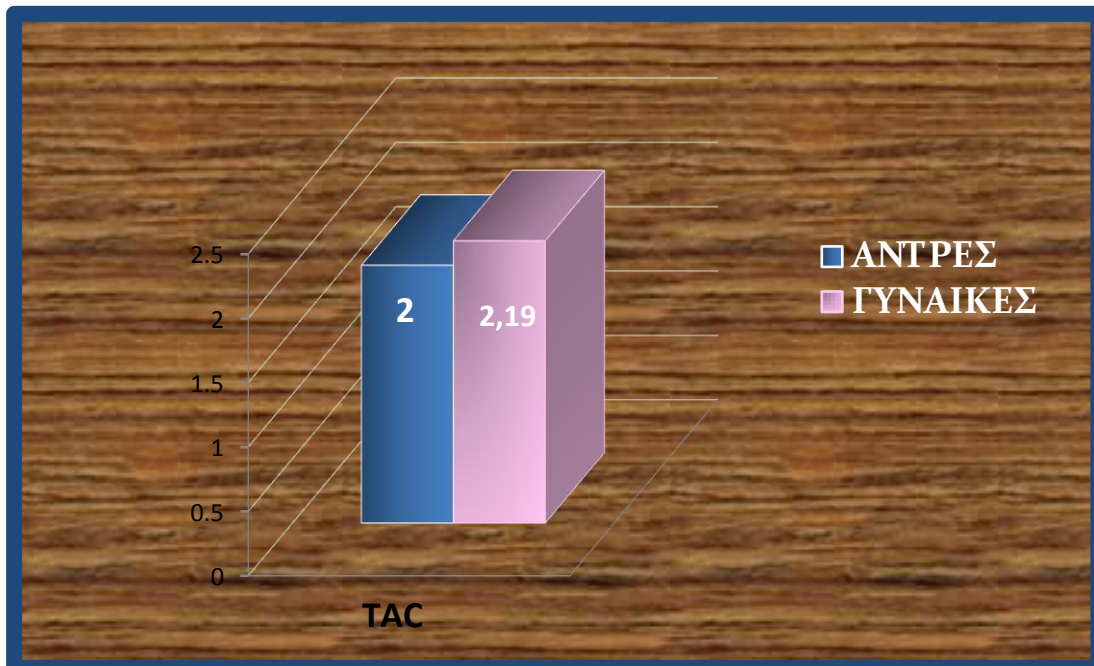
Γράφημα 1

Συγκεντρωτικό Γράφημα ολικής αντιοξειδωτικής κατάστασης μεταξύ Σαρδηνίων και Θεσσαλονικιών. Το  $p$ -value είναι  $0,00000312 < 0,05$ , γεγονός που κρίνει το αποτέλεσμα στατιστικά σημαντικό και αποδεικνύει την τάση αύξησης TAC των Θεσσαλονικιών και σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων.



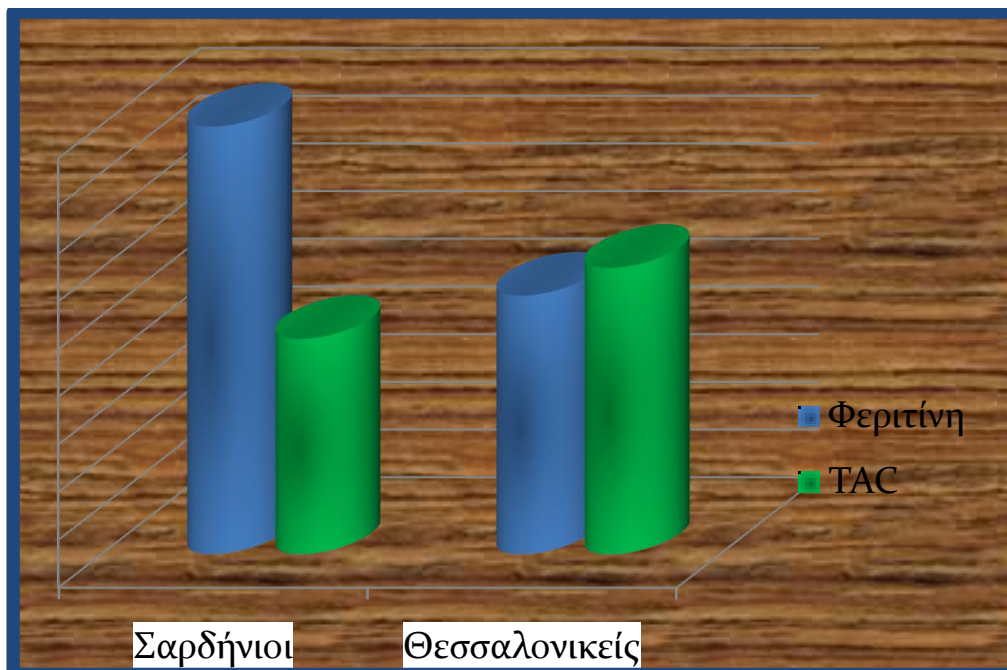
Γράφημα 2

Σύγκριση ολικής αντιοξειδωτικής κατάστασης με βάση την αγωγή αποσιδήρωσης που ακολουθούν οι Θαλασσαιμικοί. Το p-value είναι  $0,008895 < 0,05$ , γεγονός που αποδεικνύει ότι είναι στατιστικά σημαντικό.



Γράφημα 3

Συγκεντρωτική σύγκριση ολικής αντιοξειδωτικής κατάστασης με βάση το φύλο. Το p-value είναι  $0,093 > 0,05$ , άρα και στατιστικά μη σημαντικό, δεν υπάρχει διαφορά στην αντιοξειδωτική κατάσταση μεταξύ αντρών και γυναικών.



Γράφημα 4

Σύγκριση ολικής αντιοξειδωτικής κατάστασης Σαρδηνίων και Θεσσαλονικιών με την Φερριτίνη. Το p-value είναι  $0,00084 < 0,05$ .



Γράφημα 5

Σύγκριση ολικής αντιοξειδωτικής κατάστασης με την Χολερυθρίνη. Ομπλε σφαίρες απεικονίζουν το TAC ενώ οι πορτοκαλί την Χολερυθρίνη.

## 2.5. Συμπεράσματα

Από την παρούσα έρευνα προκύπτει ότι η ολική αντιοξειδωτική κατάσταση των Θεσσαλονικιών είναι υψηλότερη από των Σαρδηνίων, από αυτό το συμπέρασμα προκύπτουν πολλά νέα αναπάντητα ερωτήματα γύρω από τους παράγοντες που καθόρισαν το αποτέλεσμα αυτό. Στο σύνολο τους οι Σαρδηνίοι λόγω μειωμένων αντιοξειδωτικών έχουν υψηλότερο οξειδωτικό στρες σε σύγκριση με τους Θεσσαλονικιούς. Μάλιστα αν υπολογιστεί και η χολερυθρίνη των θαλασσαιμικών με βάση τον αριθμό της αντιοξειδωτικής κατάστασης τότε η διαφορά τους είναι πολύ μεγαλύτερη μιας που οι τιμές χολερυθρίνης των Σαρδηνίων είναι πολύ πιο υψηλές από ότι των Θεσσαλονικιών.

Ενδιαφέρον συμπέρασμα είναι ότι όσοι ασθενείς που έκαναν χρήση Desferal-Feripproχείχαν πολύ πιο αυξημένη ολική αντιοξειδωτική κατάσταση από τους υπόλοιπους που χρησιμοποιούν διαφορετική αγωγή αποσιδήρωσης. Άρα μπορεί η χρήση συνδυασμού αυτής της αγωγής να μην μειώνει τα αντιοξειδωτικά όσο οι άλλοι και έτσι να είναι πιο μειωμένο το οξειδωτικό στρες σε αυτούς τους θαλασσαιμικούς.

Παράλληλα η διαφορά μεταξύ αντρών και γυναικών δεν είναι σημαντική, εμφανίζουν κοινή αντιοξειδωτική κατάσταση στο σύνολο και των δύο χωρών. Επίσης καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι οι Θεσσαλονικείς θαλασσαιμικοί έχουν χαμηλή φεριτίνη και ίσως είναι ένας παράγοντας που ευνοεί τα αντιοξειδωτικά μιας και οι Σαρδηνίοι έχουν πολύ αυξημένη φεριτίνη σε σύγκριση με τους Θεσσαλονικιούς.

Παρατηρείται επίσης ότι η η χολερυθρίνη των Σαρδηνίων είναι πολύ πιο αυξημένη, σε αντίθεση με των Θεσσαλονικιών που είναι πολύ πιο χαμηλή. Συμπεραίνουμε ότι η ολική αντιοξειδωτική κατάσταση των Σαρδηνίων είναι ακόμα πιο χαμηλή καθώς η μέτρηση μας επηρεάζεται από την ύπαρξη της χολερυθρίνης. Καθώς επίσης και το ουρικό οξύ των Σαρδηνίων είναι πολύ πιο αυξημένο από των Θεσσαλονικιών, γεγονός που θα αποτελέσει στοιχείο συνέχισης της έρευνας και κατα πόσο επιρεάστηκε το TAC από αυτό.

*Ενκατακλείδι τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής θα σταλούν και θα συγκριθούν με αυτά της DrShedigeh από το Πανεπιστήμιο του Ιράν και θα προσθέσουν νέα δεδομένα στην έρευνα γύρω από τα αντιοξειδωτικά σε διάφορες γεωγραφικές περιοχές του κόσμου. Παράλληλα προκύπτουν αναπάντητα ερωτήματα σχετικά με την αντιοξειδωτική κατάσταση των Σαρδηνίων γενικότερα χωρίς Θαλασσαιμία και το οξειδωτικό στρες σε αυτούς. Η έρευνα συνεχίζεται και τα*

ερωτηματολόγια τα οποία αναμένεται να απαντηθούν θα είναι σε θέση να δώσουν μια πιο ολοκληρωμένη άποψη σχετικά με την διατροφή των δύο λαών.

### **ΚΕΦ.3<sup>ο</sup>: ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΜΕ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣBAND 3**

Η υπευθινή μου Antonella Pantaleo στο Πανεπιστήμιο του Sassari, όπου έκανα την πρακτική μου άσκηση, προσδιορίζει την ύπαρξη οξειδωτικού στρες (εικόνα 1) σε ασθενείς με αιμοσφαιρινοπάθειες ανιχνεύοντας την πρωτεΐνη Μπάντα 3. Δεχόμενος λοιπόν αυτό το ερέθισμα πήρα δείγμα από τον εαυτό μου/ ετερόζυγος β-θαλασσαιμία και από μια β-ομόζυγη θαλασσαιμικό ώστε να δοκιμάσω και την τεχνική αυτή. (και από έναν χωρίς θαλασσαιμία για Control). Η μέθοδος παρατίθεται παρακάτω,ενώ τα αποτελέσματα με μια δοκιμή δεν μπορούν να θεωρηθούν ακόμα αξιόπιστα.

#### **3.1.Υλικά και μέθοδος**

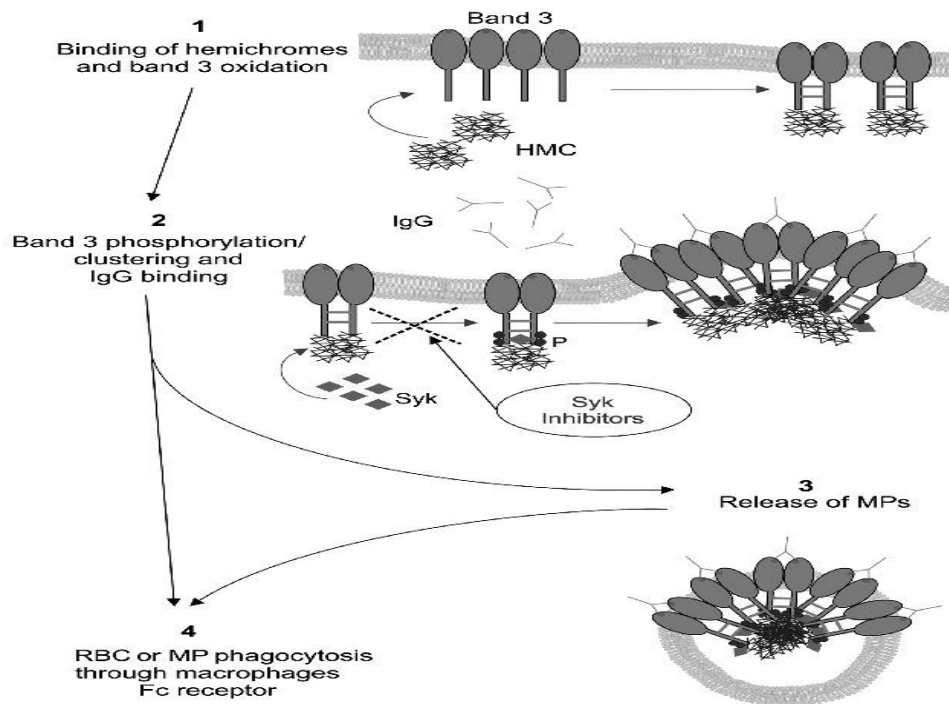
##### **3.1.1. Υλικά**

*Ghost:* Πρόκειται για την κυτταρική μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων η οποία απομονώνεται από το ολικό αίμα με βάση το παρακάτω πρωτόκολλο. Δείγματα ολικού αίματος 3.

*Gel Πολυακρυλαμίδης:* Ακολουθεί παρακάτω το πρωτόκολλο που ακολούθησα στο εργαστήριο Βιοχημείας στο Πανεπιστήμιο του Σάσσαρι, ώστε να εισάγω σε αυτό το Ghost και να προχωρήσω με την ηλεκτροφόρηση.



Αραίωση(Διαλυτοποίηση)Ghost για εισαγωγή στις οπές με βάση την παρακάτω θεωρία.



Εικόνα 1:Band 3 και η λειτουργία της κατά την δημιουργία οξειδωτικού στρες

### 3.1.1.1.ΠρωτόκολλοGhost

Ξεκινάμε με την παρασκευή **PBSGlucose 5 mM**

Συνολικός όγκος 200ml, αποτελούμενος από 180ml H<sub>2</sub>Oultrapureνερό, 20mlPBSTWIN 10Xκαι 0,198 γαπό Γλυκόζη (M.B 198,17 /1 M).



Εικόνα 2 Φυγοκεντημένο το ολικό αίμα μου

Δειγματοληψία αίματος και αποθήκευση του σε EDTA σωληνάριο, φυγοκέντρηση τουσε falcon 50ml και διαχωρισμός του από το υπερκείμενο, μεταφοράRBC σε νέο falconτων 15ml.

2,3 πλύσεις με το **PBSGlucose 5 mM** ( όμως πρώτα κράτησα

του υπερκείμενο για να το χρησιμοποιήσω στην μέτρηση ολικών αντιοξειδωτικών με ElisaReader)

Μετά τις 3 πλύσεις όπου κάθε φορά γίνεται φυγοκέντρηση του δείγματος στους 20°C για 10 λεπτά στους 2500 rpm. Έπειτα μεταφέρω τα RBC( ερυθρά αιμοσφαίρια)σε μικρότερο eppendorf.



Εικόνα 3 Κυτταρική μεμβράνη κατά την παρασκευή

Είμαστε έτοιμοι να προχωρήσουμε στο σημείο της διαδικασίας που γίνεται μέσα σε πάγο, προετοιμάζω 1,5ml eppendorf και το Ghost Buffer, το οποίο πρέπει να είναι φρέσκο.[ Περιέχει EDTA 1Mm, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5Mm και 2 αναστολείς φωσφατάσης) 1:1. Ξεκινάμε λοιπόν τις φυγοκεντρήσεις, 0-40C ,15000rpm. Έπειτα κρατάμε το ίζημα ,

και πετάμε το υπερκείμενο, μέχρι πλέον το ίζημα(πέλετ) να είναι διαφανο. Πάντα μέσα σε ξηρό πάγο η προσθήκη του Ghost Buffer και με πίεση (εκτόξευση, στα ερυθρά αιμοσφαίρια και ανάδευση με το χέρι). Τέλος αφού πλέον έχουμε έτοιμο το πέλετ και αφού αφαιρέσουμε και το τελευταίο υπερκείμενο, βάζουμε πρωτεάση. Στα 100μλ , 1μλ. Φυλάσσετε στους -200c για 30 ημέρες.



Εικόνα 4: Διαλυτοποίηση



Εικόνα 5: Ολοκληρωμένο



Εικόνα 6: Διαδικασία μέσα στον πάγο

### 3.1.1.2. Συνοπτική εικόνα

Παρασκευή Gel Πολυακρυλαμίδης για εισαγωγή του Ghost και ηλεκτροφόρηση.

Ηλεκτροφόρηση-

→WesternBlotting→BlockSolution→Πρωτογενές αντίσωμα/Overnight→Πλύσιμα (Washes) με PbsTwin , Δευτερογενές αντίσωμα→Πλύσεις (Washes) με PbsTwin→Σάρωση στο μηχάνημα Odyssey

### 3.1.2. ΜΕΘΟΔΟΣ

#### 3.1.2.1.SDS-page

Είναι η πιο αξιόπιστη μέθοδος για τον διαχωρισμό και ανάλυση πρωτεϊνικών δειγμάτων ενώ παράλληλα συνδυάζεται εύκολα και αποτελεσματικά με άλλες μεθόδους (π.χ. western blotting, IEF, mass spectrometry).

Οι πηκτές πολυακρυλαμίδης είναι χημικά αδρανή και διάφανες με πόρους που δημιουργούνται από τον πολυμερισμό των μονομερών ακρυλαμίδης με το αντιδραστήριο N,N'-methylenebisacrylamide. Το μίγμα (ακρυλαμίδης, Tris-HCl, SDS, APS, TEMED) χύνεται μέσα σε καλούπια και οι πηκτές μπορούν να είναι είτε κυλινδρικές (μέσα σε κυλινδρικούς γυάλινους σωλήνες) ή επίπεδες (ανάμεσα σε 2 επίπεδα γυαλιά με σφραγισμένα τα πλαϊνά άκρα τους) ενώ τα δείγματα τοποθετούνται σε οπές (wells) στο πάνω μέρος της πηκτής.

Γενικά,

στηνPAGEοι πηκτές μπορούν να κατασκευαστούν με σταθερή συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης και buffer (continuous buffers systems) ή με τη δημιουργία ενός 'συγκεντρωτικού' gel (stacking gel) ακριβώς πάνω από το 'αναλυτικό' gel (resolving gel) (discontinuous buffers systems). Το stacking gel έχει μικρότερη συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης και συνεπώς μεγαλύτερους πόρους από το resolving (ή separation ή running) gel, στο οποίο γίνεται και ο διαχωρισμός του δείγματος. Οι δυο αυτοί παράμετροι, δηλαδή η διαφορετική συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης και buffer επιτρέπει δείγματα με μεγάλους όγκους να συγκεντρωθούν στην πρώτη πηκτή (stacking gel) πριν εισέλθουν στη δεύτερη πηκτή όπου και θα διαχωριστούν. Αυτό βελτιώνει κατά πολύ την ανάλυση καθώς όλο το δείγμα ξεκινάει να αναλύεται από το ίδιο σημείο. Αντίθετα, τα συστήματα με σταθερή συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης και buffer επιβάλλουν τη συγκέντρωση του δείγματος σε πολύ μικρό όγκο.

Το 1970, ο Laemmli, εισήγαγε ένα σύστημα (Tris-glycine-SDS system) το οποίο χρησιμοποιείται περισσότερο στις μέρες μας. Στο σύστημα αυτό, το stacking gel έχει pH 6,8 και το δείγμα 'παγιδεύεται' ανάμεσα σε ιόντα Cl<sup>-</sup>, τα οποία προηγούνται, και μόρια γλυκίνης, τα οποία ακολουθούν, και έτσι το δείγμα σχηματίζει μια λεπτή μάντα (band), σύμφωνα με τις αρχές της ισοταχής ηλεκτροφόρησης. Αυτό συμβαίνει διότι η γλυκίνη είναι διπολικό ιόν σε αυτό το περιβάλλον, καθώς η τιμή pKa της γλυκίνης είναι αρκετά υψηλότερη από το pH του gel, και έτσι η κινητικότητα των μορίων της είναι πολύ χαμηλή. Τα ιόντα χλωρίου έχουν υψηλότερη κινητικότητα και προηγούνται αλλά δε μπορούν να απομακρυνθούν καθώς

αφήνουν πίσω τους θετικά ιόντα δημιουργώντας μια διαφορά δυναμικού κρατώντας τα σε κοντινή απόσταση. Έτσι σχηματίζεται μια ‘ζώνη’ μέσα στην οποία βρίσκεται ‘παγιδευμένο’ το δείγμα. Με λίγα λόγια, η κινητικότητα των μορίων εξαρτώνται αποκλειστικά από το καθαρό τους φορτίο και όχι από το μέγεθος τους διότι οι πόροι της πηκτής είναι αρκετά μεγάλοι. **Το φαινόμενο αυτό στηρίζεται στο λεγόμενο Kohlrausch.** Όταν η ‘ζώνη’ αυτή εισέλθει στο resolving gel, το οποίο έχει pH 8,8 και μικρότερους πόρους, η κινητικότητα του δείγματος μειώνεται και αυτή των μορίων της γλυκίνης αυξάνεται κατά πολύ, καθώς ιοντίζονται, και προσπερνάνε τα μόρια του δείγματος. Από το σημείο αυτό (σταθερό pH και δυναμικό) ξεκινάει ο διαχωρισμός των μορίων του δείγματος. Όλη η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης γίνεται μέσα σε buffer (Tris-Glycine-SDS) με pH περίπου 8,3.

Ένα άλλο πλεονέκτημα του συστήματος Laemmli, είναι η χρήση του sodium dodecyl sulfate (SDS). Το SDS είναι ένα ισχυρό ανιονικό απορρυπαντικό, το οποίο δεσμεύεται με τις πρωτεΐνες (1,4g ανά g πρωτεΐνης). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αποδιάταξη της τεταρτοταγούς και δευτεροταγούς δομής και την πρόσδεση αρνητικού φορτίου σε όλες τις πρωτεΐνες. Το τελευταίο εξαλείφει την επιρροή του φορτίου στην κινητικότητα και οι πρωτεΐνες κινούνται μόνο με βάση το M.B τους. Επίσης, γίνεται δυνατή η ανάλυση όλων των πρωτεϊνών του δείγματος καθώς τώρα θα κινηθούν όλες προς το ίδιο ηλεκτρόδιο (άνοδο) ενώ διαφορετικά οι πρωτεΐνες με ισοηλεκτρικά σημεία (pI) μεγαλύτερα του 6,8 θα μετακινούνταν προς την κάθοδο και θα χάνονταν.

### 3.2. Δοκιμή ανίχνευσης μεθαιμογλουβίνης με στήλη υγρής χρωματογραφίας

Στην εικόνα 1 παρατηρείται ότι στα σημεία ύπαρξης μπάντας 3 συσσωρεύεται μεγάλος αριθμός μεθαιμογλουβίνης. Δοκιμαστικά μετρήσαμε με αυτοσχέδια στήλη υγρής χρωματογραφίας τον αριθμό της. Τα αποτελέσματα είναι εντυπωσιακά. Χρησιμοποιήσαμε 3 διαφορετικά δείγματα: Α. ΧΩΡΙΣ ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΑ

Β. ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΑΙΜΙΚΟΣ

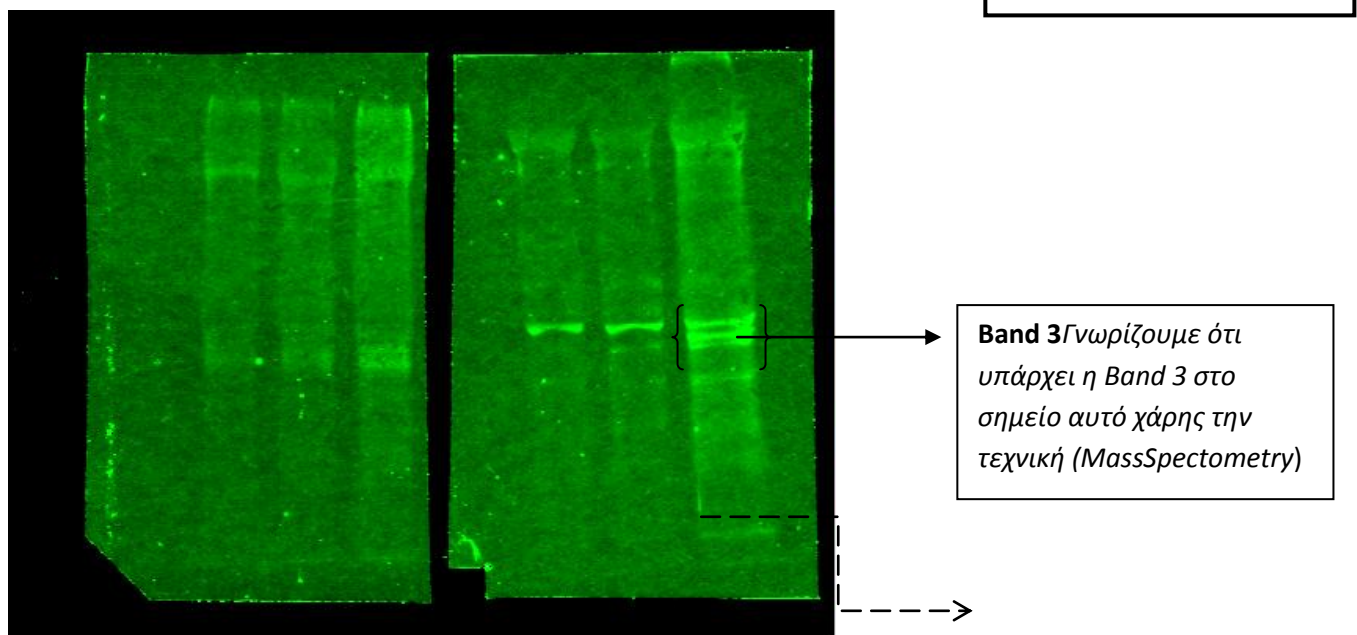
Γ. ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΚΟΣ

Όπως βλέπουμε στην εικόνα 2, αναμένεται μεγάλος αριθμός μεθαιμογλουβίνης στην τρίτη μπάντα λόγω αντίστοιχης ύπαρξης της πρωτεΐνης Band 3. Έτσι στα αποτελέσματα βλέπουμε

ξεκάθαρα μεγαλύτερη ποσότητα μεθαιμογλουβίνης στην τρίτη μπάντα, μέτρια στη δεύτερη και ανύπαρκτη στην πρώτη.

1C	2M	3T
0 nmoles/ml	0,7485 nmoles/ml	1,2166 nmoles/ml

### 3.2.1. Αποτελέσματα



Εικόνα 1 Αριστερά είναι οι τρεις Μπάντες χωρίς Β-μερκαπτεθανόλη ενώ δεξιά με την β-μερκαπτεθανόλη.

### 3.2.2. Συμπεράσματα

Η χρήση της τεχνικής αυτής ήταν μια πολύ σημαντική εμπειρία και για αυτό επέλεξα να την προσθέσω ως μια διαφορετική τεχνική η οποία στηρίζεται στην ανίχνευση της Band 3, βασικής πρωτεΐνης της κυτταρικής μεμβράνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Με βάση το

αποτέλεσμα του Western Blotting παρατηρείται περισσότερος φθορισμός στην Μπάντα της Francesca Solinas, της θαλασσαιμικού συγκριτικά με τις άλλες δύο μπάντες. Όπως βλέπουμε στην εικόνα 2.

Εν κατακλείδι θα χρειαστεί να χρησιμοποιήσω και άλλα δείγματα θαλασσαιμικών και φυσιολογικών με αυτή την μέθοδο για να βελτιώσω την τεχνική και να κατανοήσω καλύτερα την μεθοδολογία.

*Η έρευνα συνεχίζεται με τα δείγματα των ελλήνων θαλασσαιμικών...*

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. AmerJ, GoldfarbA, RachmilewitzEA, FibachE. (2008) "Fermentedpapayapreparation as redox regulator in blood cells of beta-thalassemic mice and patients". *Phytother Res.* 22(6), pp. 820-828
2. Awadallah S, Al Arrayed K, Bahareth E, Saeed Z. (2013). "Total antioxidant capacity and ischemia modified albumin in beta thalassemia". *Clin Lab.*, 59 (5-6), pp. 687-691
3. Biomedical Hypertexts. (1996). " Band 3: The Anion Exchanger". <http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/molecules/band3.html> (προσπελάστηκε 29/3/2014)
4. Carpino A, Tarantino P, Rago V, De Sanctis V, Siciliano L. (2004). "Antioxidant capacity in seminal plasma of transfusion-dependent beta-thalassemic patients". *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 112(3), pp. 131-134
5. Castoldi G, Liso V. (2007). "Malattie del sangue e degli organi ematopoietici", 5/ed. McGraw-Hill Companies
6. Cooley, T. B., and Lee, Pearl (1925). "A Series of Cases of Anemia with Splenomegaly and Peculiar Bone Changes". *Tr. Am. Pediat. Soc.*, 37(29)

7. De Franceschi L, Bertoldi M, Matte A, Santos Franco S, Pantaleo A, Ferru E, Turrini F. (2013). "Oxidative stress and  $\beta$ -thalassemic erythroid cells behind the molecular defect". *Oxid Med Cell Longev.*, Article ID 985210, pp. 1-10
8. Halvorsen BL, Carlsen MH, Phillips KM, Bøhn SK, Holte K, Jacobs DR Jr, Blomhoff R. (2006). "Content of redox-active compounds (ie, antioxidants) in foods consumed in the United States". *American Journal of Clinical Nutrition*, 84(1), pp. 95-135
9. Higgs DR, Engel JD, Stamatoyannopoulos G. (2012). "Thalassaemia". *Lancet*. 379(9813), pp. 373-383
10. Jenab M, Slimani N, Bictash M, Ferrari P, Bingham SA. (2009). "Biomarkers in nutritional epidemiology: applications, needs and new horizons". *Hum Genet.*, 125(5-6), pp. 507-525
11. Kyrri AR, Kalogerou E, Loizidou D, Ioannou C, Makariou C, Kythreotis L, Phylactides M, Kountouris P, Angastiniotis M, Modell B, Kleanthous M. (2013). "The changing epidemiology of  $\beta$ -thalassemia in the Greek-Cypriot population". *Hemoglobin*, 37(5), pp. 435-443
12. Livrea MA, Tesoriere L, Pintaudi AM, Calabrese A, Maggio A, Freisleben HJ, D'Arpa D, D'Anna R, Bongiorno A. (1996). "Oxidative stress and antioxidant status in beta-thalassemia major: iron overload and depletion of lipid-soluble antioxidants". *Blood*, 88(9), pp. 3608-3614.
13. Love NR1, Chen Y, Ishibashi S, Kritsiligkou P, Lea R, Koh Y, Gallop JL, Dorey K, Amaya E. (2013). "Amputation-induced reactive oxygen species are required for successful *Xenopus* tadpole tail regeneration". *Nat Cell Biol.*, 15(2), pp. 222-228.
14. Radak Z. (2000). "Free Radicals in aging and exercise", *Human Kinetics*
15. Sayin VII, Ibrahim MX, Larsson E, Nilsson JA, Lindahl P, Bergo MO. (2014). "Antioxidants accelerate lung cancer progression in mice". *Sci Transl Med*, 6(221):221ra15.
16. Thalassaemia Australia. "Βήτα ( $\beta$ ) θαλασσαιμία ".  
<http://www.mhcs.health.nsw.gov.au/publicationsandresources/pdf/publication-pdfs/diseases-and-conditions/9085/oth-9085-gre.pdf>. Thal Aust Inc. and Southern Health.
17. Thalassaemia Australia. "Άλφα ( $\alpha$ ) θαλασσαιμία". Thal Aust Inc. and Southern Health <http://www.mhcs.health.nsw.gov.au/publicationsandresources/pdf/publication-pdfs/thalassaemia/9075/oth-9075-gre.pdf>

18. Urso ML, Clarkson PM. (2003). "Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation". *Toxicology*, 189(1-2), pp. 41-54
19. Von Jaksch, R.(1989) "Ueber Leukämie und Leukocytose im Kindesalter". *Wien. Klin.*, 2(435)
20. Wikipedia, the free encyclopedia. (2004). "Methemoglobin"
21. Αντωνοπούλου Σ. (2011). "Η αξιολόγηση της διατροφικής κατάστασης με βάση βιοχημικούς δείκτες". *Πανελλήνιος Σύλλογος Διαιτολόγων Διατροφολόγων*, Τόμος 2 -Τεύχος 2, σελ. 1-98
22. Βαλαβανίδης Α. Π. (2006). "Ελεύθερες Ρίζες στην Οργανική Χημεία". Εκδόσεις Τμήματος Χημείας , Πανεπιστημίου Αθηνών
23. Διεθνή Ομοσπονδία Θαλασσαιμίας (ΔΟΘ), Ινστιτούτο Νευρολογίας και Γενετικής Κύπρου (ΙΝΓΚ). (2007). "Μαθαίνω για την α-Θαλασσαιμία".
24. Δωρίζα Ζ. (2011). "Αιμοσφαιρινοπάθειες". ΕΠΙΧΡΗΜΑΤΟΛΟΓΙΑ ΕΝΙΑΙΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΑΘΗΜΑΤΩΝ «ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ
25. Εθνικό Κέντρο Αιμοδοσίας (Ε.ΚΕ.Α.). "Λευκαφαιρεμένο Ολικό Αίμα". <http://med.ekea.gr/products-whole/minus-whole-blood/>
26. Λυμπεράκη Ε., Ελευθερίου Φ., Μήτκα Σ., Μαυροπούλου Γ., Πέτρου Χ. (2010). "Συσχέτιση επιπέδων αντιοξειδωτικών ουσιών στο αίμα και στα ούρα με την ηλικία". *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής*, 27(6), pp. 956-962
27. Μαΐλης Θ. (2011). "Δομή και λειτουργία της ανθρώπινης αιμοσφαιρίνης", σελ. 14-16. <http://eclass.uoa.gr/modules/document/document.php?course=BIOL199&download=/4c1148a79ao8.pdf>
28. Μελεσσανάκη Ο, Ζαμπαλού Σ, Μαρκάκης Γ. (2006). "ΒΙΟΜΑΘΗΜΑΤΙΚΑ (ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ)". ΑΤΕΙ Ηρακλείου, Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας.
29. Παπαδάκη Ε. Α, Τσαταλάς Κ. (2011). "Θαλασσαιμία: Νεώτερα μοριακά, κλινικά και θεραπευτικά δεδομένα". *ΑΙΜΑ*, Τόμος 2 - Τεύχος 3, σελ. 267- 280
30. ΠΝΕΥΜΩΝ. (2005). "Σημασία αντιοξειδωτικών ουσιών στον ορό, σε ασθενείς με σοβαρή παρόξυνση άσθματος ή εξωνοσοκομειακή πνευμονία". <http://www.pneumon.org/797/newsid844/119>
31. Σιδηροπούλου Δημακάκου Δ., Μαργαρίτης Δ., Κεδράκα Α. (2003). "Επαγγελματική ανάπτυξη των ατόμων με θαλασσαιμία". *Νέα Παιδεία*, τεύχος 107, σελ.160-179
32. Τσακίρη Λ. "Εισαγωγή στη Μεθοδολογία Έρευνας: Σημειώσεις". <http://dpms.csd.auth.gr/stuff/eis-meth-er.pdf>



*«Ό,τι είναι το αλάτι για το φαγητό, είναι και η ταπεινωση για την αρετή».*