



Γαστρεντερολογική Κλινική

Διδακτορική Διατριβή

Μελέτη των μηχανισμών αναιμίας με έμφαση στις
διαταραχές της ομοιόστασης του σιδήρου και της
ερυθροποίησης σε ασθενείς με Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις
Εντερικές Νόσους

Παντελεήμων Ι. Ουσταμανωλάκης

Ιατρός Γαστρεντερολόγος

Επιβλέποντες Καθηγητές

Ι. Κουτρομπάκης, *Επίκουρος Καθηγητής Γαστρεντερολογίας*

Η. Κουρούμαλης, *Καθηγητής Γαστρεντερολογίας*

Ε. Παπαδάκη, *Καθηγήτρια Αιματολογίας*

Ηράκλειο

2011

Στη μνήμη της μητέρας μου

Στην Κατερίνα και την κόρη μας, Κατερίνα-Ελένη

Πίνακας περιεχομένων

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Πρόλογος..... | 9 |
| Εισαγωγή..... | 13 |
| Μέρος 1 ^ο : Οι Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Εντερικές Νόσοι | 15 |
| 1. Ορισμός- Ιστορικά στοιχεία..... | 17 |
| 2.Επιδημιολογία..... | 21 |
| 3. Γενετική..... | 27 |
| 4. Παθογένεση..... | 35 |
| 1 <i>Η συμβιωτική χλωρίδα και τα εντερικά παθογόνα στην παθογένεση των ΙΦΕΝ.....</i> | <i>37</i> |
| 2 <i>Η αυτοπεψία, η αναγνώριση των μικροβίων, το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου και η λειτουργία του επιθηλίου στις ΙΦΕΝ.....</i> | <i>39</i> |
| 3 <i>Υποξία και μεταβολικοί παράγοντες που επηρεάζουν την παθογένεση των ΙΦΕΝ.....</i> | <i>40</i> |
| 4 <i>Οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες στην παθογένεση των ΙΦΕΝ.....</i> | <i>42</i> |
| 5 <i>Διαταραχή της ρύθμισης της ομοιόστασης και εντερική φλεγμονή στις ΙΦΕΝ.....</i> | <i>43</i> |
| 5. Φυσική ιστορία..... | 47 |
| 1 <i>Νόσος Crohn.....</i> | <i>49</i> |
| 2 <i>Ελκώδης Κολίτιδα.....</i> | <i>51</i> |
| 6. Ταξινόμηση..... | 53 |
| 7. Διαγνωστική προσέγγιση και διερεύνηση..... | 57 |
| 1 <i>Νόσος Crohn.....</i> | <i>59</i> |
| 2 <i>Ελκώδης Κολίτιδα.....</i> | <i>62</i> |
| 8. Θεραπευτική αντιμετώπιση..... | 67 |
| 1 <i>Νόσος Crohn.....</i> | <i>69</i> |

| | | |
|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 2 | <i>Ελκώδης Κολίτιδα.....</i> | <i>72</i> |
| 9. | Βιβλιογραφία..... | 77 |
| Μέρος 2^ο: | Η αναιμία στις Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Εντερικές Νόσους..... | 109 |
| 1. | Ορισμός, αιτιολογία, κλινικά χαρακτηριστικά..... | 111 |
| 2. | Επιδημιολογία..... | 117 |
| 3. | Παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί..... | 123 |
| 1 | <i>Εισαγωγή.....</i> | <i>125</i> |
| 2 | <i>Κύρια μονοπάτια ομοιόστασης του σιδήρου.....</i> | <i>127</i> |
| 3 | <i>Το πεπτίδιο-ορμόνη <i>Hercidin</i>.....</i> | <i>133</i> |
| 4 | <i>Ρύθμιση της ομοιόστασης του σιδήρου και ο ρόλος της <i>hercidin</i>.....</i> | <i>137</i> |
| 5. | <i>Παθοφυσιολογία της σιδηροπενίας.....</i> | <i>147</i> |
| 6. | <i>Ερυθροποίηση και ερυθροποιητίνη.....</i> | <i>149</i> |
| 7. | <i>Η επίδραση της φλεγμονής στην ομοιόσταση του σιδήρου και την ερυθροποίηση.....</i> | <i>155</i> |
| 4. | Διαγνωστική προσέγγιση..... | 163 |
| 1. | <i>Δείκτες σχετιζόμενοι με το προφίλ σιδήρου.....</i> | <i>165</i> |
| 2. | <i>Δείκτες ρυθμιστών μεταβολισμού του σιδήρου.....</i> | <i>175</i> |
| 3. | <i>Δείκτες ερυθροκυττάρων.....</i> | <i>179</i> |
| 4. | <i>Δείκτες δικτυοερυθροκυττάρων.....</i> | <i>183</i> |
| 5. | Θεραπευτική αντιμετώπιση..... | 189 |
| 1. | <i>Ενδείξεις έναρξης θεραπείας της αναιμίας στις ΙΦΕΝ.....</i> | <i>191</i> |
| 2. | <i>Στόχοι της θεραπείας της αναιμίας.....</i> | <i>193</i> |
| 3. | <i>Θεραπεία της σιδηροπενικής αναιμίας.....</i> | <i>195</i> |
| 4. | <i>Θεραπεία της ανεπαρκούς ερυθροποίησης.....</i> | <i>205</i> |
| 5. | <i>Άλλες θεραπευτικές προσεγγίσεις-Θεραπεία της αναιμίας χρόνιας νόσου.....</i> | <i>211</i> |
| 6. | Βιβλιογραφία..... | 213 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Μέρος 3ο: Κλινικές Μελέτες..... | 245 |
| 1.Ο ρόλος των συγκεντρώσεων στον ορό hepcidin και prohepcidin στους μηχανισμούς αναιμίας ασθενών με ΙΦΕΝ..... | 249 |
| 2.Ο ρόλος των δεικτών ερυθροκυττάρων και δικτυοερυθροκυττάρων στην αξιολόγηση της αναιμίας των ΙΦΕΝ..... | 271 |
| 3.Ο ρόλος του δείκτη «διαλυτός υποδοχέας τρανσφερρίνης-φερριτίνη» στην αξιολόγηση της αναιμίας στις ΙΦΕΝ: μελέτη περιπτώσεων-μαρτύρων..... | 287 |
| 4.Ασφάλεια και αποτελεσματικότητα της έγχυσης ολικής δόσης δεξτρανικού σιδήρου χαμηλού μοριακού βάρους για την αντιμετώπιση σιδηροπενικής αναιμίας σε ασθενείς με ΙΦΕΝ..... | 301 |
| Μέρος 4ο: Συμπλήρωμα..... | 313 |
| 1. Δημοσιεύσεις κλινικών μελετών..... | 315 |
| 2. Βιογραφικό σημείωμα συγγραφέα..... | 353 |
| 3. Περιλήψεις σε Ελληνική & Αγγλική γλώσσα..... | 373 |

Πρόλογος

Η χρονική στιγμή ολοκλήρωσης μίας διδακτορικής διατριβής αποτελεί μία διαδικασία κάθαρσης. Το τέλος της συγγραφής της εξαγνίζει φόβους, ανασφάλειες, ερωτήματα, αμφιβολίες που τη χαρακτήριζαν από τη στιγμή της σύλληψής της ως ιδέα για έρευνα. Όλη η διαδρομή εκπόνησης μίας διατριβής είναι εξαιρετικά ενδιαφέροντα. Ξεκινάει από μία ιδέα μέσα στο μυαλό μας, σταδιακά ωριμάζει και οργανώνεται, γίνεται χειροπιαστό πείραμα και μελέτη και καταλήγει σε κάποια συμπεράσματα. Το τέλος μίας διατριβής οριοθετεί το τέλος μίας διαδρομής προς ένα στόχο: την ανακάλυψη της επιστημονικής αλήθειας σε ένα συγκεκριμένο τομέα της επιστήμης. Η διαδρομή φαντάζει τεράστια, όμως όσο πλησιάζει το τέλος, νέες πόρτες ανοίγουν μπροστά μας για να μας προσγειώσουν και να μας κάνουν να συνειδητοποιήσουμε ότι τα μυστικά της επιστήμης δεν τελειώνουν ποτέ, όπως άλλωστε και το κυνήγι τους. Φτάνει το τέλος μίας διαδρομής αλλά όχι το τέλος του ταξιδιού στον υπέροχο κόσμο των μυστικών του ανθρώπινου σώματος και κατ' επέκταση της φύσης. Το ταξίδι συνεχίζεται με την πληθώρα εμπειριών και γνώσεων που αποκομίζει κανείς κατά την εκπόνηση μίας διατριβής, όντας πλουσιότερος πλέον, με περισσότερα εφόδια αλλά και περισσότερη εμπιστοσύνη στον εαυτό του και τις δυνάμεις του.

Μπορεί να φαντάζει στα μάτια μας ότι μία διδακτορική διατριβή ενέχει πολύ κόπο, χρόνο, δουλειά, χαρές, απογοητεύσεις και έντονες εναλλαγές στην ισορροπία μεταξύ επιτυχίας και αποτυχίας –και αυτό είναι αλήθεια- όμως εξ' αποστάσεως κρίνοντας, συνειδητοποιούμε ότι δεν προσθέσαμε παρά ένα μικροσκοπικό λιθαράκι στο οικοδόμημα που λέγεται επιστήμη. Το δικό μου λιθαράκι με βοήθησαν μερικοί άνθρωποι να το προσθέσω, συνάδελφοι, καθηγητές-δάσκαλοί μου, φίλοι και άλλοι, οι οποίοι ο καθένας με τον τρόπο του με καθοδήγησε και με βοήθησε στο δύσκολο αυτό έργο. Από τη θέση αυτή θα ήθελα να τους ευχαριστήσω και να τους εκφράσω ότι αποτέλεσε ιδιαίτερη τιμή και χαρά για μένα το ότι ήμουν αποδέκτης της καθοδήγησης και διδασκαλίας τους. Καταρχήν, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Γαστρεντερολογίας Ιωάννη Κουτρομπάκη, ένα δάσκαλο ο οποίος στάθηκε δίπλα μου καθόλη τη διάρκεια της διαδρομής αυτής, προσφέροντας απλόχερα καθοδήγηση, υποστήριξη, θεωρητικές και τεχνικές γνώσεις, βοήθεια στην επίλυση επιστημονικών και διαδικαστικών ζητημάτων αλλά και ψυχολογική υποστήριξη(!) πολλές φορές που ένιωθα απογοήτευση σχετικά με την πορεία των μελετών. Η πίστη του στο πρόσωπό μου και η συμβολή του ήταν καθοριστική στην ολοκλήρωση της διατριβής αυτής αλλά και στα εφόδια και γνώσεις που μου πρόσφερε κατά την περίοδο της ειδίκευσής μου,

δίδοντάς μου έτσι τη δυνατότητα να νιώθω σιγουριά για τις δυνάμεις μου και εμπιστοσύνη στον εαυτό μου. Οφείλω επίσης να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Γαστρεντερολογίας Ηλία Κουρούμαλη, έναν άνθρωπο που τον γνώρισα στα φοιτητικά μου χρόνια ως δάσκαλο και ήταν αυτός που με την προσωπικότητά του και τις γνώσεις του, με ενέπνευσε και με ώθησε να ακολουθήσω το δρόμο της Γαστρεντερολογίας, και αργότερα, στα χρόνια της ειδικότητας αποτέλεσε πολύτιμο καθοδηγητή και αξιόλογο συνεργάτη, αποτελώντας πρότυπο ολοκληρωμένου κλινικού ιατρού και ακαδημαϊκού δασκάλου. Η συμβολή του στη διατριβή ήταν πολύτιμη, με τις εύστοχες παρατηρήσεις και λεπτομερείς διορθώσεις του να αποτελούν υψηλή προστιθέμενη αξία για αυτή. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στην Καθηγήτρια Αιματολογίας Ελένη Παπαδάκη, η οποία με τις καίριες παρεμβάσεις της και τις πολύτιμες συμβουλές της αναφορικά με τις αιματολογικές πτυχές των μελετών, προσέφερε σημαντικότερη καθοδήγηση και εμπειρία στον επιτυχή σχεδιασμό των μελετών, στο κομμάτι των εργαστηριακών μετρήσεων και στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων υπό το πρίσμα του αιματολόγου. Ευχαριστώ επίσης όλους τους συνεργάτες-συναδέλφους που συμμετείχαν στις εργαστηριακές μελέτες, χωρίς τη βοήθεια των οποίων η ολοκλήρωση της διατριβής αυτής θα ήταν αδύνατη.

Το πιο μεγάλο ευχαριστώ το οφείλω όμως στους δύο πολυτιμότερους ανθρώπους στη ζωή μου: στη σύζυγό μου Κατερίνα, η οποία με τη συναισθηματική, ηθική, ψυχολογική αλλά και πρακτική υποστήριξη που μου προσέφερε, αλλά και την απεριόριστη υπομονή που επέδειξε στο διάστημα εκπόνησης της διατριβής αυτής, αποτέλεσε για μένα πραγματικό σύμμαχο και στήριγμα· και στην κόρη μου Κατερίνα-Ελένη, της οποίας τα χάδια και τα παιχνίδια, ήταν για μένα πολύτιμη πηγή άντλησης δύναμης και χαράς, αλλά και μία ευχάριστη νότα αθωότητας και αισιοδοξίας μέσα στη μονοτονία και ομοιομορφία της επιστημονικής ενασχόλησης. Τους αφιερώνω το έργο αυτό με πολλή εκτίμηση και αγάπη. Όπως το αφιερώνω και στη μνήμη της μητέρας μου, η οποία είμαι σίγουρος ότι θα ήταν πολύ υπερήφανη για την ολοκλήρωσή του.

Τέλος, δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω από καρδιάς τον πατέρα μου και τη γυναίκα-δεύτερη μητέρα που με μεγάλωσε, Αναστασία, οι οποίοι μου ενέπνευσαν την αγάπη για την επιστήμη και τη γνώση, με καθοδήγησαν και με στήριξαν όλα τα προηγούμενα χρόνια. Σε αυτούς οφείλω σε μεγάλο βαθμό αυτά που έχω καταφέρει μέχρι σήμερα ως άνθρωπος και ως επιστήμονας. Να είναι πάντα καλά.

Η διατριβή αυτή τελείωσε. Το ταξίδι της γνώσης όμως συνεχίζεται χωρίς να τελειώνει ποτέ. Εύχομαι το έργο αυτό να αποτελέσει ένα κομβικό σημείο σε μία επιτυχημένη επαγγελματική και επιστημονική σταδιοδρομία, με γνώμονα πάντα την αμέριστη προσφορά στον πάσχοντα συνάνθρωπο, με ήθος και επαγγελματισμό.

Παντελής Ουσταμανωλάκης

Αύγουστος 2011

Εισαγωγή

Tο έργο αυτό πραγματεύεται το θέμα της αναιμίας που συνοδεύει τις ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις εντερικές νόσους (ΙΦΕΝ), τη συχνότερη μάλλον εξωεντερική εκδήλωση των νοσημάτων αυτών. Η αναιμία των ΙΦΕΝ μέχρι προ μίας δεκαετίας ήταν μία παράμετρος απολύτως παραγνωρισμένη και υποβαθμισμένη και θεωρούνταν ως ένα φυσικό επακόλουθο της νόσου, για το οποίο δε μπορούσε κανείς να προσφέρει σημαντική βοήθεια, λόγω ύπαρξης μεγάλων κενών στη γνώση των παθοφυσιολογικών μηχανισμών της αλλά και μη συνειδητοποίησης της σημαντικής επίδρασης που έχει στην ποιότητα ζωής τέτοιων ασθενών. Κατά την προηγούμενη δεκαετία, η συμβολή ερευνητικών ομάδων, κυρίως από την Αυστρία και τη Γερμανία αλλά και από άλλες χώρες όπως και η Ελλάδα, υπήρξε καθοριστική στην ανάδειξη του προβλήματος και στην αποσαφήνιση των παθοφυσιολογικών μηχανισμών της αναιμίας των ΙΦΕΝ. Έκτοτε, έχει κυλήσει πολύ νερό στο αυλάκι και η αναιμία έχει εξελιχθεί σε μείζον ερευνητικό πεδίο στο χώρο των ΙΦΕΝ, με πολύ υψηλούς ρυθμούς παραγωγής γνώσης, τόσο όσον αφορά τη διάγνωση, όσο και τη θεραπεία της. Υπάρχουν πλέον διαγνωστικά εργαλεία στη φαρέτρα μας, που μας βοηθούν στη διαφορική διάγνωση μεταξύ σιδηροπενικής αναιμίας και αναιμίας χρόνιας νόσου, αλλά και θεραπευτικά εργαλεία που στοχεύουν στη θεραπεία της αναιμίας της φλεγμονής, προχωρώντας ένα βήμα πέρα από τη συμβατική θεραπεία υποκατάστασης της σιδηροπενίας. Η εξερεύνηση των παθοφυσιολογικών μηχανισμών της αναιμίας των ΙΦΕΝ έχει προχωρήσει σε σημαντικό βαθμό, ανακαλύπτοντας νέους παράγοντες (όπως η hepcidin) με ενεργό ρόλο στην παθογένεσή της και πιθανό ρόλο ως θεραπευτικού στόχου στο-όχι και τόσο μακρινό- μέλλον.

Το πόνημα που ακολουθεί φιλοξενεί στο πρώτο μέρος μία εκτενή και ενημερωμένη ανάλυση των ΙΦΕΝ, από την επιδημιολογία μέχρι την αντιμετώπισή τους, ενώ το δεύτερο μέρος παρουσιάζει τα εδραιωμένα αλλά και νεότερα δεδομένα που υπάρχουν στο θέμα της αναιμίας των νόσων αυτών. Το τμήμα αυτό ξεκινάει από τον ορισμό και καταλήγει στα τελευταία δεδομένα θεραπευτικών δυνατοτήτων που έχουμε στον τομέα αυτό. Τέλος, στο τρίτο μέρος παρουσιάζονται οι κλινικές μελέτες που διενεργήθηκαν στα πλαίσια της διατριβής αυτής.

Ελπίζω το έργο αυτό να συμβάλλει έστω και στο ελάχιστο στην κατανόηση των μηχανισμών διαταραχής της ομοιόστασης του σιδήρου και της ερυθροποίησης σε ασθενείς με ΙΦΕΝ. Τότε, ο στόχος αυτής της διατριβής θα έχει επιτευχθεί.

Καλή ανάγνωση.

Παντελής Ουσταμανωλάκης

Αύγουστος 2011

ΟΙ ΙΔΙΟΠΑΘΕΙΣ
ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ
ΕΝΤΕΡΙΚΕΣ ΝΟΣΟΙ

Μέρος 1ο



Οι Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Εντερικές Νόσοι

Μέρος 1ο

Κεφάλαιο 1: Ορισμός-Ιστορικά στοιχεία

Οι Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Εντερικές Νόσοι (ΙΦΕΝ) είναι μία ομάδα νοσημάτων που χαρακτηρίζονται από χρόνια, υποτροπιάζουσα καταστροφική φλεγμονή του γαστρεντερικού σωλήνα (ΓΕΣ). Εκδηλώνονται με μία ποικιλία συμπτωμάτων όπως χρόνια ή υποτροπιάζουσα διάρροια, συχνά με πρόσμιξη αίματος, κοιλιακό άλγος, πυρετό και αναιμία. Επιπροσθέτως, όχι σπάνια η συμπτωματολογία συνοδεύεται και από διάφορες εξωεντερικές εκδηλώσεις από το δέρμα (γαγγραινώδες πυόδερμα, οζώδες ερύθημα), τις αρθρώσεις (αρθραλγία, περιφερική αρθρίτιδα, σπονδυλίτιδα) ή τους οφθαλμούς (ιριδοκυκλίτιδα, ραγοειδίτιδα). Οι ΙΦΕΝ διακρίνονται σε δύο κύριες μορφές νόσου: τη Νόσο Crohn (NC) και την Ελκώδη Κολίτιδα (ΕΚ). Άλλες υποκατηγορίες περιλαμβάνουν την αδιευκρίνιστη κολίτιδα και τη μικροσκοπική (κολλαγονική) κολίτιδα. Συχνά οι ΙΦΕΝ συσχετίζονται με άλλα χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα όπως η ψωρίαση, η πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα (ΠΣΧ) και η αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα.

Οι πρώτες περιπτώσεις ΕΚ περιγράφηκαν κατά τη διάρκεια του 19^{ου} αιώνα. Έως το 1907, 317 ασθενείς με φλεγμονώδη και ελκωτική νόσο του παχέος εντέρου (ΠΕ) είχαν εισαχθεί σε διάφορα νοσοκομεία της Αγγλίας. Κατά τα πρώτα χρόνια του 20^{ου} αιώνα, υπήρξαν αυξανόμενες αναφορές περί ΕΚ από τη Γαλλία, τη Γερμανία και την Ιταλία, ενώ το 1913 η ΕΚ ήταν πλέον ανάμεσα στα κύρια θέματα του Ιατρικού Συνεδρίου του Παρισιού. Η ΕΚ εκδηλώνεται οριοθετημένα στο ΠΕ ως μία χρόνια φλεγμονή συνεχούς μορφής. Μπορεί να προσβάλλει μόνο το ορθό (ορθίτις) ή το ορθό, σιγμοειδές και το κατιόν κόλον έως τη σπληνική καμπή (αριστερή κολίτις) ή ακόμη το ΠΕ εγγύτερα της σπληνικής καμπής (εκτεταμένη κολίτις). Η ενδοσκοπική εικόνα αναδεικνύει έναν εύθρυπτο και φλεγμονώδη βλεννογόνο με πολλαπλές εξελκώσεις και αιμορραγία. Τα ιστολογικά χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν φλεγμονώδη διήθηση του βλεννογόνου, με διαταραχή των κρυπτών και σχηματισμό κρυπτικών αποστημάτων.

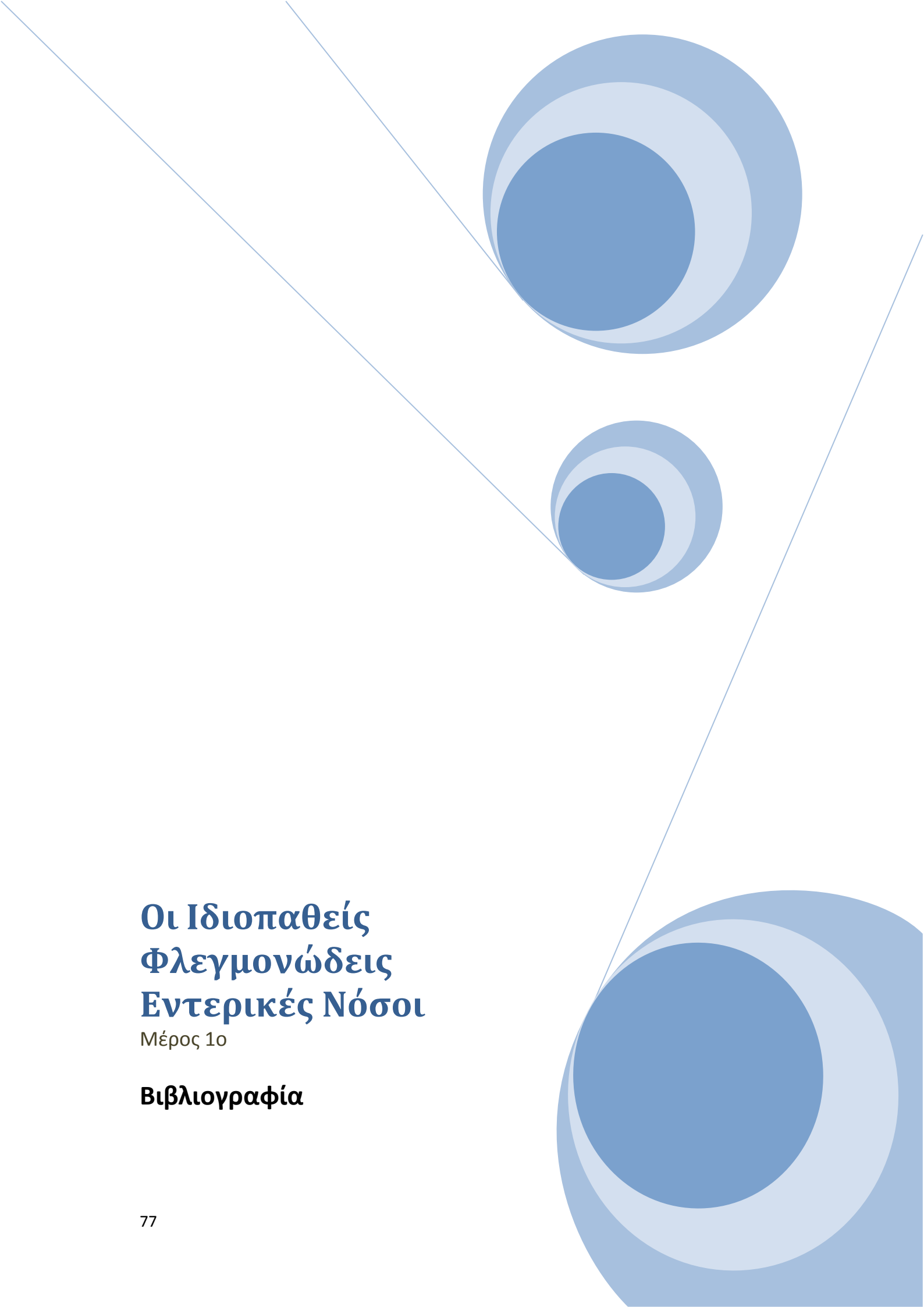
Η πρώτη περίπτωση NC αναφέρθηκε πιθανότατα το 1859 από τον Samuel Wilks¹. Περιέγραψε την περίπτωση μίας γυναίκας 42 ετών που απεβίωσε μετά από πολλούς μήνες διάρροιας και πυρετού. Η νεκροτομή αποκάλυψε μία διατοιχωματική ελκωτική φλεγμονή του ΠΕ και του τελικού ειλεού. Το 1913, ο Dalziel ανακοίνωσε την ύπαρξη μίας χρόνιας διάμεσης εντερίτιδας², που αρχικώς ονομάστηκε Νόσος Dalziel. Στις αρχές του 20^{ου} αιώνα, παρατηρήθηκε μία αυξανόμενη συχνότητα ασθενών, ιδίως νεαρών ενηλίκων, που παρουσιάζονταν με συμπτώματα που μιμούσαν τη σκωληκοειδίτιδα: κοιλιακές κράμπες, εμπύρετο, διάρροια, απώλεια βάρους. Τον καιρό εκείνο, η νόσος αναφερόταν ως «τελική ειλεΐτις». Ο όρος «Νόσος Crohn»

χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά τα πρώτα χρόνια της δεκαετίας του 1930³. Στις μέρες μας, είναι πλέον γνωστό ότι η NC μπορεί να προσβάλλει οποιοδήποτε τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα. Η τυπική τελική ειλεΐτις συνδυάζεται συχνά με προσβολή του ΠΕ, ενίοτε με διατήρηση ενδιάμεσων περιοχών με φυσιολογικό βλεννογόνο. Η φλεγμονώδης διεργασία προσβάλλει όλα τα στρώματα του εντερικού τοιχώματος, μπορεί να δημιουργήσει βαθιά έλκη και να οδηγήσει στο σχηματισμό συριγγίων και στην εμφάνιση αποφρακτικών φαινομένων στον εντερικό αυλό.

Σε ποσοστό περίπου 5% των ασθενών με ΙΦΕΝ, με νόσο στο ΠΕ, δεν είναι δυνατή η ταξινόμηση της νόσου με κλινικά, απεικονιστικά, ενδοσκοπικά και ιστοπαθολογικά κριτήρια, καθώς αυτή εμφανίζει χαρακτηριστικά τόσο NC όσο και ΕΚ. Ο τύπος αυτός χαρακτηρίζεται ως «αταξινόμητη ΙΦΕΝ». Ο όρος «απροσδιόριστη κολίτις» θα πρέπει να χρησιμοποιείται στις περιπτώσεις όπου έχει διενεργηθεί κολεκτομή και ο παθολογοανατόμος δε δύναται να ταξινομήσει τη νόσο, μετά από ενδελεχή εξέταση όλου του εγχειρητικού παρασκευάσματος⁴.



Burrill B. Crohn (1884–1983)



Οι Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Εντερικές Νόσοι

Μέρος 1ο

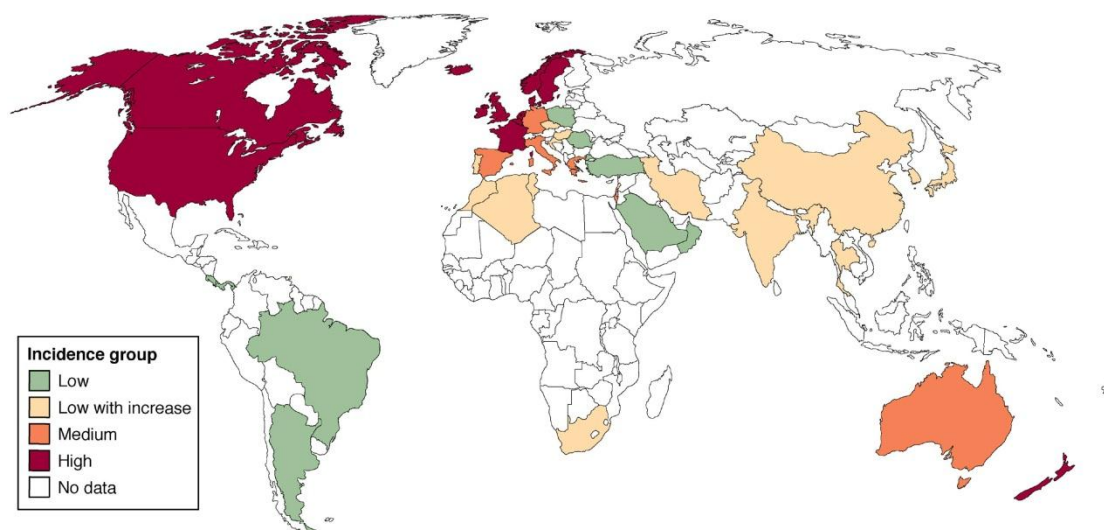
Κεφάλαιο 2: Επιδημιολογία

Στο Δυτικό κόσμο, η επίπτωση και ο επιπολασμός των ΙΦΕΝ έχει αυξηθεί τα τελευταία 50 έτη, έως 8-14/100000/έτος και 120-200/100000 άτομα, αντίστοιχα, για την ΕΚ και έως 6-15/100000/έτος και 50-200/100000 άτομα, αντίστοιχα, για τη ΝC. Μελέτες σε πληθυσμούς μεταναστών και σε πληθυσμούς αναπτυσσόμενων χωρών έδειξαν μία πρόσφατη, αργή αύξηση στην επίπτωση της ΕΚ, καθώς αυτή της ΝC παρέμενε χαμηλή, αλλά τελικά η επίπτωση της ΝC αυξήθηκε στα επίπεδα της ΕΚ⁵.

Η υψηλότερη επίπτωση ΝC και ΕΚ έχει αναφερθεί στη Βόρεια Ευρώπη⁶, το Ηνωμένο Βασίλειο^{7,8} και τη Βόρεια Αμερική^{9,10}. Σε αυτές τις περιοχές, τέτοια υψηλά ποσοστά συχνότητας νόσου θα μπορούσαν να υποδηλώνουν κοινούς αιτιολογικούς παράγοντες. Η επίπτωση της ΕΚ είναι υψηλότερη από της ΝC, εκτός από τον Καναδά¹⁰⁻¹² και κάποιες περιοχές της Ευρώπης¹³⁻¹⁶, αν και αυτό φαίνεται να αλλάζει κατά την τελευταία 20ετία. Η κομητεία Canterbury στη Νέα Ζηλανδία έχει από τα υψηλότερα ποσοστά επίπτωσης στη ΝC (16,5/100000/έτος)¹⁷. Οι ΙΦΕΝ έχουν αρχίσει να συναντώνται ολοένα και συχνότερα σε χώρες όπου παλαιότερα ανευρίσκονταν σπάνια, όπως η Νότια Κορέα, η Κίνα, η Ινδία, το Ιράν, ο Λίβανος, η Ταϊλάνδη και η Βόρεια Αφρική¹⁸⁻²⁰. Σε αυτές τις χώρες, η εμφάνιση της ΕΚ προηγούνταν της ΝC κατά περίπου 10 έτη. Σε μερικά κράτη, όπως η Ιαπωνία, η επίπτωση των ΙΦΕΝ ήταν αρχικά χαμηλή αλλά πρόσφατα παρουσιάζει αυξητικές τάσεις²¹. Η συνολική επίπτωση των ΙΦΕΝ μπορεί να διαχωριστεί σε διαφορετικές γεωγραφικές ζώνες: ζώνες υψηλής επίπτωσης, ζώνες ενδιάμεσης επίπτωσης, ζώνες χαμηλής επίπτωσης προ 15ετίας αλλά με αυξητική τάση και ζώνες άγνωστης επίπτωσης. (εικόνα 1, πίνακες 1 &2)

Τα δεδομένα σχετικά με τον επιπολασμό των ΙΦΕΝ είναι μάλλον σπάνια και πολύ σημαντικά. Υπολογισμός του λόγου «επιπολασμός/επίπτωση» είναι διαθέσιμος σε μερικές μόνο μελέτες και κυμαίνεται από 6,6 έως 23^{8,22}. Ο επιπολασμός της ΝC στη Βόρεια Αμερική κυμαίνεται μεταξύ 44 και 201/100000 και της ΕΚ μεταξύ 37,5 και 238/100000^{7,23}. Στην Ευρώπη, ο επιπολασμός της ΝC κυμαίνεται μεταξύ 8 και 214/100000 ενώ της ΕΚ από 21 έως 294/100000²⁴. Όταν τα δεδομένα αναχθούν στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό, υπολογίζεται ότι στην Ευρώπη, περίπου 1 εκατομμύριο άτομα πάσχουν από ΝC και 1,4 εκατομμύρια από ΕΚ. Ωστόσο, η αναγωγή των δεδομένων του επιπολασμού σε 490 εκατομμύρια Ευρωπαίων θα πρέπει να γίνεται με επιφύλαξη, εξαιτίας της μεγάλης γεωγραφικής ετερογένειας. Σε μία μελέτη από τις ΗΠΑ, που βασίστηκε σε ασφαλιστικά δεδομένα από 9 εκατομμύρια άτομα, ο επιπολασμός της ΝC

και της ΕΚ υπολογίσθηκε σε 201 και 238/100000, αντίστοιχα, οδηγώντας στην εκτίμηση ότι στις ΗΠΑ πάσχουν από ΙΦΕΝ περισσότερα από 1,3 εκατομμύρια άτομα²⁴.



Εικόνα 1. Ο Παγκόσμιος χάρτης των ΙΦΕΝ: το κόκκινο αντιστοιχεί σε ετήσια επίπτωση $>10/10^5$, το πορτοκαλί σε $5-10/10^5$, το πράσινο σε $<4/10^5$, το κίτρινο σε χαμηλή επίπτωση που βαίνει αυξανόμενη. Απουσία χρώματος αντιστοιχεί σε απουσία δεδομένων. (Πηγή: αναφορά 5)

Η ηλικία αιχμής για την εμφάνιση ΝΚ είναι τα 20-30 έτη, ενώ για την ΕΚ τα 30-40 έτη. Σε μερικές μελέτες αναφέρεται και μία δεύτερη περίοδος αιχμής στην ηλικία των 60-70 ετών, αλλά η παρατήρηση αυτή δεν έχει επιβεβαιωθεί. Η παιδιατρική νόσος αφορά το 7% με 20% του συνόλου των ΙΦΕΝ, με βάση δεδομένα από πληθυσμιακές μελέτες²⁵⁻²⁷. Πρόσφατα δεδομένα υποδεικνύουν υψηλότερα ποσοστά παιδιατρικής ΝΚ απ' ότι ΕΚ²⁸⁻³⁰. Σε πληθυσμούς μεταναστών, φαίνεται ότι ο κίνδυνος προσβολής από ΙΦΕΝ επηρεάζεται από την ηλικία μετανάστευσης: ο κίνδυνος νόσησης από ΙΦΕΝ είναι υψηλότερος σε παιδιά που μεταναστεύουν πριν την ηλικία των 15 ετών³¹. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η σκωληκοειδεκτομή πριν την ηλικία των 20 ετών φαίνεται να μειώνει τον κίνδυνο για ΕΚ.

Σχετικά με το φύλο, η ΕΚ εμφανίζεται ελαφρώς συχνότερα σε άνδρες (60%), ενώ η ΝΚ συχνότερα σε γυναίκες κατά 20-30%, ιδιαίτερα σε περιοχές υψηλού επιπολασμού^{10,14,17}, αν και η ΝΚ εμφανίζεται πιο συχνά σε άνδρες σε μερικές περιοχές χαμηλού επιπολασμού²². Η κατανομή της ΝΚ και της ΕΚ σε παιδιατρικούς

| Country | Dates of studies (references) | Incidence (/10 ⁵) | Prevalence (/10 ⁵) |
|------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Japan | 1974 ⁹⁹ | 0.08 | 5.8 |
| | 1991 ¹⁰⁰ | 0.5 | 21.2 |
| | 2005 ¹⁰¹ | | |
| South Korea | 1986–1990 ¹⁰² | 0.5 | 11.2 |
| | 2001–2005 ¹⁰² | 1.3 | |
| Romania | 2002–2003 ²⁷ | 0.5 | 8.3 |
| Croatia | 1980–1989 ¹⁰³ | 0.7 | |
| Zagreb | 2000–2004 ¹⁰⁴ | 7.0 | |
| Primorsko-Goranska | | | |
| Czech Republic | 1999 ¹⁰⁵ | 1.5 | |
| South Africa | 1980–1984 ¹⁰⁶ | 2.6 (White) | |
| | | 1.8 (Colored) | |
| | | 0.3 (Black) | |
| Spain | 1981–1988 ¹⁰⁷ | 1.6 | 19.8 |
| Navarra | 2001–2003 ¹⁰⁸ | 5.9 | |
| Northern Spain | 2000–2002 ³³ | 7.5 | |
| French West Indies | 1997–1999 ¹⁵ | 1.9 | |
| Hungary | 1977 ¹⁰⁹ | 0.4 | 52.9 |
| | 2001 ¹⁰⁹ | 4.7 | |
| Italy (8 cities) | 1989–1992 ¹¹⁰ | 2.3 | 40.0 |
| Italy (Florence) | 1978 ¹¹¹ | 1.9 | |
| | 1992 ¹¹¹ | 3.4 | |
| Finland (Helsinki) | 1985 ¹¹² | 3.0 | |
| Greece (Crete) | 1990–1994 ¹¹³ | 3.3 | |
| Northern Greece | 1983–2005 ¹¹⁴ | 0.9 | |
| 12 Southern European cities ^a | 1991–1993 ³¹ | 3.6 | |
| Olmsted County, Minnesota | 1940–1993 ¹¹⁵ | 5.8 | 133 |
| | 1990–2000 ⁴ | 7.9 | 174 |
| Denmark | 1979–1987 ¹¹⁶ | 4.1 | 54 |
| Copenhagen County | 2003–2005 ¹ | 8.6 | 151 |
| North Jutland | 1978–1982 ¹⁸ | 4.1 ^b ; 3.21 | |
| | 1998–2002 ¹⁸ | 10.7 ^b ; 8.5 | |
| Sweden | | | |
| Orebro | 1983–1987 ¹¹⁷ | 6.7 | 146 |
| Stockholm | 1955–1989 ¹¹⁸ | 4.6 | |
| Stockholm | 1990–2001 ¹¹⁹ | 8.3 | |
| South Norway | 1990–1993 ¹²⁰ | 5.8 | |
| Wales (Cardiff) | 1986–1990 ² | 5.6 | |
| | 1996–2005 ⁸ | 6.6 | |
| 8 North European cities ^a | 1991–1993 ³¹ | 6.3 | |
| Northern France | 1988–2005 ²³ | 6.3 | |
| Germany | 2004–2006 ¹¹ | 6.6 | |
| Canada | | | |
| Alberta | 1977–1981 ⁶ | 10 | 44.4 |
| Manitoba | 1989–1994 ⁷ | 14.6 | 198.5 |
| British Columbia | 1998–2000 ⁵ | 8.8 | 161 |
| Nova Scotia | 1998–2000 ⁵ | 20.2 | 319 |
| United Kingdom (Derby) | 1951 ¹²¹ | 0.7 | |
| | 1985 ¹²¹ | 6.7 | |
| New Zealand (Canterbury) | 2004–2005 ¹² | 16.5 | 155.2 |

NOTE. Colored refers to persons of a mixed origin.
^aMulticenter European study that included 8 northern and 12 southern areas.
^bWomen; men.

| Country | Study dates (references) | Incidence (/10 ⁵) | Prevalence (/10 ⁵) |
|---------------------------------------|--------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Japan | 1974 ⁹⁹ | 0.5 | |
| | 1991 ¹⁰⁰ | 1.9 | 18.1 |
| | 2005 ¹⁰¹ | | |
| South Korea | 1986–1990 ¹⁰² | 0.3 | 7.6 |
| | 2001–2005 ¹⁰² | 3.1 | 31 |
| Oman | 1987–1994 ¹²² | 1.4 | |
| Olmsted County, Minnesota | 1940–1993 ¹¹⁵ | 7.6 | 229 |
| | 1991 ¹¹⁵ | 8.8 | 214 |
| | 1990–2000 ⁴ | | |
| Israel | 1965–1994 ¹²³ | 3.5 | 44.6 |
| Israel (Galilee) | 1967–1976 ¹²⁴ | 0.9 | |
| Beer Sheva | 1971–1986 | 3.8 | |
| | 1986 | 5.8 | |
| | 1961–1985 ¹²⁵ | | |
| Germany | 1980–1984 ¹²⁶ | 2.4 | |
| | 1991–1995 ¹²⁶ | 3.0 | |
| | 2004–2006 ¹¹ | 3.9 | |
| Hungary | 1977 ¹⁰⁹ | 1.7 | 142.6 |
| | 2001 ¹⁰⁹ | 11.0 | |
| | 2000 ¹⁰⁹ | | |
| South Africa | 1980–1984 ¹⁰⁶ | 5.0 (White) | |
| | | 1.9 (Colored) | |
| | | 0.6 (Black) | |
| Croatia | 2000–2004 ¹⁰⁴ | 4.3 | 21.4 (1989) |
| Primorsko-Goranska | 1980–1989 ¹⁰³ | 1.5 | |
| Zagreb | 1989 ¹⁰³ | | |
| Northern France | 1988–2005 ²³ | 4.1 | |
| Italy (8 cities) | 1989–1992 ¹¹⁰ | 5.2 | 121.0 |
| Italy (Florence) | 1990 ¹¹¹ | 3.8 | |
| | 1992 ¹¹¹ | 9.6 | |
| Canada | 1977–1981 ⁶ | 6.0 | 37.5 |
| Alberta | 1981 ⁶ | 19.5 | 169.7 |
| Nova Scotia | 1998–2000 ⁵ | 14.3 | 249 |
| Manitoba | 1989–1994 ⁷ | | |
| Sweden | 1958 ¹²⁷ | 4.2 | |
| Malmö | 1982 ¹²⁷ | 9.4 | |
| The Netherlands | 1991–1995 ¹²⁸ | 10.0 | |
| 12 South European cities ^a | 1991–1993 ³¹ | 8.0 | |
| Spain | 1981–1988 ¹⁰⁷ | 3.2 | 43.4 |
| Navarra | 1988 ¹⁰⁷ | 9.6 | |
| Northern Spain | 2001–2003 ¹⁰⁸ | 9.1 | |
| | 2000–2002 ³³ | | |
| 8 North European cities ^a | 1991–1993 ³¹ | 11.4 | |
| Norway | 1990–1993 ¹²⁹ | 13.6 | |
| Denmark | 2003–2005 ¹ | 13.4 | 294 |
| Copenhagen | 1978–1982 ¹⁸ | 8.3 ^b ; 7.2 | |
| North Jutland | 1998–2002 ¹⁸ | 17.0 ^b ; 16.7 | |
| | 2002 ¹⁸ | | |
| New Zealand (Canterbury) | 2004–2005 ¹² | 7.6 | 145.0 |
| | 2005 ¹² | | |

NOTE. Colored refers to persons of a mixed origin.
^aMulticenter European study that included 8 northern and 12 southern areas.
^bWomen; men.

Πίνακας 1. Επίπτωση και επιπολασμός της Νόσου Crohn (Πηγή: αναφορά 5)

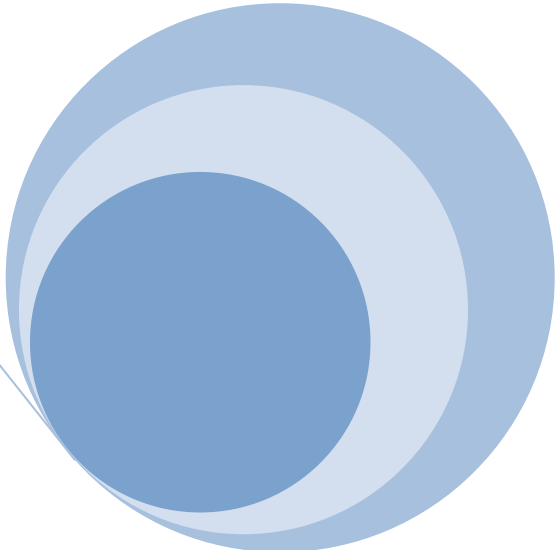
Πίνακας 2. Επίπτωση και επιπολασμός της Ελκώδους Κολίτιδας (Πηγή: αναφορά 5)

ασθενείς είναι αντίστροφη από των ενηλίκων: υπάρχει μία επικράτηση της NC σε αγόρια και της EK σε κορίτσια. Η αλλαγή της ισορροπίας μεταξύ αρρένων και θηλέων ασθενών με ΙΦΕΝ φαίνεται να λαμβάνει χώρα μεταξύ των 14 και 17 ετών²⁵.

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 50 ετών, η επίπτωση της EK πρώτα αυξήθηκε και κατόπιν σταθεροποιήθηκε ή ακόμη και μειώθηκε. Κατά την περίοδο σταθεροποίησης, η επίπτωση της NC αυξανόταν συνεχώς, όπως αποδεικνύουν δεδομένα από μελέτες σε ΗΠΑ και Ευρώπη^{6,7,23,28}. Σε κράτη που βρίσκονται σε διαδικασία δυτικοποίησης, πρώτα αυξάνει η επίπτωση της EK και κατόπιν της NC. Η Ασία εμφάνιζε υψηλό λόγο επίπτωσης EK/NC στη δεκαετία του 1980 και 1990, όμως αργότερα, το 2000, η επίπτωση της NC αυξήθηκε. Στην Ιαπωνία, Σιγκαπούρη και Νότια Κορέα, η συχνότητα των ΙΦΕΝ ήταν χαμηλή αρχικά αλλά αργότερα αυξήθηκε απότομα³². Στον αναπτυσσόμενο κόσμο, η συχνότητα των ΙΦΕΝ φαίνεται να ακολουθεί την εξής πορεία: μία αρχικά χαμηλή επίπτωση EK, ακολουθούμενη από μία αύξηση της EK με παράλληλα χαμηλή επίπτωση NC και ακολούθως μία επίπτωση NC που προσεγγίζει τα επίπεδα της EK.

Στη Βόρεια Αμερική, ο Καναδάς και οι βόρειες πολιτείες των ΗΠΑ εμφανίζουν υψηλότερη επίπτωση NC, συγκριτικά με το νοτιότερο τμήμα της ηπείρου³³. Μία παρόμοια διαβάθμιση από το Βορρά προς το Νότο φαίνεται να εμφανίζεται και στην Ευρώπη, για τις ΙΦΕΝ. Η μέση ετήσια επίπτωση για την EK ήταν 11,8/100000 στο Βορρά και 8,7/100000 στο Νότο, ενώ για την NC ήταν 6,3 και 3,6/100000, αντίστοιχα³⁴. Ωστόσο, το προφίλ αυτό φαίνεται ότι δε μπορεί να γενικευθεί, καθώς υπάρχουν μελέτες από την Κεντρική Ελλάδα³⁵ και τη βόρεια Ισπανία³⁶ που εμφανίζουν ποσοστά επίπτωσης της EK 11/100000/έτος και 9/100000/έτος, αντίστοιχα.

Αναφορικά με τις εθνολογικές διαφορές, από μία μελέτη στη νότια Καλιφόρνια, φάνηκε ότι ο επιπολασμός NC στους Αφροαμερικανούς ήταν τα 2/3 εκείνης των λευκών³⁷. Οι ενήλικες αμερικανοί λατινικής και ασιατικής καταγωγής φαίνεται ότι εμφανίζουν χαμηλότερο επιπολασμό NC από τους λευκούς. Επιπροσθέτως, ο επιπολασμός των ΙΦΕΝ σε εβραϊκούς πληθυσμούς είναι ιδιαίτερος υψηλός³⁸⁻⁴².



Οι Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Εντερικές Νόσοι

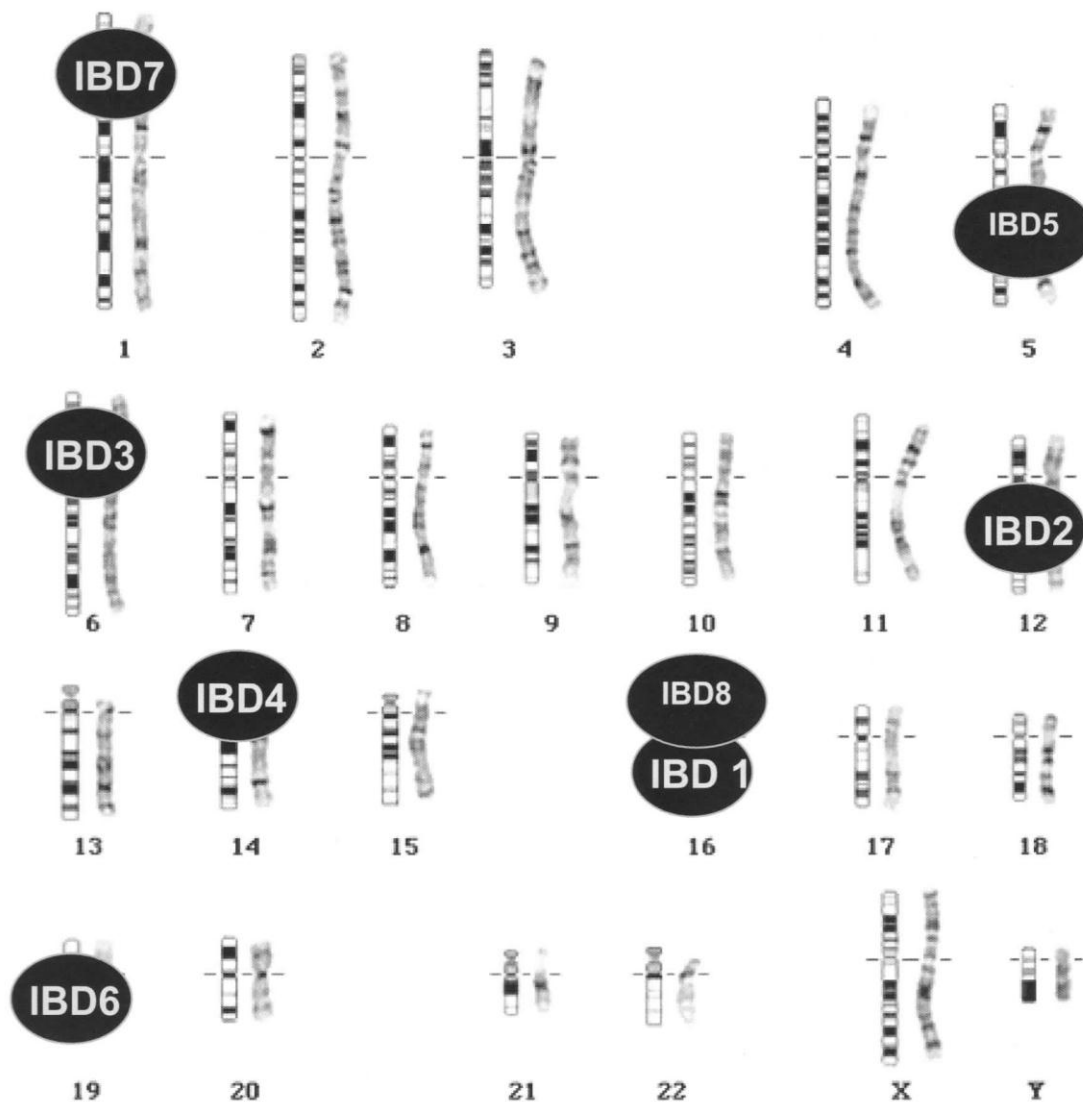
Μέρος 1ο

Κεφάλαιο 3: Γενετική

Οι ΙΦΕΝ εκδηλώνονται ως χρόνιες, υποτροπιάζουσες φλεγμονώδεις νόσοι του πεπτικού σωλήνα. Το οικογενειακό ιστορικό είναι ένας σοβαρός παράγοντας κινδύνου για την εκδήλωση ΙΦΕΝ, με κορύφωση της συχνότητας εμφάνισης την πρώιμη ενήλικη περίοδο της ζωής, μολονότι μπορούν να προσβληθούν άτομα κάθε ηλικίας. Οι ΙΦΕΝ θεωρείται ότι είναι το αποτέλεσμα μίας συνεχούς, υπέρμετρης φλεγμονώδους απάντησης σε συμβιωτικά μικρόβια, σε έναν γενετικά προδιατεθειμένο ξενιστή^{43,44}.

Οι πρώτες μελέτες ευρείας γενετικής διασύνδεσης στις ΙΦΕΝ δημοσιεύθηκαν προ 10ετίας και έκτοτε έχουν ανακαλυφθεί πολλές περιοχές γενετικής προδιάθεσης στα χρωμοσώματα 1, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12, 14, 16, 19 και X⁴⁵⁻⁵⁵. Βάσει της ημερομηνίας ανακοίνωσης, οι περιοχές στα χρωμοσώματα 16, 12, 6, 14, 5, 19 και 1 ονομάστηκαν IBD1 έως IBD7, αντίστοιχα (εικόνα 1). Πιο πρόσφατα, σε διάστημα ενός έτους έχουν δημοσιευθεί επτά μελέτες συσχέτισης ολικού γονιδιώματος (whole genome association studies, WGAS) όπου έχουν ανακαλυφθεί επιπλέον γονίδια για τη NC και την ΕΚ (ATG16L1, IL23R, PTGER4, IRGM, NELL1)⁵⁶⁻⁶³ (πίνακας 1 & εικόνα 2).

Οι Hugot και συν. ήταν οι πρώτοι που ανακοίνωσαν συσχέτιση με το χρωμόσωμα 16q το 1996 και πέντε χρόνια αργότερα, ταυτοποίησαν το υποκείμενο γονίδιο CARD15 (ή NOD2)⁶⁴. Έκτοτε, έχουν αναφερθεί 30 πολυμορφισμοί εντός του γονιδίου που σχετίζονται με τη NC, αλλά μόνο τρεις είναι συχνοί: Arg702Trp, Gly908Arg και Leu1007insC. Αυτοί οι τρεις πολυμορφισμοί ευθύνονται για το 82% περίπου των μεταλλαχθέντων αλληλίων⁶⁵. Το γονίδιο CARD15 σχετίζεται μόνο με τη NC και όχι με την ΕΚ. Κωδικοποιεί την πρωτεΐνη NOD2 που εκφράζεται στα μονοκύτταρα, μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα, επιθηλιακά κύτταρα και στα κύτταρα Paneth⁶⁶. Η NOD2 είναι ένας υποδοχέας αναγνώρισης μοτίβου (pattern recognition receptor, PRR) που αναγνωρίζει το διπεπτιδίο muramyl που παράγεται από βακτηριακή πεπτιδογλυκάνη (bacterial peptidoglycan-derived muramyl dipeptide, MDP), μέσω μίας περιοχής επαναλήψεων πλούσιων σε λευκίνη (Leucine-rich-repeat)⁶⁷. Η αναγνώριση του MDP διεγείρει την έκκριση αντιμικροβιακών πεπτιδίων, που περιλαμβάνουν τις alpha-defensins και προστατεύουν έτσι τον ξενιστή από την επίθεση⁶⁸. Στη NC, είναι επιβεβαιωμένη η μειωμένη έκφραση των alpha-defensins, η οποία είναι πιο έκδηλη στους ασθενείς-φορείς των μεταλλαγών στο γονίδιο



Εικόνα 1. Γενετικές περιοχές των ΙΦΕΝ (Πηγή: Ahmad T, The genetics of IBD, 7th IBD intensive advanced course for junior gastroenterologists, ECCO congress, 2009)

CARD15⁶⁹. Η μεταλλαγή 1007fsinsC έχει συσχετισθεί *in vitro* με ελαττωματική ενεργοποίηση του NF-kappa B (NF-κB)⁷⁰.

Η περιοχή του χρωμοσώματος 10 που ανακοινώθηκε από τους Hampe και συν.⁴⁸ περιέχει το υπεύθυνο για τη NC- γονίδιο DLG5 (Drosophila Discs Large Homolog 5)⁷¹. Ένας απλότυπος του γονιδίου (SNP G113A), φαίνεται ότι κληρονομείται σε απογόνους με ΕΚ και ΝΚ. Ο συνολικός κίνδυνος για ΙΦΕΝ, που σχετίζεται με την παραλλαγή 113A, είναι μέτριος (σχετικός κίνδυνος=1,6) αν και νεότερες μελέτες τον μειώνουν ακόμη περισσότερο στα επίπεδα του 1,25. Η πρωτεΐνη

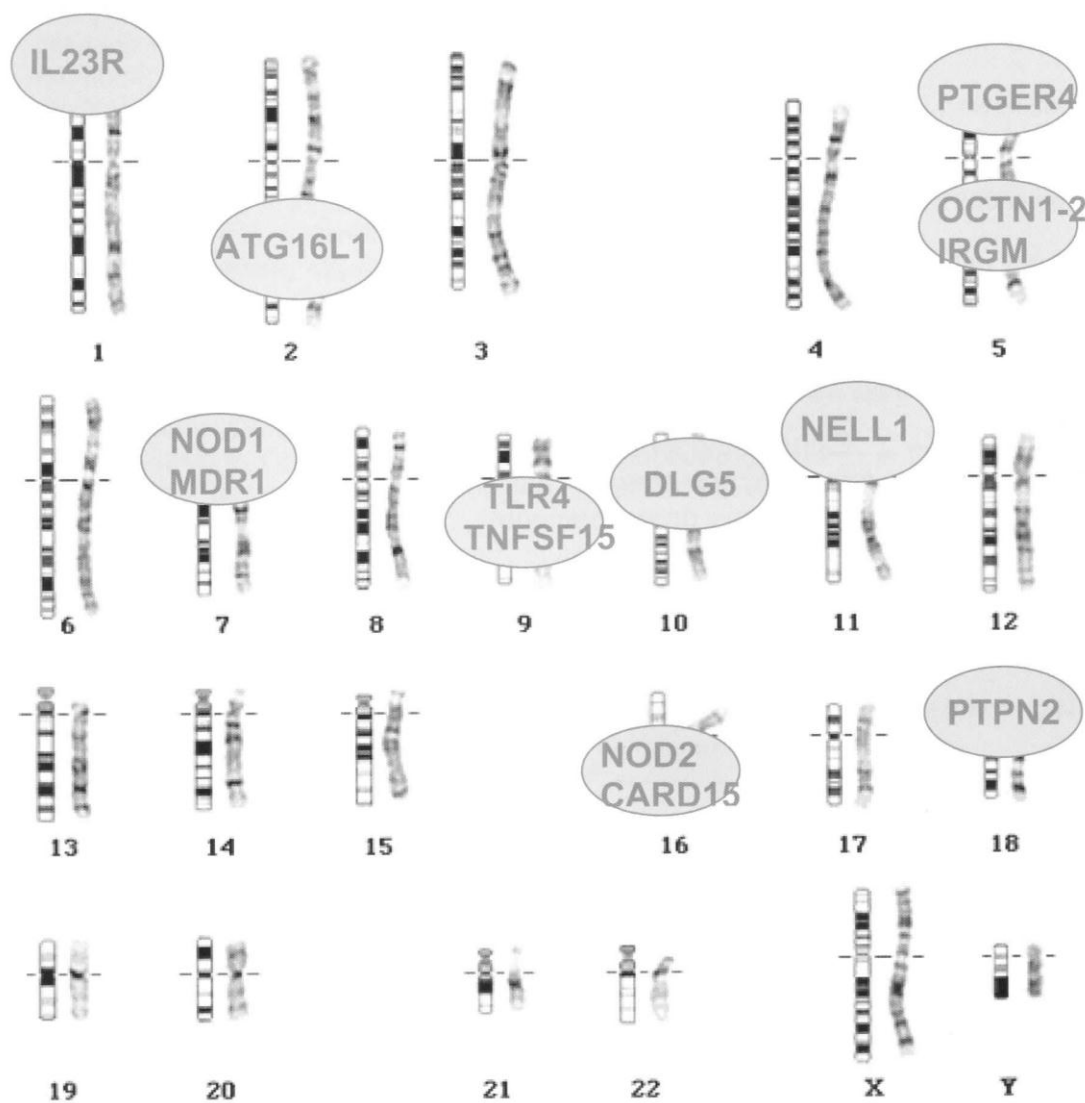
| | Definition of association—signal or genes in region | Population differences | Other disease associations |
|------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Predominantly associated with CD | | | |
| <i>NOD2</i> (16q12) | Multiple, uncommon, European-derived, loss-of-function alleles | Similar heterozygote risk in African Americans with CD ²² ; mutations associated with patients of European ancestry not observed in Asians ^{23,24} | Graft-vs-host disease, ⁸³ gain-of-function mutations associated with Blau syndrome ⁷⁹ |
| 5q31 | Multiple | No association in Asian populations ^{84,85} | Not reported |
| 9q32 | <i>ZNF365</i> (encodes zinc finger 365) | Not reported | Psoriasis, ⁴⁵ modest association with UC ⁸⁴ |
| 10q21 | Multiple | Not reported | Not reported |
| 18p11 | <i>PTPN2</i> | Not reported | Type 1 diabetes mellitus, ⁸⁶ celiac disease ⁸⁷ |
| 22q13 | Multiple | Not reported | Not reported |
| Encode factors in the autophagy pathway | | | |
| <i>ATG16L1</i> (2q37) | Common, loss-of-function variant Thr300Ala ²⁹ | No association in Asian populations ^{88,89} | Not reported |
| <i>IRGM</i> (5q33.1) | Polymorphism in promoter that affects copy number ³⁶ | No association with Japanese cases of CD ⁸⁶ | Different allele found to protect against mycobacterium tuberculosis ⁹⁰ |
| 12q12 | <i>LRRK2</i> and <i>MUC19</i> | Not reported | Parkinson's disease, ^{92a} leprosy ²⁴ |
| Predominantly associated with UC | | | |
| Major histocompatibility complex region (6p21) | Multiple, including class II genes | Predominant locus in European and Asian patients with UC | Distinct association patterns in multiple other diseases, including CD |
| <i>FCGR2A</i> (1q23, Fc fragment receptor) | Associated with histidine allele at His131Arg, which increases affinity for Fc fragment | Also associated with a Japanese cohort of patients with UC ⁹² | Arginine allele associated with systemic lupus erythematosus, type 1 diabetes ⁹³⁻⁹⁵ |
| 1p36 | Multiple genes | Association with SNPs at 1p36 in Japanese patients with UC ⁹² | No reports in other chronic inflammatory diseases |
| 12q14 | <i>Interferon-γ, IL26, IL22</i> | Not reported | Not reported |
| Loci that affect epithelial defense | | | |
| 7q22 | Multiple, including <i>LAMB1</i> (encodes laminin β1) | Not reported | Not reported |
| 20q13 | Multiple, including <i>HNF-4a</i> (encodes hepatocyte nuclear factor 4α) | Not reported | Not reported |
| Genome-wide significant associations with CD and UC | | | |
| Genes that encode factors in the IL-23 pathway | | | |
| 1q32 | See Figure 2 | Arg381Gln in IL23R (uncommon protective allele), absent in Asian populations ⁸⁹ ; common alleles associated with IBD in Asians | See Figure 2 |
| 5p13 | Multiple, including <i>IL10</i> | Not reported | Type 1 diabetes, ^{88a} systemic lupus erythematosus, ⁹⁰ Behçet's disease ^{70,71} |
| 9q32 | Gene desert adjacent to <i>PTGER4</i> (encodes prostaglandin receptor 4) | Not reported | Multiple sclerosis ^{92a} |
| 9q32 | <i>TNFSF8, TNFSF15</i> | Distinct alleles that confer higher risk (>2-fold) in Japanese and Korean subjects with CD ¹²⁻⁹⁷ | Leprosy ²⁶ |
| 9q34 | Multiple, including <i>CARD9</i> (encodes caspase recruitment domain family, member 9) | Not reported | Ankylosing spondylitis ⁷⁷ |
| Transcription factors | | | |
| 10q22 | <i>ZMIZ1</i> (encodes zinc finger, MIZ-type containing 1) | Not reported | Celiac disease, ⁸⁷ multiple sclerosis, ⁹⁶ vitiligo ⁹⁸ |
| 10q24 | <i>NKX2-3</i> (encodes NK2 transcription factor) | Association replicated in Japanese CD ⁹⁹ | No reports in other chronic inflammatory diseases |
| 15q22 | <i>SMAD3</i> | Not reported | Asthma ¹⁰⁰ |

NOTE. Loci with *P* values <10⁻¹⁶ for Crohn's disease (CD) or ulcerative colitis (UC) are presented, excluding loci not containing genes. For a more comprehensive listing of inflammatory bowel disease (IBD) susceptibility loci, see IBD meta-analyses.^{3,15}

^aAssociation signals differ between disease and IBD.

Πίνακας 1. Γενετικές περιοχές με ισχυρή συσχέτιση με τις ΙΦΕΝ, σε μελέτες ευρείας γενετικής διασύνδεσης, σε Ευρωπαίους ασθενείς (Πηγή: αναφορά 44)

DLG5 ανευρίσκεται στον πλακούντα, στο λεπτό και παχύ έντερο, στην καρδιά, στους σκελετικούς μύες, στο ήπαρ και το πάγκρεας. Ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών MAGUK (membrane-associated guanylate kinase) που ενέχονται στη διαβίβαση σημάτων και στην ακεραιότητα των επιθηλιακών κυττάρων⁷²⁻⁷⁵.



Εικόνα 2. Ταυτοποιημένα γονίδια των ΙΦΕΝ (Πηγή: Ahmad T, The genetics of IBD, 7th IBD intensive advanced course for junior gastroenterologists, ECCO congress, 2009)

Το 2004, η μελέτη των Peltekona και συν. ταυτοποίησε τα γονίδια SLC22A4 & SLC22A5, στο γενετικό τόπο IBD5, που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες OCTN1 & 2 (novel organic cation transporter), αντίστοιχα⁷⁶. Ο IBD5 είναι ένας πολύ ελκυστικός τόπος για τις ΙΦΕΝ, καθώς περιλαμβάνει τις γονιδιακές ομάδες των κυτταροκινών. Στον IBD5

έχουν ανακαλυφθεί 10 πολυμορφισμοί απλών νουκλεοτιδίων (single nucleotide polymorphisms, SNPs). Δύο από αυτούς (L503F & G->C transversion in the OCTN2 promoter) σχετίζονται με την προδιάθεση για NC⁷⁶⁻⁸⁰.

Μία άλλη γενετική περιοχή προδιάθεσης για ΙΦΕΝ είναι η 7p14, που περιλαμβάνει έναν πολύπλοκο πολυμορφισμό εισαγωγής/διαγραφής στο γονίδιο NOD1/CARD4 [ND(1)+ 32656*1]. Το NOD1 εμφανίζει ομολογία με το CARD15^{46,81}.

Η περιοχή του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) είναι μία περιοχή υψηλού ενδιαφέροντος από γενετική σκοπιά. Τα μόρια HLA class II παρουσιάζουν μερικώς-χωνευθέντα αντιγόνα στους υποδοχείς των Τ-κυττάρων και παίζουν κεντρικό ρόλο στην ανοσιακή απάντηση. Το HLA DR2 (DRB1*1502) ανευρίσκεται σε Ιάπωνες ασθενείς με ΕΚ, ενώ το HLA DR3 (DRB1*0103) ανευρίσκεται σε Ευρωπαϊκές μελέτες. Το HLA DR1 φαίνεται να σχετίζεται με το φαινότυπο NC⁸²⁻⁸⁵.

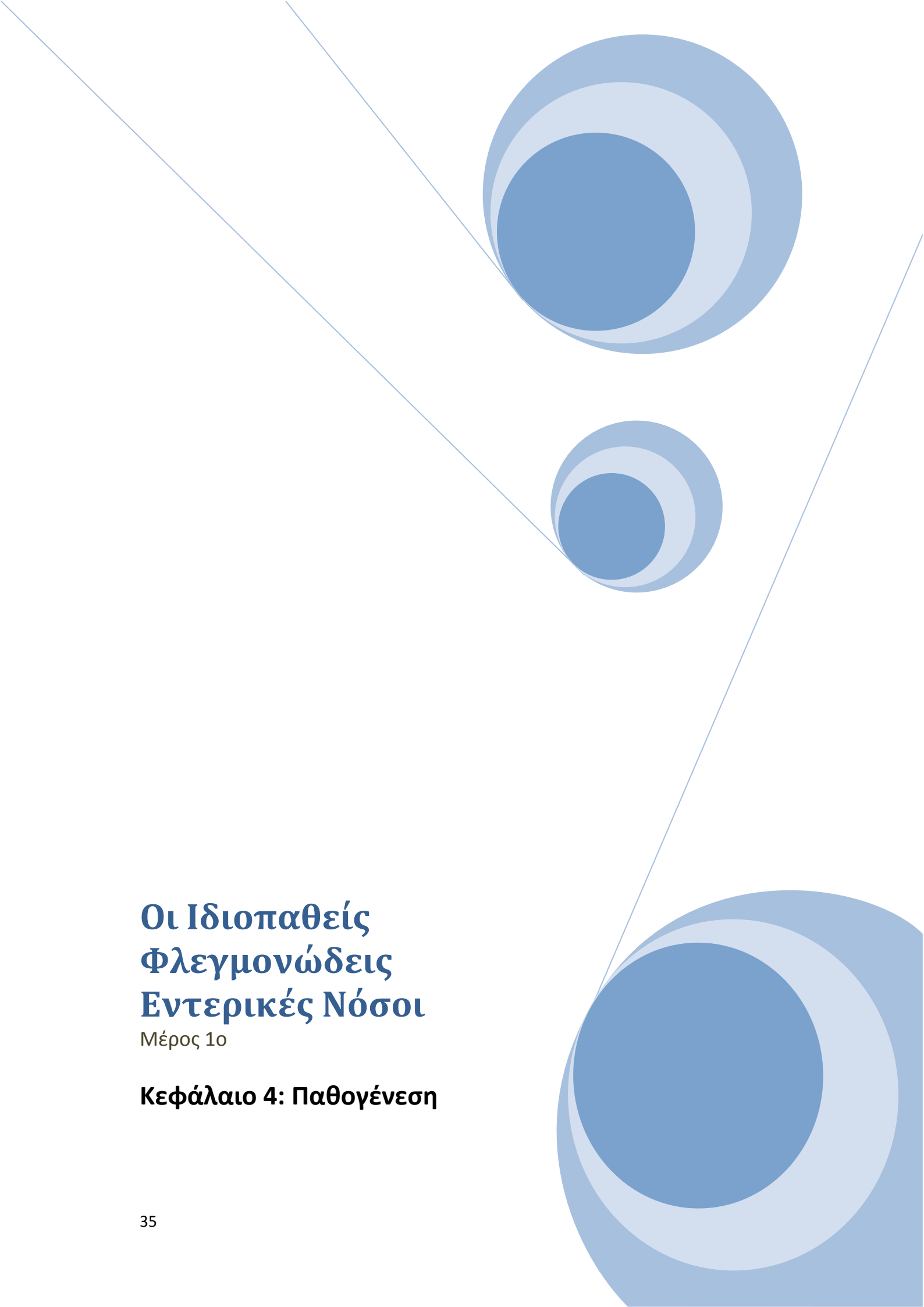
Αναφορικά με τους υποδοχείς toll-like (toll-like receptors, TLRs), σε μία Βελγική μελέτη βρέθηκε συσχέτιση του πολυμορφισμού TLR4 Asp299Gly με τις ΙΦΕΝ, σε δύο ανεξάρτητες ομάδες ασθενών⁸⁶. Ο πολυμορφισμός αυτός σχετίζεται με διαταραχή στη διαβίβαση σημάτων μέσω των λιποπολυσακχαριτών και με αυξημένη ευαισθησία σε Gram-αρνητικές λοιμώξεις. Η συχνότητα του αλληλίου με τον πολυμορφισμό αυτό ήταν σημαντικά αυξημένη σε ασθενείς με ΕΚ και NC, συγκριτικά με τον πληθυσμό ελέγχου. Επιπροσθέτως, σε ένα πληθυσμό Εβραίων ασθενών με NC, έχει περιγραφεί γενετική συσχέτιση με την παραλλαγή TLR5-stop του υποδοχέα TLR5⁸⁷.

Σε μία μεγάλη γενετική μελέτη, που επικεντρώθηκε στη NC τελικού ειλεού, βρέθηκε μία πολύ σημαντική συσχέτιση με το γονίδιο του υποδοχέα της ιντερλευκίνης-23 (IL23R), στο χρωμόσωμα 1p31⁵⁷. Μία ασυνήθιστη παραλλαγή (rs11209026, Arg381Gln) φαίνεται να προσφέρει ισχυρή προστασία από τη NC, με σχετικό κίνδυνο περίπου 0,35, κάτι που επιβεβαιώθηκε και από άλλες μελέτες⁸⁸⁻⁹¹.

Άλλα γονίδια που σχετίζονται με τις ΙΦΕΝ είναι εκείνα που εμπλέκονται στην αυτοπεψία: ATG16L1 (autophagy-related 16-like 1) και IRGM (immunity-related guanosine triphosphatase)^{59,61}. Επίσης, πρόσφατα ανακαλύφθηκε μία περιοχή στο χρωμόσωμα 5p13.1, που σχετίζεται με την ποσοτική έκφραση του υποδοχέα EP4 των προσταγλανδινών (PTGER4), ο οποίος παίζει ρόλο στη ρύθμιση του επιθηλιακού

φραγμού και ταιριάζει πολύ καλά στο μοντέλο των ΙΦΕΝ⁶⁰. Είχε δειχθεί παλαιότερα ότι ποντίκια με έλλειψη του PTGER4 ανέπτυσαν πολύ βαριά κολίτιδα, όταν εκτρέφονταν με νερό με DSS (Dextran Sulphate Sodium), αναδεικνύοντας έτσι το σημαντικό ρόλο του γονιδίου αυτού στη φλεγμονή⁹².

Στους περισσότερους Καυκάσιους ασθενείς με NC, ανευρίσκεται αυξημένος επιπολασμός των μεταλλαγών CARD15. Περίπου 35-45% των ασθενών με NC φέρουν τουλάχιστον μία μεταλλαγή CARD15, συγκριτικά με το 15-20% των υγιών μαρτύρων⁹³⁻⁹⁹. Σε Σκανδιναβούς¹⁰⁰, Ιρλανδούς¹⁰¹ και Σκωτσέζους¹⁰² ασθενείς με NC, παρατηρείται χαμηλότερος επιπολασμός της μεταλλαγής, ενώ απουσιάζει εντελώς σε Ιάπωνες¹⁰³, Κινέζους¹⁰⁴ και Αφρο-Αμερικανούς¹⁰⁵. Ο σχετικός κίνδυνος ανάπτυξης NC είναι 2-4 με μία μεταλλαγή παρούσα, όμως ανέρχεται στο 20-40 σε περίπτωση παρουσίας δύο μεταλλαγών. Η φαινοτυπική έκφραση του CARD15 φαίνεται να σχετίζεται με νόσο στο λεπτό έντερο καθώς και με στενωτικό τύπο νόσου. Επιπλέον, αρκετοί συγγραφείς έχουν δείξει ότι ασθενείς που φέρουν μεταλλαγές NOD2/CARD15, χρήζουν χειρουργικής επέμβασης νωρίτερα και έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο για μετεγχειρητική υποτροπή^{106,107}. Για τα άλλα γονίδια DLG5, OTCN, NOD1, TLR4, IL23R, ATG16L1, IRGM και PTGER4, οι φαινοτυπικοί συσχετισμοί είναι ασθενέστεροι. Για τον IBD5 και τις OCTN1 & 2 έχουν υπάρξει αναφορές συσχέτισης με την περιεδρική νόσο^{108,109} και τη νόσο τελικού ειλεού¹¹⁰.

A decorative graphic on the right side of the page consists of three blue circles of varying sizes, each with a lighter blue ring around its center. Two thin blue lines intersect at the top left, forming a large 'V' shape that frames the circles. The circles are positioned at the top, middle, and bottom right of the page.

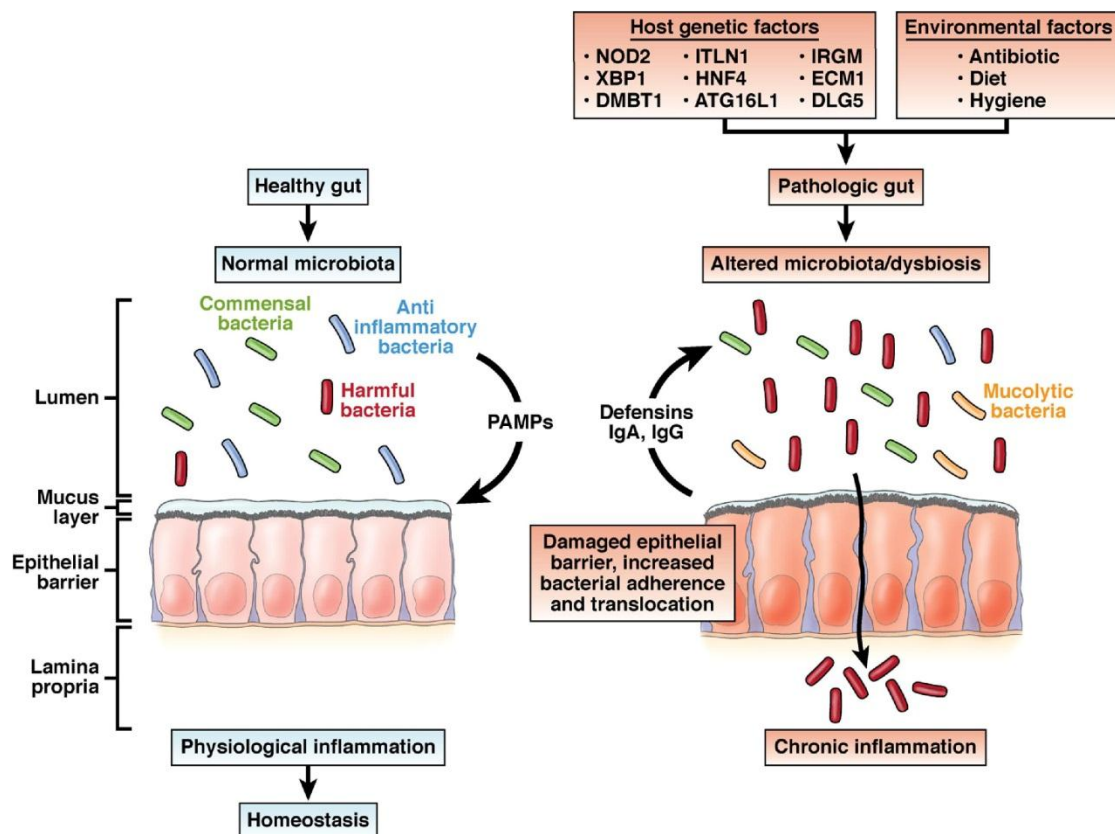
Οι Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Εντερικές Νόσοι

Μέρος 1ο

Κεφάλαιο 4: Παθογένεση

4.1. Η συμβιωτική χλωρίδα και τα εντερικά παθογόνα στην παθογένεση των ΙΦΕΝ

△
 εδομένα από ανοσολογικές, μικροβιολογικές και γενετικές μελέτες συνηγορούν υπέρ μίας διαταραγμένης αλληλεπίδρασης μεταξύ ξενιστή και μικροβίων, όσον αφορά την παθογένεση των ΙΦΕΝ^{111,112} (εικόνα 1).



Εικόνα 1. Αριστερά: σε υγιή άτομα, τα συμβιωτικά και αντιφλεγμονώδη βακτήρια αλληλεπιδρούν με τον εντερικό βλεννογόνο για τη διατήρηση της ομοιόστασης. Αυτό περιλαμβάνει την αναγνώριση από τον εντερικό βλεννογόνο των PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) που παράγονται από τα μικρόβια και μία φυσιολογική απόκριση του ξενιστή με εμπλοκή των IgA & IgG και των α- & β-defensins. Η μικροβιακή κοινότητα προλαμβάνει τις προφλεγμονώδεις επιδράσεις των βλαβερών βακτηρίων και μεσολαβεί στην ανοχή. **Δεξιά:** σε ασθενείς με ΙΦΕΝ, μία ανώμαλη αλληλεπίδραση μεταξύ κυττάρων του ξενιστή και μικροβίων διαταράσσει την ομοιόσταση, οδηγώντας σε εντερική φλεγμονή. Η φλεγμονή μπορεί να προκληθεί από γενετικούς παράγοντες του ξενιστή που επηρεάζουν τις λειτουργίες του φραγμού, την εγγενή και επίκτητη ανοσία και τις ποιοτικές ή/και ποσοτικές μεταβολές στη σύνθεση της μικροχλωρίδας. (Πηγή: αναφορά 132)

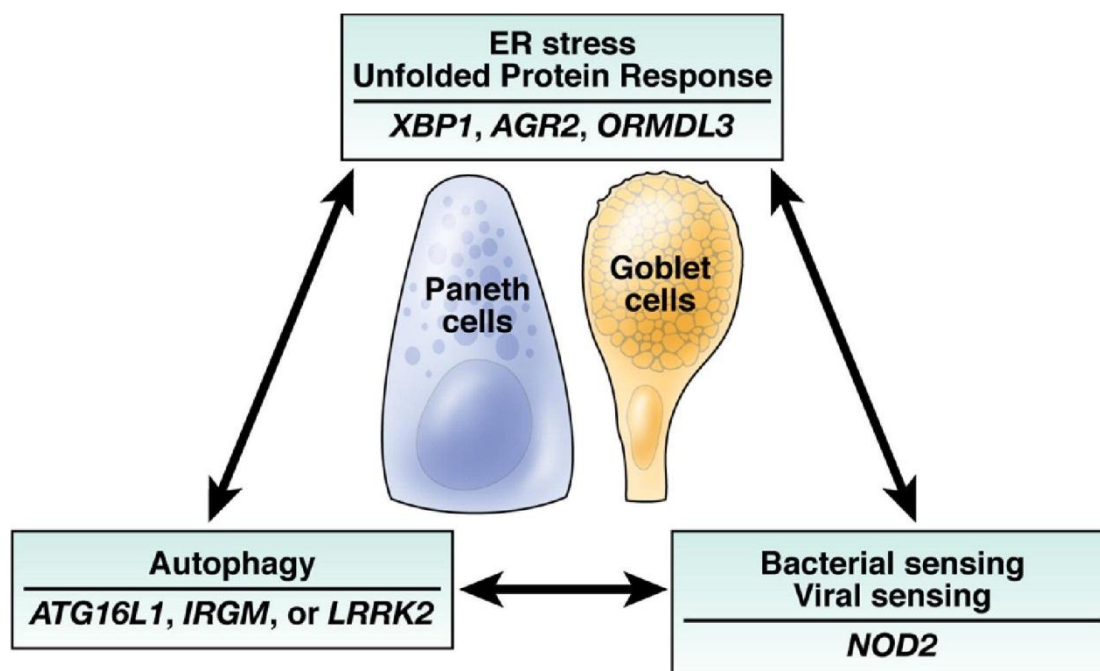
Ο εντερικός βλεννογόνος έχει κεντρικό ρόλο στην αλληλεπίδραση ξενιστή-συμβιωτικής χλωρίδας, λειτουργώντας ως πρωτογενής φραγμός ανάμεσα στο ανοσολογικό σύστημα και το εξωτερικό περιβάλλον. Για να ανεχθεί τον αποικισμό από πολύπλοκες κοινότητες συμβιωτικών βακτηρίων και για να διατηρήσει την ικανότητα καταπολέμησης των παθογόνων, το ανοσολογικό σύστημα έχει εξελιχθεί έτσι ώστε κάθε απόκλιση από την ομοιοστατική συνύπαρξη μικροχλωρίδας και ξενιστή να ενέχει τον κίνδυνο ανάπτυξης φλεγμονής¹¹³. Οι ασθενείς με ΙΦΕΝ (κυρίως εκείνοι με NC) εμφανίζουν αντισώματα έναντι μικροβιακών αντιγόνων, όπως το *Saccharomyces cerevisiae* oligomannan [anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies (ASCA)], το *Escherichia coli* outer membrane porin C (OmpC) και το *Pseudomonas fluorescens* I2 sequence. Οι ασθενείς με υψηλά ποσοστά ορονοσίας έναντι μεγάλου αριθμού μικροβιακών αντιγόνων, εμφανίζουν υψηλότερη συχνότητα στενώσεων, διατρήσεων και ανάγκης χειρουργικής επέμβασης στο λεπτό έντερο¹¹⁴. Τα ASCA υπάρχουν στο 50%-60% των ασθενών με NC, αν και δεν είναι ξεκάθαρο πώς επάγεται η παραγωγή τους, καθώς θα μπορούσαν να προέρχονται και από επιτόπους επιφανείας άλλων μικροοργανισμών, όπως η *Candida albicans*¹¹⁵. Η φλεγμονή μπορεί να προκληθεί από έλλειψη ανοχής σε αντιγόνα που υπάρχουν στην αυτόλογη χλωρίδα¹¹⁶. Από συγκεκριμένους μικροοργανισμούς μπορεί να προκληθεί μία υπερβολικά επιθετική απάντηση μέσω των T-κυττάρων. Η βακτηριακή flagellin που είναι ένα κυρίαρχο αντιγόνο στη NC, και όχι στην ΕΚ, επάγει την εγγενή (innate) ανοσία μέσω του υποδοχέα Toll-like receptor 5 (TLR5)¹¹⁷. Η διαφοροποίηση των T-βοηθητικών (Th)17 κυττάρων- τα Th17 και Th1 κύτταρα είναι σημαντικοί μεσολαβητές της φλεγμονής-συσχετίζεται με την παρουσία των βακτηρίων Cytophaga-Flavobacter-Bacteroidetes στο έντερο ποντικών, ανεξάρτητα από τη σηματοδότηση των TLR, ιντερλευκίνης (IL) -21 ή IL-23¹¹⁸. Σε ασθενείς με ΙΦΕΝ έχουν παρατηρηθεί υπερανάπτυξη-εκτροπή (dysbiosis) προς συγκεκριμένους μικροοργανισμούς και μειωμένη πολυπλοκότητα των συμβιωτικών βακτηρίων, αλλά δεν είναι σαφές εάν η υπερανάπτυξη αυτή συμβάλλει στην ανάπτυξη της φλεγμονώδους νόσου του εντέρου ή, αντίθετα, είναι μια συνέπεια της νόσου¹¹⁹⁻¹²⁹. Οι αιτίες για αυτή την εκτροπή που παρατηρείται σε ασθενείς με ΙΦΕΝ μπορεί να είναι πολλαπλές. Επί παραδείγματι, μπορεί να επαχθεί από διαταραχή της ρύθμισης της εγγενούς (innate) και της επίκτητης (adaptive) ανοσίας¹³⁰. Μπορεί επίσης να προέλθει από υψηλής συγκέντρωσης βακτηριοφαγικές κοινότητες που σχετίζονται με τον εντερικό βλεννογόνο και αποσταθεροποιούν τους βακτηριακούς πληθυσμούς¹³¹. Γενικά, η μικροβιακή εκτροπή που παρατηρείται σε ασθενείς με ΙΦΕΝ, με τη συνακόλουθη αποδιοργάνωση της εντερικής χλωρίδας, μπορεί να οφείλεται σε

αποικισμό από εντερικά παθογόνα, σε φλεγμονώδη αντίδραση του ξενιστή ή σε συνδυασμό αυτών. Τα παθογόνα θα μπορούσαν να ανατρέψουν τη φλεγμονώδη αντίδραση και ακολούθως να εκμεταλλευθούν τη φλεγμονή ώστε να διασπάσουν τον εντερικό φραγμό που δημιουργείται από τα συμβιωτικά βακτήρια και τον εντερικό βλεννογόνο¹³². Το εντερικό ανοσολογικό σύστημα έχει τη δυνατότητα να αμύνεται έναντι των παθογόνων και της εισόδου μεγάλου αριθμού μικροβίων από τον εντερικό αυλό. Ταυτόχρονα, θα πρέπει να πετύχει τη συντήρηση μίας κατάστασης ανοσολογικής ανοχής στα αυτόχθονα εντερικά μικρόβια. Το εντερικό περιβάλλον δύναται να ρυθμίζει την κυτταρική διαφοροποίηση του ανοσιακού συστήματος έτσι ώστε το τελευταίο να ισορροπεί ανάμεσα στην άμυνα και την ανοσολογική ανοχή. Διαταραχή αυτής της ισορροπίας σχετίζεται με την ανάπτυξη εντερικής φλεγμονής σε πολλά πειραματικά μοντέλα ποντικών και θεωρείται ότι προδιαθέτει στην ανάπτυξη ΙΦΕΝ στους ανθρώπους¹³³.

4.2. Η αυτοπεψία, η αναγνώριση των μικροβίων, το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου και η λειτουργία του επιθηλίου στις ΙΦΕΝ

Τα τελευταία χρόνια ολοένα και περισσότερα δεδομένα υποστηρίζουν το γεγονός μίας σημαντικής αλληλεπίδρασης ανάμεσα σε 3 θεμελιώδη βιολογικά μονοπάτια του κυττάρου, σχετικά με την παθογένεση των ΙΦΕΝ. Αυτά περιλαμβάνουν την αλληλεπίδραση μεταξύ αυτοπεψίας, όπως αυτή αναδείχθηκε από την ταυτοποίηση των ATG16L1 και IRGM ως κύριων γενετικών παραγόντων κινδύνου για NC, και του ενδοκυττάρου συστήματος βακτηριακής αναγνώρισης, όπως έχει δείχθει από τον κεντρικό ρόλο του NOD2 στην επαγωγή της αυτοπεψίας μετά την είσοδο του βακτηρίου μέσα στο κύτταρο. Ένα μονοπάτι που συνδέεται στενά με την αυτοπεψία και την εγγενή ανοσία είναι αυτό της απόκρισης σε μη-διπλωμένη (unfolded) πρωτεΐνη, που ξεκινά από το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου εξαιτίας της συσσώρευσης πρωτεϊνών με διαταραγμένη αναδίπλωση (misfolded), και που σχετίζεται γενετικά με τη NC και την EK (XBP1 & ORMDL3). Οι διαταραγμένες εκφράσεις των γονιδίων ATG16L1, NOD2 και X box binding protein-1 μοιράζονται το κοινό χαρακτηριστικό της έκδηλης επίδρασης πάνω στα κύτταρα Paneth- εξειδικευμένα επιθηλιακά κύτταρα στη βάση των εντερικών κρυπών, με αντιμικροβιακά χαρακτηριστικά. Συναθροίζοντας τη λειτουργική τους αντιπαράθεση μέσα στο εντερικό επιθηλιακό κύτταρο που έχει εκτεθεί σε περιβαλλοντικά αντιγόνα, την αξιοσημείωτη λειτουργική τους σύγκλιση στα κύτταρα Paneth και τη συμπεριφορά τους σε απάντηση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες,

συμπεριλαμβανομένων των μικροβίων, τα 3 αυτά μονοπάτια είναι ιδιαίτερα σημαντικά για την κατανόηση της παθογένεσης των ΙΦΕΝ (εικόνα 2).



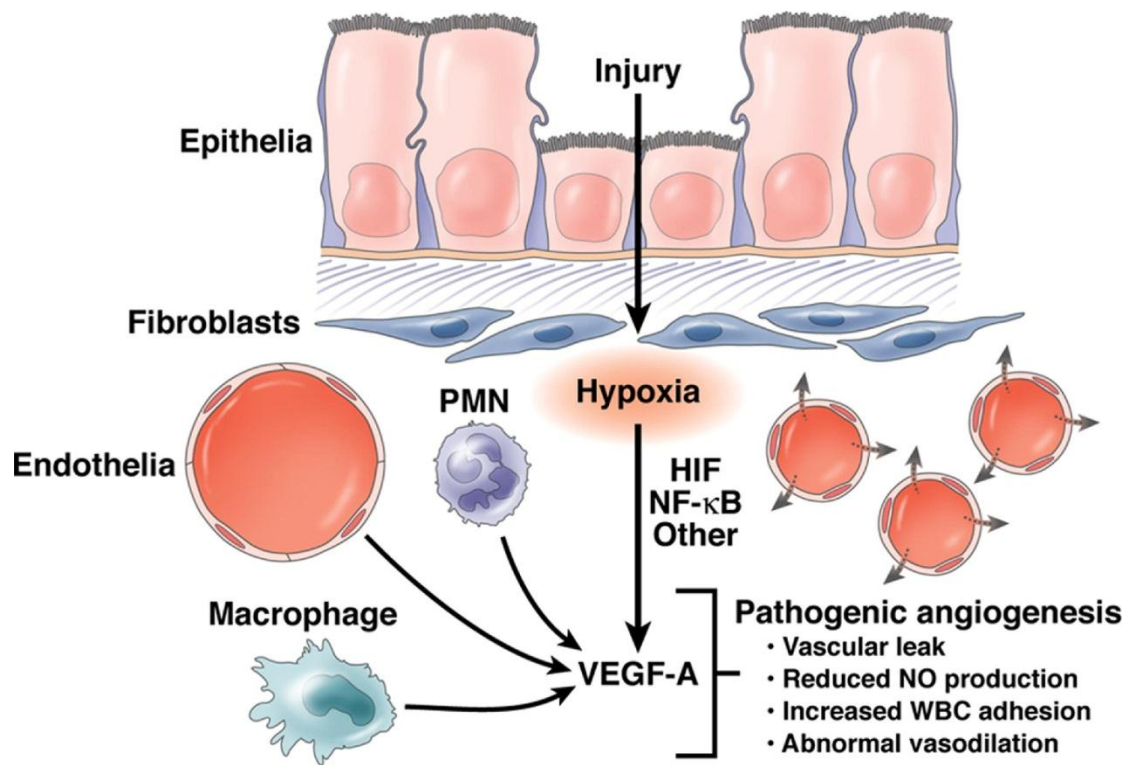
Εικόνα 2. Η σχέση ανάμεσα στην απόκριση μη-διπλωμένης πρωτεΐνης (σαν απάντηση στο στρες του ενδοπλασματικού δικτύου), στην αυτοπεψία και στην ενδοκυττάρια αναγνώριση των βακτηρίων και ιών. (Πηγή: αναφορά 134)

Επιπλέον, σε συνδυασμό με μελέτες μοντέλων υπολειπόμενης λειτουργίας του nuclear factor-κB (NF-κB), όλα τα ανωτέρω δεδομένα υποδεικνύουν έναν κεντρικό ρόλο της διαταραχής της λειτουργίας του εντερικού επιθηλιακού κυττάρου, ως ένα από τα πιο πρώιμα παθοφυσιολογικά γεγονότα κατά την ανάπτυξη της ιδιοπαθούς φλεγμονώδους εντεροπάθειας¹³⁴.

4.3. Υποξία και μεταβολικοί παράγοντες που επηρεάζουν την παθογένεση των ΙΦΕΝ

Το επιθήλιο του γαστρεντερικού σωλήνα έχει ανατομική διάταξη κατάλληλη ώστε να αποτελεί έναν αποτελεσματικό φραγμό ανάμεσα στον αυλό με υψηλό φορτίο αναερόβιων μικροβίων και το χόριο (lamina propria), που έχει υψηλό ρυθμό μεταβολισμού. Λόγω της πυκνής αγγείωσης, ο σημαντικός αυτός φραγμός επηρεάζεται από τη μειωμένη αιματική ροή και τη συνακόλουθη ιστική υποξία, ειδικά κατά τη διάρκεια σοβαρών μεταβολικών ανακατατάξεων που σχετίζονται με την ενεργό φλεγμονή, σε ασθενείς με ΙΦΕΝ. Η ενεργοποίηση του παράγοντα που ενεργοποιείται από την υποξία (hypoxia-inducible factor, HIF) κάτω από τέτοιες συνθήκες οδηγεί στην

υποχώρηση της φλεγμονής σε πειραματικά μοντέλα νόσου σε ποντίκια. Οι προστατευτικές ιδιότητες του HIF αποδίδονται, εν μέρει, στην πολύπλοκη ρύθμιση της προστασίας που προσφέρει ο φραγμός με τον εντερικό βλεννογόνο¹³⁵. Φαίνεται ότι η μικροαγγείωση συμβάλλει στη χρόνια φλεγμονή του βλεννογόνου μέσω διαφόρων μηχανισμών και ότι η κύρια επίπτωση αυτών των αλλαγών είναι η διαταραχή στην ιστική διάχυση και η εξασθένηση της διανομής οξυγόνου^{136,137}. Η ελαττωμένη παραγωγή οξειδίου του αζώτου (NO) από το χρονίως φλεγμένον εντερικό ενδοθήλιο στις ΙΦΕΝ πιστεύεται ότι μεσολαβεί για την ακατάλληλη και παρατεινόμενη προσκόλληση λευκοκυττάρων¹³⁸, τη στιγμή που η αυξημένη παραγωγή του εικοσανοειδούς θρομβοξάνη A₂, που ανιχνεύεται σε καλλιέργειες βιοπτικού υλικού με ΙΦΕΝ, θα μπορούσε να επιτείνει προφλεγμονώδη γεγονότα *in vivo*, όπως η προσκόλληση ουδετεροφίλων στο ενδοθήλιο, η απόπτωση, η συγκόλληση αιμοπεταλίων και η αγγειοσύσπαση^{137,139}. Μερικές μελέτες φαίνεται να υποστηρίζουν ότι η αγγειογένεση εμπλέκεται στην ανάπτυξη δυσλειτουργίας των μικρών αγγείων στις ΙΦΕΝ^{140,141}. Η νεοαγγείωση είναι ένα εδραιωμένο χαρακτηριστικό της χρόνιας εντερικής φλεγμονής¹⁴² και θα μπορούσε να ξεκινά ως μία αντισταθμιστική αντίδραση στην εκτεταμένη υποξία και τον αυξημένο μεταβολισμό των φλεγμονωδών αλλοιώσεων (εικόνα 3). Ιστικές μελέτες από ασθενείς με ΙΦΕΝ και μελέτες σε πειραματικά μοντέλα κολίτιδας έδειξαν ότι η σηματοδότηση του παράγοντα ανάπτυξης του αγγειακού ενδοθηλίου (vascular endothelial growth factor, VEGF) λειτουργεί ως μεσολαβητής σε διαδικασίες αγγειογένεσης και φλεγμονής κατά την εξέλιξη της νόσου¹⁴¹. Η αυξημένη έκφραση του VEGF-A σε ιστό παχέος εντέρου σχετίζεται με αυξημένη αγγειογένεση, ενεργοποίηση λευκοκυττάρων και αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας. Επιπλέον, η δυναμική ενίσχυση παθοφυσιολογικών διαδικασιών (διαταραγμένη προσκόλληση λευκοκυττάρων, εξασθενημένη παραγωγή NO και διαταραγμένη αγγειοδιαστολή) στο εκτεταμένο αγγειακό δίκτυο, θα μπορούσε να διαιωνίσει την φλεγμονώδη διαδικασία σε τέτοιο βαθμό ώστε η αγγειογένεση και η φλεγμονή να καταστούν χρονίως αλληλεπιδρώσες διεργασίες^{143,144}.



Εικόνα 3. Η συμβολή της φλεγμονής και της υποξίας στην αγγειογένεση. Η διαδικασία εμπλέκει την επαγωγή της έκφρασης του VEGF-A σε πολλαπλούς κυτταρικούς τύπους, όπως υποβλεννογόνιους ινοβλάστες, μακροφάγα, ουδετερόφιλα και ενδοθηλιακά κύτταρα. Η αγγειογένεση μέσω VEGF-A είναι πιθανώς παθογόνος και καταλήγει σε σχηματισμό παθολογικών αγγείων και αγγείωση μειωμένης λειτουργικότητας. (Πηγή: αναφορά 135)

4.4. Οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες στην παθογένεση των ΙΦΕΝ

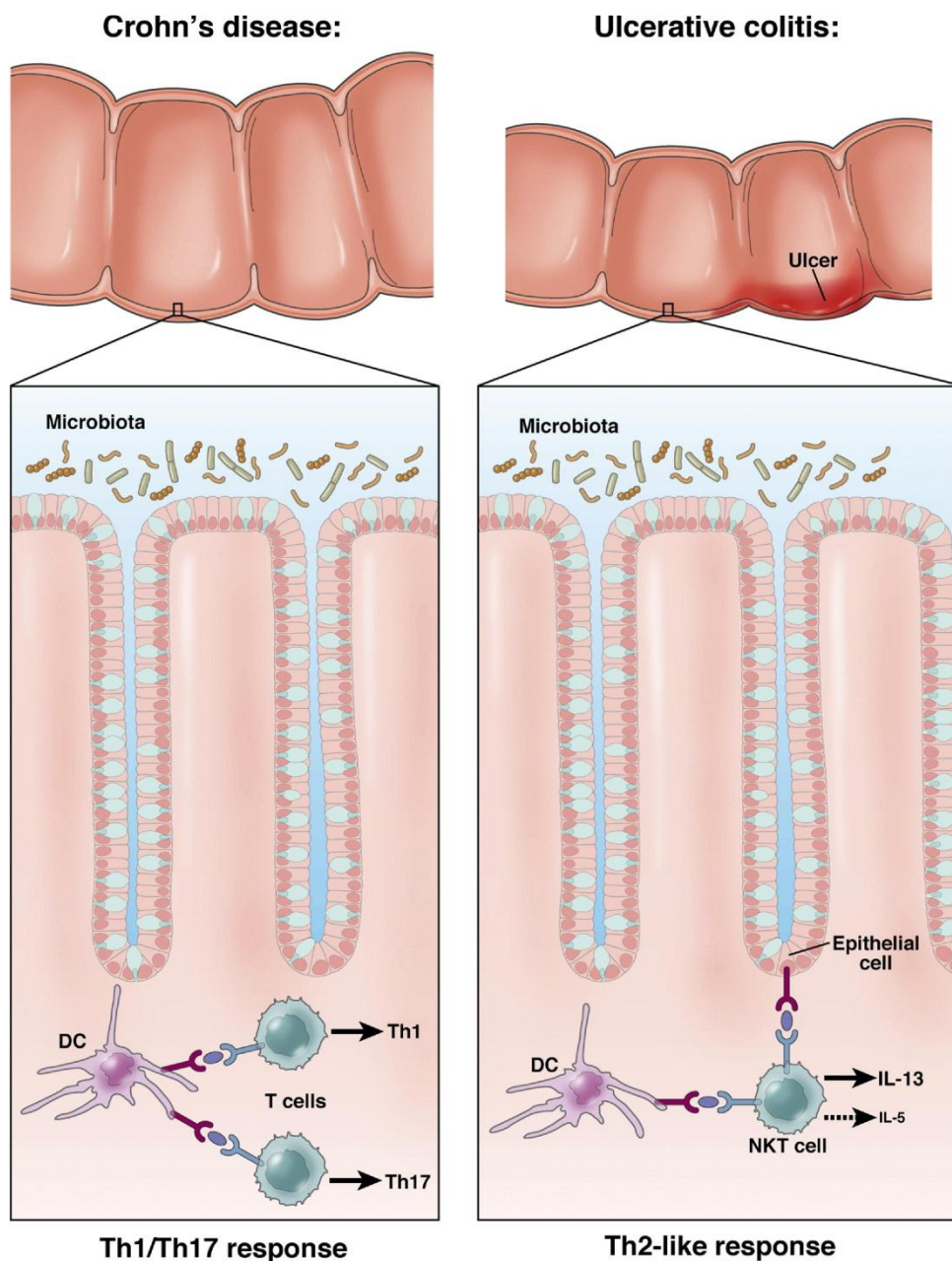
Οι σχετικές με τις κυτταροκίνες ανοσολογικές αποκρίσεις που χαρακτηρίζουν τις ΙΦΕΝ είναι τα κύρια παθοφυσιολογικά στοιχεία που ελέγχουν την έναρξη, την εξέλιξη και τελικώς τη λύση τέτοιων μορφών φλεγμονής. Η πρώτη βαθμίδα των αποκρίσεων των κυτταροκινών χαρακτηρίζεται από τα μοτίβα διαφοροποίησης των Τ-κυττάρων που κυριαρχούν στη νόσο. Στη NC, οι κύριες κυτταροκίνες προέρχονται από τα βοηθητικά Τ-κύτταρα 1 (T-helper, Th1) και από τη διαφοροποίηση των Th17-CD4⁺ κυττάρων και αποτελούνται από την ιντερφερόνη-γ και την ιντερλευκίνη (IL)-17/IL-22, που παράγονται από αυτούς τους τύπους διαφοροποίησης. Η σχετική σημασία αυτών των κυτταροκινών στη φλεγμονή της NC είναι ακόμη ασαφής, αν και υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η ιντερφερόνη-γ είναι «πρώτη μεταξύ ίσων». Αντίθετα, στην ΕΚ,

η κυρίαρχη διαδικασία είναι μία διαφοροποίηση τύπου Th2, που έχει σαν αποτέλεσμα την εξάπλωση των T-κυττάρων φυσικών φονέων (natural killer T-cells) που παράγουν IL-13 και ίσως και IL-5. Αυτά τα- ειδικά ανά νόσο- μοτίβα κυτταροκινών πυροδοτούν τη δημιουργία μίας δεύτερης βαθμίδας κυτταροκινών που γεφυρώνουν τη διαίρεση των Th1/Th17-Th2 και δρουν τόσο ως επαγωγείς όσο και ως ανασταλτικοί διαμεσολαβητές της φλεγμονής. Οι κυτταροκίνες αυτές περιλαμβάνουν τον παράγοντα νέκρωσης του όγκου-α (tumor necrosis factor-α), την IL-1β, την IL-6, καθώς επίσης και μία προσφάτως μελετηθείσα κυτταροκίνη γνωστή ως TL1A (tumor necrosis factor-like ligand)¹⁴⁵ (εικόνα 4).

4.5. Διαταραχή της ρύθμισης της ομοιόστασης και εντερική φλεγμονή στις ΙΦΕΝ

Πολύπλοκα νοσήματα όπως οι ΙΦΕΝ μπορούν να εμφανισθούν στη βάση διαταραχών διαφόρων ομοιοστατικών μηχανισμών και αναγνώρισης φυσιολογικής χλωρίδας ως παθογόνου^{146,147}. Στη ρύθμιση της φλεγμονής στο γαστρεντερικό σωλήνα εμπλέκονται πολλά μονοπάτια, που περιλαμβάνουν τα ανασταλτικά μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα, T-ρυθμιστικά κύτταρα (Treg), την απόπτωση των T-κυττάρων και ανοσορυθμιστικές κυτταροκίνες. Τα δενδριτικά κύτταρα και τα μακροφάγα είναι σε αφθονία στο υγιές χόριο. Φαίνεται ότι, τουλάχιστον σε ποντίκια, τα μακροφάγα του χορίου είναι αντι-φλεγμονώδη ενώ τα δενδριτικά κύτταρα είναι προ-φλεγμονώδη¹⁴⁸. Ποντίκια με δενδριτικά κύτταρα με έλλειψη της integrin ανβ8, που ενεργοποιεί τον TGF-β1 (transforming growth factor), αναπτύσσουν σποραδική κολίτιδα¹⁴⁹. Τα δενδριτικά κύτταρα μπορούν να είναι είτε CD11b⁺, που εμπλέκονται στην επαγωγή των Th1 και Th17 κυττάρων, είτε CD103⁺, που εμπλέκονται στη διαφοροποίηση των Treg κυττάρων¹⁵⁰⁻¹⁵³ (εικόνα 5). Μία πλειάδα παραγόντων που εκκρίνονται από τα επιθηλιακά κύτταρα σε απάντηση σε φλεγμονώδεις κυτταροκίνες ή διέγερση των toll-like υποδοχέων (TLR) (π.χ. thymic stromal lymphopoietin, TGF-β1, ρετινοϊκό οξύ, IL-25), ρυθμίζουν τη λειτουργία των δενδριτικών κυττάρων, διατηρώντας έτσι το αντι-φλεγμονώδες μικροπεριβάλλον μέσα στον εντερικό αυλό¹⁵⁴⁻¹⁵⁶.

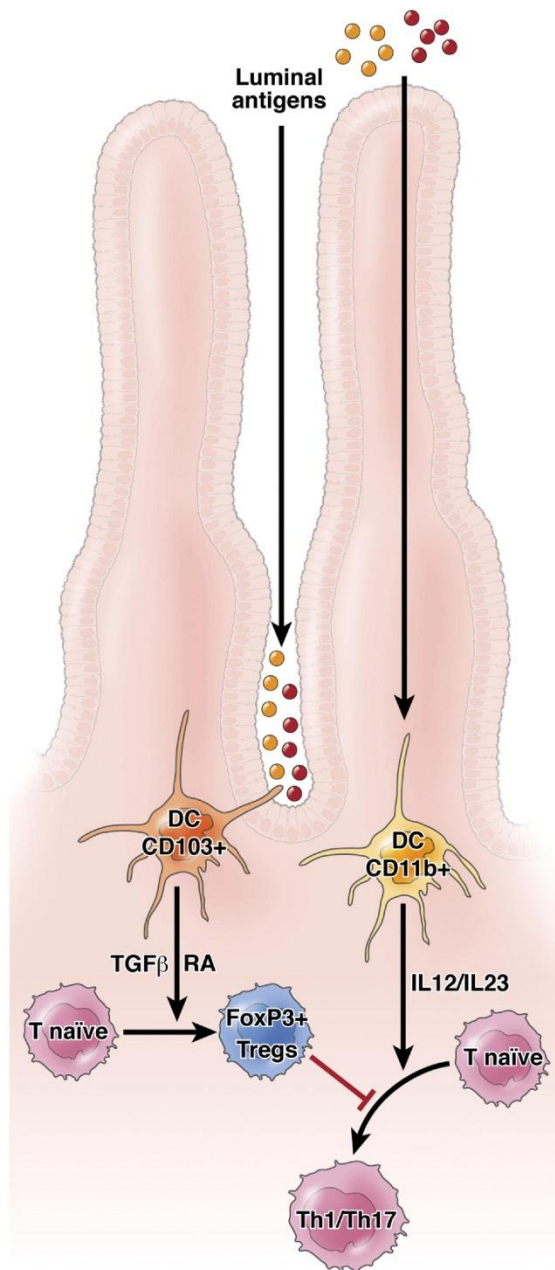
Αναφορικά με τα μακροφάγα, σε αντίθεση με αυτά των άλλων ιστών, τα εντερικά μακροφάγα δεν παράγουν φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και δεν επάγουν άλλα διεγερτικά μόρια σε απάντηση σε TLR-συνδέτες, βακτήρια ή μη-μικροβιακά ερεθίσματα όπως η ιντερφερόνη-γ. Επιπλέον, δεν εκφράζουν ούτε αναστέλλουν κατιόντα σηματοδοτικά μόρια, που χρησιμοποιούνται από τους TLRs για την ενεργοποίηση κυττάρων. Έτσι, τα εντερικά μακροφάγα διατηρούνται σε μία κατάσταση



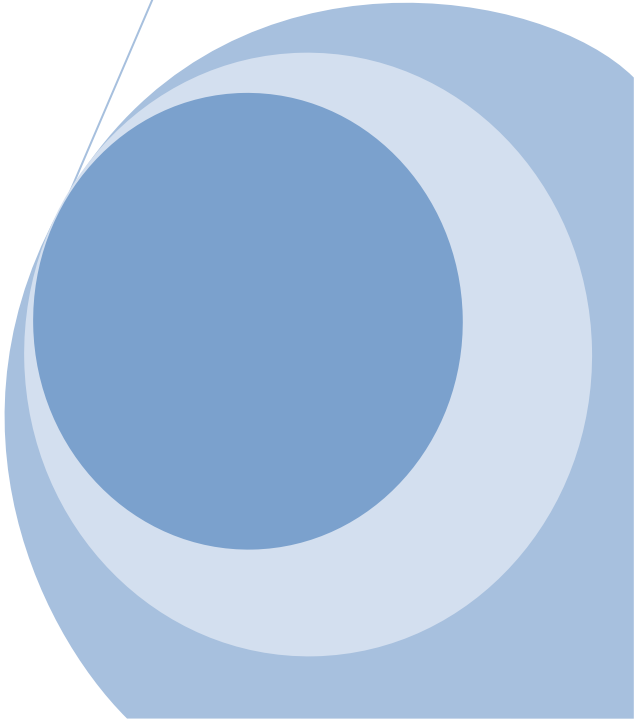
Εικόνα 4. Η βασική διχοτόμηση της λειτουργίας των κυτταροκινών στις ΙΦΕΝ. Αν και η NC και η ΕΚ είναι αμφότερες μορφές των ΙΦΕΝ και εκφράζουν αλληλοεπικαλυπτόμενα γενετικά προφίλ, χαρακτηρίζονται από πολύ διαφορετικές αποκρίσεις των Τ-κυττάρων. Η NC βασίζεται σε μία Th1/Th17 απόκριση, όπου η IL-12 και η IL-23 έχουν ρόλο-κλειδί. Η ΕΚ, αντίθετα, εκφράζεται μέσω μίας απόκρισης τύπου Th-2, στην οποία η κύρια απάντηση είναι τα NKT κύτταρα που παράγουν IL-13 και IL-5. (Πηγή: αναφορά 145)

μερικής ενεργοποίησης που τους επιτρέπει να ενσωματώνουν και να σκοτώνουν μικρόβια, να συνεισφέρουν στην προστατευτική ανοσία και να διατηρούν την ομοιόσταση¹⁵⁷⁻¹⁶³.

Σχετικά με τα Treg κύτταρα, υπάρχει ένα μοντέλο που υποστηρίζει ότι τα T-κύτταρα που αντιδρούν με τη μικροβιακή χλωρίδα ή άλλα αντιγόνα, ελέγχονται συνεχώς από έναν πληθυσμό ρυθμιστικών κυττάρων και ότι ελαττώματα σε αυτά τα κύτταρα οδηγούν σε εντερική φλεγμονή. Τα καλύτερα μελετημένα Treg κύτταρα περιλαμβάνουν T-κύτταρα που εκφράζουν τον μεταγραφικό παράγοντα FoxP3 (fork head box p3), Th3 κύτταρα και Tr1 κύτταρα¹⁶⁴⁻¹⁶⁶. Τα φυσιολογικά υπάρχοντα Treg κύτταρα αντιστοιχούν στο 1-2% των περιφερικών CD4⁺ T-κυττάρων και θεωρείται ότι συντηρούν την ανοχή έναντι αυτο-αντιγόνων¹⁶⁷. Αντίθετα, τα επαγόμενα Treg κύτταρα, τα οποία επίσης εκφράζουν τον FoxP3, αναπτύσσονται από παρθένα CD4⁺ T-κύτταρα, υπό την παρουσία του TGF-β1¹⁶⁸⁻¹⁷⁰. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου τα επαγόμενα Treg κύτταρα αναστέλλουν τη φλεγμονή δεν είναι ξεκάθαρος, αλλά φαίνεται να λαμβάνει χώρα μέσω ενός μηχανισμού παραγωγής IL-10 από αυτά¹⁷¹⁻¹⁷⁵. Επίσης, φαίνεται ότι στην καταστολή της φλεγμονής μέσω των Treg κυττάρων εμπλέκονται ο TGF-β1^{176,177}, η αδενοσίνη (νουκλεοτίδιο με αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες)^{178,179}, η IL-35¹⁸⁰ και η IL-2¹⁸¹.



Εικόνα 5. Τα δενδριτικά κύτταρα μπορούν να ενεργοποιήσουν ξεχωριστούς υποπληθυσμούς των Th κυττάρων στον γαστρεντερικό σωλήνα. Τα CD103-εκφράζοντα ΔΚ μπορούν να επεκτείνουν τους δενδρίτες στον αυλό εγκολπώνοντας αντιγόνα, ώστε να προαχθεί η διαφοροποίηση των FoxP3(+) Treg κυττάρων. Οι TGF-β1 και RA συνεισφέρουν στη διαφοροποίηση των Treg κυττάρων. Αντίθετα, τα CD11b⁺ ΔΚ μπορούν να παράγουν IL-12 & IL-23 και να προάγουν τη διαφοροποίηση των Th1 & Th17 κυττάρων. Η διαδικασία αυτή ρυθμίζεται αρνητικά από τα Treg κύτταρα. (Πηγή: αναφορά 146)



Οι Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Εντερικές Νόσοι

Μέρος 1ο

Κεφάλαιο 5: Φυσική ιστορία

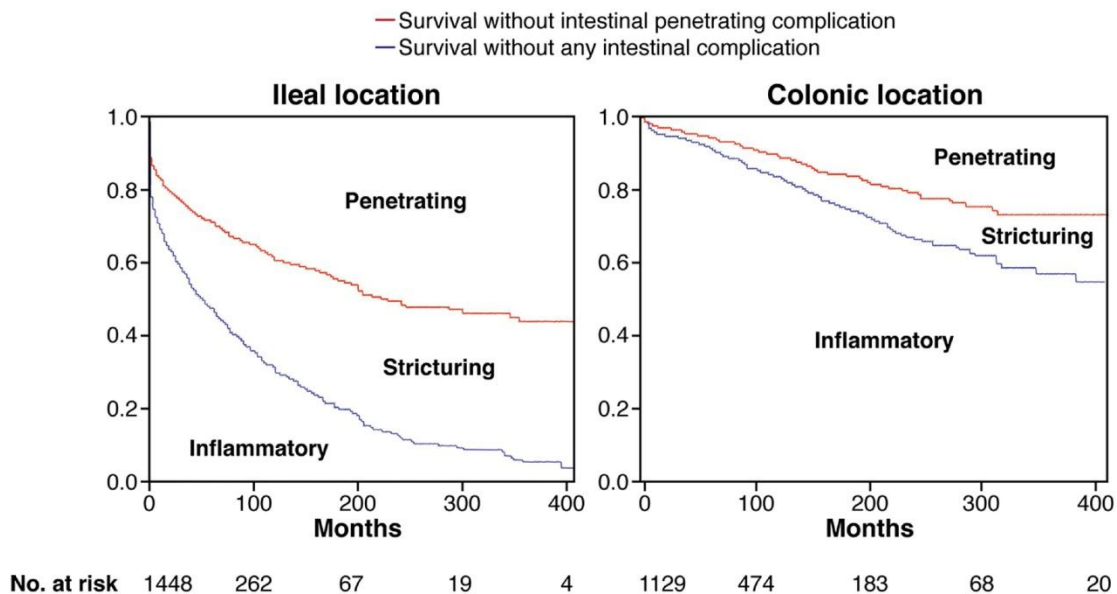
5.1 Νόσος Crohn⁵

Tο μοντέλο μετεγχειρητικής υποτροπής της νόσου είναι κατάλληλο για την κατανόηση της ανατομικής εξέλιξής της^{182,183}. Μετά από μία χειρουργική επέμβαση για NC, εντός 8 ημερών παρατηρείται μία εστιακή φλεγμονώδης διήθηση στον ειλεό, επί της αναστόμωσης¹⁸⁴. Εντός 3 μηνών από την επέμβαση, παρατηρούνται αφθώδη έλκη στο 66% των ασθενών, τα οποία ακολουθούνται από εκτεταμένα επιφανειακά έλκη και κατόπιν από βαθειά έλκη, που προηγούνται της εμφάνισης στένωσης¹⁸². 10 έτη μετά την επέμβαση, λιγότερο από 5% των ασθενών θα έχουν φυσιολογική ενδοσκοπική εικόνα. Τα συμπτώματα εμφανίζονται περίπου 2-3 έτη μετά την εμφάνιση των ανατομικών βλαβών¹⁸³. Η εξέλιξη της ιστικής βλάβης κυμαίνεται από εβδομάδες έως δεκαετίες και μπορεί να αναστραφεί τυχαία ή μετά από θεραπεία. Οι επιφανειακές βλάβες, ιδίως τα αφθώδη έλκη, είναι πιο πιθανό να υποχωρήσουν, τα βαθειά έλκη ή ακόμη και τα συρίγγια μπορούν να επουλωθούν, ενώ οι στενώσεις, όταν συνοδεύονται από προστενωτική διάταση, είναι συνήθως μόνιμες. Οποιοδήποτε τμήμα του πεπτικού σωλήνα μπορεί να προσβληθεί, από τη στοματική κοιλότητα έως τον πρωκτό, αλλά κυρίως προσβάλλεται ο άπω ειλεός και το παχύ έντερο. Η ταξινόμηση του Μόντρεαλ διαχωρίζει τη νόσο σε ειλεού, παχέος εντέρου και ειλεο-κολίτιδα¹⁸⁵, με το ποσοστό του κάθε τύπου να είναι παρόμοιο¹⁸⁶. Περίπου 10-15% των ασθενών εμφανίζουν νόσο ανωτέρου πεπτικού. Η εντόπιση της νόσου φαίνεται να είναι σταθερή σε βάθος χρόνου¹⁸⁷. Σε έως 20% των ασθενών με νόσο ΛΕ θα εμφανισθούν βλάβες στο ΠΕ μετά από 10 έτη¹⁸⁸. Επίσης, σε έως 20% με κολίτιδα, η νόσος θα επεκταθεί και στο ΛΕ¹⁸⁹. 20-30% των ασθενών εμφανίζονται με περιεδρική νόσο και 15-20% έχουν ή είχαν συρίγγια^{190,191}. Κατά την εξέλιξη της νόσου, ο αθροιστικός κίνδυνος εμφάνισης περιεδρικής νόσου είναι 50%^{192,193}, με τους ασθενείς με κολίτιδα να διατρέχουν διπλάσιο κίνδυνο από εκείνους με νόσο ΛΕ¹⁹⁴. Οι ασθενείς που χειρουργήθηκαν για απόστημα, συρίγγιο ή περιτονίτιδα, έχουν αυξημένο κίνδυνο για να εμφανίσουν περαιτέρω διατιτραίνουσες επιπλοκές¹⁹⁵. Αντίστροφα, οι ασθενείς με στενώσεις συνήθως εμφανίζουν υποτροπή των στενώσεων. Η νόσος εμφανίζει 3 «συμπεριφορές»: διατιτραίνουσα, στενωτική και φλεγμονώδη^{187,196}. Κατά τα πρώτα έτη της νόσου επικρατεί ο φλεγμονώδης φαινότυπος, ενώ μετά περίπου 40 έτη, η πλειοψηφία των ασθενών θα έχει διατιτραίνουσα ή, πιο σπάνια, στενωτική νόσο. Το συνολικό ποσοστό επιπλοκών στην 20ετία φαίνεται να κυμαίνεται γύρω στο 60% ή 52%, αν εξαιρεθεί η περιεδρική νόσος¹⁹⁷. Γενικά, η νόσος του ΛΕ είναι πιο πιθανό να

εμφανίζει επιπλοκές κατά τη διάγνωση ή τα πρώτα χρόνια μετά, ενώ η κολίτιδα μπορεί να παραμείνει ανεπίπλεκτη ή φλεγμονώδης για πολλά έτη¹⁹⁸ (εικόνα 1).

Η NC γίνεται συμπτωματική όταν οι αλλοιώσεις είναι εκτεταμένες, σχετίζονται με συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση ή όταν εμφανίζονται επιπλοκές όπως στενώσεις, αποστήματα ή συρίγγια. Η εξέλιξη της νόσου χαρακτηρίζεται από περιόδους ύφεσης και έξαρσης, ποικίλης διάρκειας, ενώ σε ένα 10-15% των ασθενών ακολουθεί μια πιο χρόνια, συνεχή πορεία¹⁹⁹. Η κολίτιδα συνήθως εμφανίζει περισσότερα συμπτώματα, με συχνές εξωεντερικές εκδηλώσεις, ενώ η νόσος του ΛΕ μπορεί να παραμείνει λανθάνουσα για αρκετά έτη. Οι εξωεντερικές εκδηλώσεις ποικίλλουν: αρθρίτιδα, οζώδες ερύθημα, ιριδοκυκλίτιδα και ραγοειδίτιδα, αφθώδης στοματίτιδα και γαγγραινώδες πυόδερμα είναι οι πιο συχνές^{200,201}. Δεν υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στα συμπτώματα και την πρόοδο της ανατομικής βλάβης. Στενώσεις και συρίγγια μπορούν να διαδράμουν ασυμπτωματικά για χρόνια, τη στιγμή που μία εντοπισμένη, ανεπίπλεκτη ειλεΐτιδα μπορεί να εκδηλωθεί με πολύ έντονη συμπτωματολογία. Αντίθετα, η βλεννογονική επούλωση σχετίζεται με παρατεινόμενη κλινική ύφεση, μικρότερη ανάγκη για στεροειδή και μειωμένα ποσοστά νοσηλείας και χειρουργικής επέμβασης²⁰². Υπάρχουν μερικοί παράγοντες που σχετίζονται με χειρότερη πρόγνωση κατά τα πρώτα έτη της νόσου.

Στην 20ετία, περίπου το 70-80% των ασθενών με NC θα χρειασθούν χειρουργική επέμβαση^{199,203-205}. Πολλοί ασθενείς (περίπου 30%) εμφανίζουν υποτροπή της νόσου και χρήζουν επανεπέμβασης μετά από 10 έτη¹⁹⁹. Κάθε χρόνο, 3-5% των ασθενών απαιτούν επέμβαση, ενώ κάθε ασθενής με NC θα υποβληθεί σε επέμβαση κατά μέσο όρο σε ένα χρονικό ορίζοντα 15-20 ετών²⁰⁶. Τα ποσοστά αυτά παραμένουν σταθερά από το 1950 έως το 2000²⁰⁷. Τα ανοσοκατασταλτικά²⁰⁸ και οι βιολογικοί παράγοντες^{209,210} μπορούν να ελαττώσουν την ανάγκη επέμβασης αλλά θα πρέπει να χορηγηθούν νωρίς, πριν την ανάπτυξη μη αναστρέψιμων ανατομικών βλαβών²¹¹. Η κολεκτομή δεν προστατεύει από υποτροπή της νόσου στο ΛΕ²¹². Σε ασθενείς με ανθεκτική ενεργό περιεδρική νόσο, πιθανώς να χρειασθεί μόνιμη παράκαμψη του ΠΕ^{213,214}. Τελικά, πάνω από 10% των ασθενών με NC θα χρειασθούν μόνιμη παράκαμψη του ΠΕ, με εκείνους με νόσο ΠΕ και πρωκτική στένωση να διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο²¹⁵.



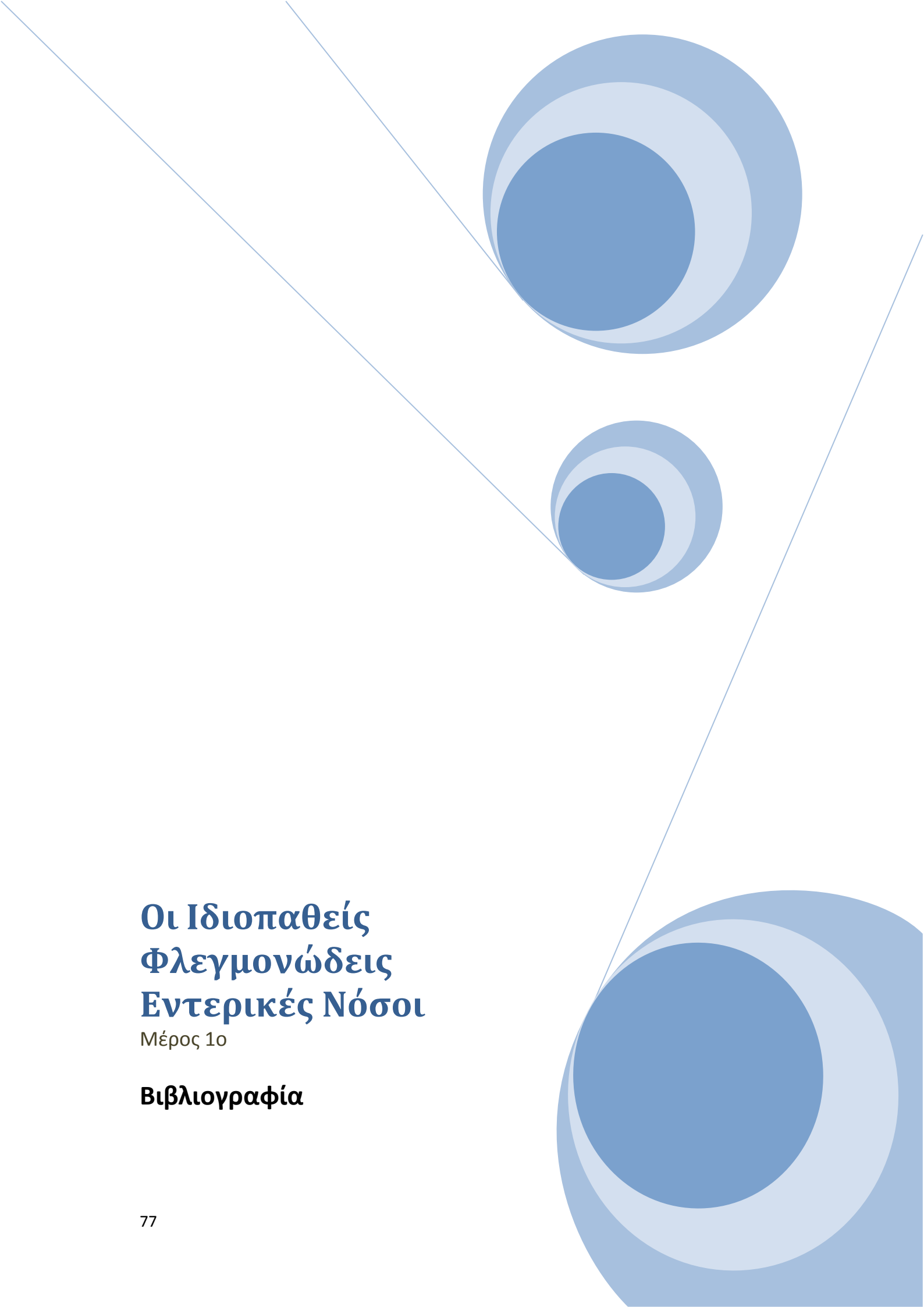
Εικόνα 1. Αθροιστικό ποσοστό ελεύθερο διαιτηραίνοντων ή στενωτικών επιπλοκών σε NC ειλεού (αριστερά) και παχέος εντέρου (δεξιά). Δεν υπολογίστηκαν οι περιεδρικές επιπλοκές. Τα δεδομένα βασίζονται σε μελέτες του νοσοκομείου St-Antoine που περιέλαβαν 1448 ασθενείς με νόσο ειλεού (L1) και 1129 ασθενείς με νόσο παχέος εντέρου (L2). © Acta Gastro-Enterologica Belgica (Cosnes J, Acta Gastroenterol Belg 2008;71:303–307) (Πηγή: αναφορά 5)

5.2. Ελκώδης Κολίτιδα⁵

Η ΕΚ προσβάλλει το ΠΕ και εκτείνεται με συνεχή τρόπο και συνήθως με κατεύθυνση από περιφερικότερα προς εγγύτερα. Οι βλάβες είναι γενικά διάχυτες και επιφανειακές, με βαθειά έλκη να παρατηρούνται σε βαρεία νόσο. Κατά τη διάγνωση, στο 1/3 των ασθενών η φλεγμονή περιορίζεται στο ορθό, στο 1/3 εκτείνεται έως τη σπληνική καμπή και στο 1/3 εκτείνεται εγγύτερα της σπληνικής καμπής²¹⁶. Πανκολίτιδα παρατηρείται στο 25% των ασθενών. Μερικοί ασθενείς έχουν προσβολή στο τυφλό ή περίξ της σκωληκοειδούς απόφυσης με ταυτόχρονη άπω εντόπιση νόσου, χωρίς αυτό να εμφανίζει ιδιαίτερη κλινική σημασία^{217,218}. Στους ενήλικες σχεδόν πάντοτε φλεγμαίνει το ορθό²¹⁹, ενώ στα παιδιά όχι²²⁰. Κατά την εξέλιξη της νόσου, αυτή επεκτείνεται κεντρομόλα και μετά από 20 έτη, σχεδόν το 50% των ασθενών θα έχει πανκολίτιδα²²¹. Στην πανκολίτιδα μπορούν να φλεγμαίνουν και τα τελευταία λίγα εκατοστά του τελικού ειλεού. Αυτή η ειλεΐτιδα εκ παλινδρόμησης παραμένει επιφανειακή, χωρίς βαθειά έλκη, στενώσεις ή συρίγγια. Η διάγνωση μπορεί να μεταβληθεί από ΕΚ σε NC σε 5-10% των ασθενών μετά από 25 έτη²²². Αυτό είναι πιο πιθανό σε ασθενείς με έναρξη της ΕΚ κατά την παιδική ηλικία, σε καπνιστές και σε εκείνους με οικογενειακό ιστορικό NC.

Η πορεία της νόσου χαρακτηρίζεται από εξάρσεις και υφέσεις, με ένα μικρό ποσοστό να έχει συνεχή ενεργότητα. Η βαρύτητα των εξάρσεων κυμαίνεται από ήπια συμπτώματα χωρίς συστηματική συμμετοχή μέχρι θανατηφόρο κεραυνοβόλο κολίτιδα που δεν απαντά σε θεραπεία και χρήζει κολεκτομής. Η ύφεση σχετίζεται με τη βλεννογονική επούλωση: ένα χρόνο μετά την έναρξη της νόσου, περίπου 50% των ασθενών θα βρίσκονται σε κλινική και ενδοσκοπική ύφεση. Σε αυτούς τους ασθενείς, ο κίνδυνος κολεκτομής είναι μικρότερος συγκριτικά με τους ασθενείς χωρίς βλεννογονική επούλωση. Εξωεντερικές εκδηλώσεις θα εμφανίσει περίπου το 31% των ασθενών. Η ΕΚ συνήθως είναι βαρύτερη σε παιδιά, με συχνές υποτροπές και μικρότερη ανταπόκριση στη θεραπευτική αγωγή²²³. Η ενεργότητα τείνει να μειώνεται συν τω χρόνω: περίπου 40-50% των ασθενών θα βρίσκονται σε παρατεταμένη ύφεση μετά από μερικά χρόνια, ενώ 30% θα εμφανίζουν ενεργό νόσο. Ένα τρίτο των ασθενών δεν θα εμφανίσει υποτροπή στη 10ετία, μετά την πρώτη προσβολή, αν και η βαρύτητα της τελευταίας δεν προκαθορίζει την πρόγνωση²²².

Η πιθανότητα κολεκτομής κυμαίνεται γύρω στο 20-30% στην 25ετία, με το ποσοστό να είναι μικρότερο σε μελέτες από τη νότια Ευρώπη^{222,224,225}. Η πιθανότητα κολεκτομής είναι υψηλότερη κατά τον πρώτο χρόνο της διάγνωσης και φτάνει στο 10%²²². Οι καλύτεροι προγνωστικοί δείκτες για κολεκτομή είναι η έκταση της νόσου και η βαρύτητα των συμπτωμάτων κατά τη διάγνωση²²². Ασθενείς που υποβλήθηκαν σε κολεκτομή και έχουν νεολήκυθο και ειλεο-ορθική αναστόμωση βρίσκονται σε κίνδυνο για ανάπτυξη ληκυθήτιδας, σε ποσοστό 50% στην 5ετία μετά την επέμβαση²²⁶.

The page features a decorative graphic consisting of three blue circles of varying sizes, each with a lighter blue ring around its center. These circles are arranged vertically and are connected by thin blue lines that extend from the top-left and bottom-right corners of the page towards the center, creating a sense of depth and movement.

Οι Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Εντερικές Νόσοι

Μέρος 1ο

Κεφάλαιο 6: Ταξινόμηση

Κατά καιρούς έχουν παρουσιασθεί διάφορα συστήματα ταξινόμησης των ΙΦΕΝ, ανάλογα με την παράμετρο ή τις παραμέτρους που εξετάζονται κάθε φορά²²⁷. Ωστόσο, είναι δύσκολο να καθιερωθεί ένα ενιαίο σύστημα λόγω τόσο της ετερογένειας που εμφανίζουν στην κλινική-ενδοσκοπική-ιστολογική-απεικονιστική εικόνα, όσο και λόγω των διαφορετικών αναγκών που πρέπει να καλύπτουν τα συστήματα ταξινόμησης μεταξύ της καθημερινής κλινικής πρακτικής και των επιστημονικών μελετών.

Στη NC, τα προτεινόμενα μοντέλα ταξινόμησης έχουν βασισθεί κυρίως στο φαινότυπο (ταξινόμηση της Ρώμης, ταξινόμηση της Βιέννης και μεταγενέστερη τροποποίηση αυτής κατά Montreal⁴) (πίνακας 1) και στην ενεργότητα της νόσου (CDAI²²⁸, Harvey Bradshaw²²⁹), ενώ έχουν προταθεί και επιμέρους δείκτες για την περιεδρική νόσο (PDAI²³⁰) και για την ενδοσκοπική (CDEIS²³¹, Rutgeerts²³²) και ιστολογική²³³ εικόνα.

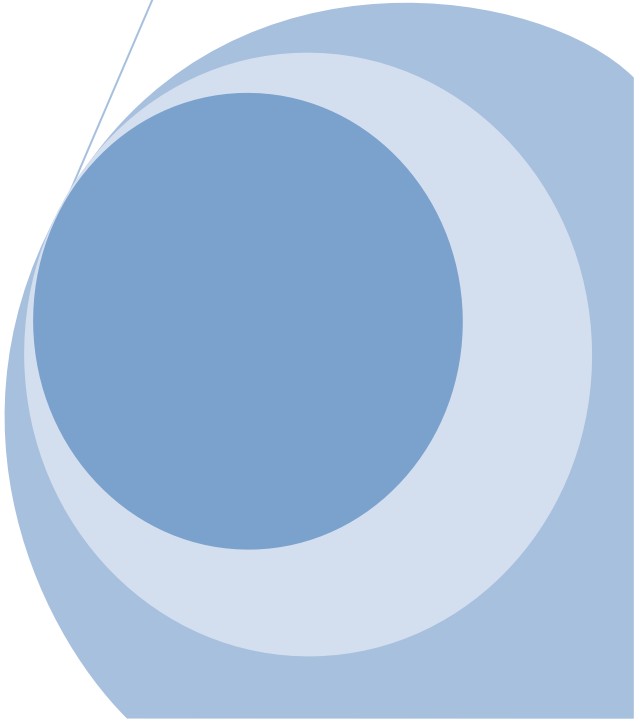
Στην ΕΚ, η ταξινόμηση με βάση την εντόπιση της νόσου περιλαμβάνεται στην τροποποιημένη κατά Montreal ταξινόμηση της Βιέννης (πίνακας 1), ενώ δείκτες έχουν προταθεί με βάση μόνο την ενεργότητα της νόσου (Truelove-Witts²³⁴, Powell-Tuck ή St. Mark's²³⁵, CAI ή Rachmilewitz²³⁶, Seo²³⁷, τροποποιημένος Truelove-Witts ή Lichtiger²³⁸, SCCAI ή Walmsey²³⁹, UCCS²⁴⁰), μόνο την ενδοσκοπική εικόνα (Baron²⁴¹, τροποποίηση αυτού κατά Feagan²⁴²) ή και συνδυασμό των δύο (DAI ή Mayo²⁴³⁻²⁴⁷ και Sutherland²⁴⁸).

Είναι αξιοσημείωτο ότι όλα τα προαναφερθέντα συστήματα παρουσιάζουν αρκετές αδυναμίες για διάφορους λόγους:

- Δεν αντιπροσωπεύουν όλους τους παρατηρούμενους φαινότυπους των δύο νόσων,
- Ο φαινότυπος ενός ασθενή μπορεί να μεταβληθεί κατά τη φυσική εξέλιξη της νόσου,
- Πολλοί δείκτες συχνά περιλαμβάνουν υποκειμενικά κριτήρια,
- Διάφοροι εξ' αυτών δεν έχουν αναπαραχθεί και πιστοποιηθεί σε ικανό αριθμό διαδοχικών, καλά σχεδιασμένων μελετών,
- Αρκετοί από τους δείκτες δεν έχουν εύκολη και πρακτική εφαρμογή στην καθημερινή κλινική πρακτική^{249,250}.

| Ταξινόμηση ΙΦΕΝ κατά Montreal | | |
|--------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| Ηλικία διάγνωσης (NC) | | |
| A1 | < 16 ετών | |
| A2 | 17-40 ετών | |
| A3 | > 40 ετών | |
| Εντόπιση νόσου (NC) | | + Ανώτερο πεπτικό (L4) |
| L1 | Τελικός ειλεός | L1+L4 |
| L2 | Παχύ έντερο | L2+L4 |
| L3 | Ειλεός + παχύ έντερο | L3+L4 |
| L4 | Ανώτερο πεπτικό | |
| Συμπεριφορά νόσου (NC) | | + Περιεδρική νόσος (p) |
| B1 | Μη στενωτική – Μη διατρητική | B1p |
| B2 | Στενωτική | B2p |
| B3 | Διατρητική | B3p |
| Έκταση νόσου (ΕΚ) | | |
| E1 | Ελκώδης πρωκτίτις | |
| E2 | Αριστερή κολίτις | |
| E3 | Εκτεταμένη κολίτις | |

Πίνακας 1. Ταξινόμηση των ΙΦΕΝ κατά Montreal. (Πηγή: αναφορά 227)



Οι Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Εντερικές Νόσοι

Μέρος 1ο

**Κεφάλαιο 7: Διαγνωστική
προσέγγιση και διερεύνηση**

7.1. Νόσος Crohn²⁵¹

7.1.1. Κλινική προσέγγιση

Η τρέχουσα άποψη για τη διάγνωση των ΙΦΕΝ είναι ότι αυτή γίνεται στη βάση του συνδυασμού κλινικών, ενδοσκοπικών, απεικονιστικών, ιστολογικών και ορολογικών κριτηρίων. Τα συμπτώματα της NC είναι ετερογενή, αλλά συχνότερα περιλαμβάνουν διάρροια για περισσότερο των 6 εβδομάδων, κοιλιακό άλγος και/ή απώλεια βάρους. Τέτοια συμπτώματα θα πρέπει να εγείρουν την υποψία NC, ειδικά σε νεαρά άτομα. Επίσης, συχνά είναι και άλλα συμπτώματα, όπως κόπωση, αδυναμία, ανορεξία και πυρετός. Η νόσος του τελικού ειλεού μπορεί πολύ συχνά να μιμείται την οξεία σκωληκοειδίτιδα. Επίσης, η νόσος μπορεί να εκδηλωθεί με άτυπα συμπτώματα, όπως συμπτώματα που προσομοιάζουν το σύνδρομο ευερεθίστου εντέρου, ανεξήγητη αναιμία ή καθυστέρηση της ανάπτυξης σε παιδιά²⁵²⁻²⁵⁵. Το κοιλιακό άλγος και η απώλεια βάρους εμφανίζονται στο 70% και 60% των ασθενών, αντίστοιχα. Πρόσμιξη αίματος ή/και βλέννης στα κόπρανα μπορεί να εμφανισθεί στο 40-50% των ασθενών με νόσο ΠΕ²⁵⁶. Πολλές φορές οι εξωεντερικές εκδηλώσεις προηγούνται των εντερικών συμπτωμάτων και είναι συχνότερες στη νόσο του ΠΕ²⁵⁷. Περιεδρικά συρίγγια ανευρίσκονται στο 10% των ασθενών κατά τη διάγνωση και μπορεί να είναι το κύριο σύμπτωμα²⁵⁸. Ένα πλήρες ιστορικό θα πρέπει να περιλαμβάνει στοιχεία σχετικά με την έναρξη των συμπτωμάτων, πρόσφατα ταξίδια, διατροφικές δυσανεξίες, λήψη φαρμάκων (περιλαμβανομένων αντιβιοτικών και ΜΣΑΦ) και ιστορικό σκωληκοειδεκτομής. Επίσης, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη αποδεδειγμένοι παράγοντες κινδύνου, όπως το κάπνισμα, το οικογενειακό ιστορικό και πρόσφατη λοιμώδης γαστρεντερίτιδα²⁵⁹⁻²⁶¹. Αξιόλογα στοιχεία επίσης αποτελούν τα νυκτερινά συμπτώματα και συμπτώματα και σημεία εξωεντερικών εκδηλώσεων.

7.1.2. Εργαστηριακή προσέγγιση

Η αναιμία και η θρομβοκυτάρωση αποτελούν τα πιο συχνά ευρήματα στη γενική αίματος. Η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) και η ταχύτητα καθίζησης ερυθρών (ΤΚΕ) αντιστοιχούν στους δείκτες εκτίμησης του βαθμού της φλεγμονώδους αντίδρασης. Η ΤΚΕ συσχετίζεται καλύτερα με τη νόσο ΠΕ παρά με την ειλεΐτιδα²⁶². Η εκτίμηση των δεικτών φλεγμονής στα κόπρανα φαίνεται να σχετίζεται ισχυρά με την εντερική φλεγμονή, ειδικά της calprotectin των κοπράνων, η οποία έχει θετική προγνωστική αξία 85-90% στη διάκριση μεταξύ ΙΦΕΝ και συνδρόμου ευερεθίστου εντέρου²⁶³⁻²⁶⁷, και της lactoferrin^{263,267}. Φαίνεται πάντως ότι ίσως τέτοιοι δείκτες έχουν μεγαλύτερη

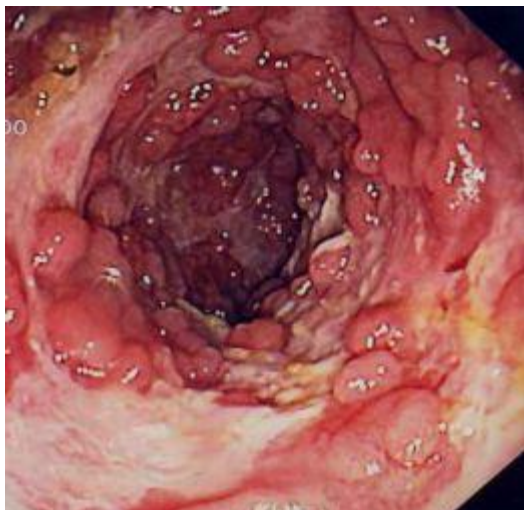
διακριτικότητα στην πρόβλεψη της υποτροπής παρά στην αρχική διάγνωση της νόσου. Νεότεροι δείκτες των κοπράνων, όπως ο S100A12, μπορεί να εμφανίζουν βελτιωμένη διαγνωστική ακρίβεια^{268,269}, αν και καμία παράμετρος δεν είναι τόσο ειδική ώστε να διαφοροδιαγιγνώσκει από την ΕΚ ή την εντερική λοίμωξη. Μεγάλη αξία έχει επίσης ο έλεγχος των κοπράνων για την τοξίνη του *Clostridium difficile*²⁷⁰. Ορολογικοί δείκτες μπορεί να έχουν κάποια αξία στη διάγνωση, συμπληρωματικά, αλλά η ακρίβεια των καλύτερων από τους διαθέσιμους δείκτες (ASCA & ANCA) είναι τέτοια που είναι αδύνατο να είναι χρήσιμοι στη διάγνωση ρουτίνας, και είναι αναποτελεσματικοί στο διαχωρισμό Crohn's κολίτιδας από ΕΚ^{271,272}. Άλλοι ορολογικοί δείκτες, όπως ο anti-OmpC και ο CBir1, δε φαίνεται να βοηθούν επίσης στο διαχωρισμό NC από ΕΚ²⁷³⁻²⁷⁵.

7.1.3. Ενδοσκοπική προσέγγιση

Σε υποψία NC, η αρχική διαγνωστική εξέταση εκλογής είναι η ειλεοκολonosκόπηση με λήψη βιοψιών από τον τελικό ειλέο και το ΠΕ, η οποία εκτιμά με υψηλή ειδικότητα την έκταση και τη βαρύτητα των φλεγμονωδών αλλοιώσεων²⁷⁶⁻²⁷⁹. Το χαρακτηριστικό ενδοσκοπικό εύρημα είναι οι ασυνεχείς βλάβες και η εμφάνιση αλλοιώσεων εν μέσω μακροσκοπικώς φυσιολογικού βλεννογόνου. Στα πρώιμα στάδια παρατηρείται μόνο μη ειδικό εστιακό (κηλιδώδες) ερύθημα και οίδημα, και ευθυπτότητα. Χαρακτηριστικό ενδοσκοπικό εύρημα είναι οι αφθοειδείς διαβρώσεις και εξελκώσεις. Τα έλκη μπορεί να είναι γραμμοειδή, ερπυστικά, εκτεταμένα, βαθιά και συρρέοντα. Η οζώδης διαμόρφωση του βλεννογόνου μεταξύ των επιμήκων και εγκάρσιων βαθέων ελκών δίνει τη χαρακτηριστική εικόνα του «πλακόστρωτου». Σε βαρεία προσβολή παρατηρείται διάχυτη βλεννογόνο αιμορραγία. Σε νόσο με μακρά διαδρομή μπορεί να παρατηρηθούν φλεγμονώδεις ψευδοπολύποδες και στενώσεις, οι οποίες σε αντίθεση με την ΕΚ, οφείλονται σε ίνωση του τοιχώματος του εντέρου και προκαλούν συχνά αποφρακτικά φαινόμενα. Στη διαιτράινουσα μορφή της νόσου παρατηρούνται στόμια συριγγίων. Αντίθετα από το ΠΕ, στον τελικό ειλέο η προσβολή είναι συνήθως διάχυτη. Ο βλεννογόνος ελέγχεται οίδηματώδης και ερυθματώδης, με κηλιδώδη αιμορραγικά στίγματα, επιμήκη έλκη και εικόνα πλακόστρωτου²⁸⁰ (εικόνα 1).

7.1.4. Απεικονιστική προσέγγιση

Σχετικά με τη χαρτογράφηση της νόσου, η μαγνητική και η αξονική εντερογραφία ή εντερόκλυση είναι οι απεικονιστικές τεχνικές με την υψηλότερη διαγνωστική ακρίβεια στην ανίχνευση της εντερικής προσβολής και των



Εικόνα 1. Χαρακτηριστική ενδοσκοπική εικόνα Νόσου Crohn.

διαιτηρικών βλαβών στη NC. Η αξονική και η μαγνητική τομογραφία μπορούν να εκτιμήσουν την έκταση και τη βαρύτητα της νόσου, με βάση το πάχος του εντερικού τοιχώματος και την αυξημένη πρόσληψη του ενδοφλέβιου σκιαγραφικού. Επίσης, μπορούν να αναδείξουν πολύ καλά την παρουσία εξωαυλικών επιπλοκών²⁸¹⁻²⁸⁶. Η αξονική και η μαγνητική τομογραφία έχουν παρόμοια ακρίβεια στην ανίχνευση φλεγμονωδών αλλοιώσεων του ΛΕ²⁸⁷. Η διαγνωστική ακρίβεια μεταξύ εντερογραφίας και εντερόκλυσης (τόσο αξονικής όσο και μαγνητικής) δεν παρουσιάζει μεγάλη διαφορά^{282,288}. Η υπερηχοτομογραφία έχει θέση σαν συμπληρωματική τεχνική στην εκτίμηση της φλεγμονής του εντέρου, ειδικά με τη χρήση ενισχυτικής ουσίας και της τεχνικής Doppler²⁸⁹⁻²⁹¹. Το σπινθηρογράφημα λευκών αιμοσφαιρίων είναι μία ασφαλής, μη επεμβατική μέθοδος εκτίμησης της έκτασης και βαρύτητας της φλεγμονής, όμως περιορίζεται από την έκθεση σε ακτινοβολία και τη χαμηλή ευαισθησία, ειδικά σε ασθενείς υπό αγωγή με στεροειδή²⁹². Η ενδοσκόπηση του ΛΕ με ασύρματη ενδοσκοπική κάψουλα έχει υψηλότερη ευαισθησία συγκριτικά με την αξονική/μαγνητική τομογραφία στη διάγνωση των βλαβών του ΛΕ, ειδικότερα των επιφανειακών βλεννογονικών αλλοιώσεων^{293,294}. Η ενδοσκοπική κάψουλα μπορεί να αποτελέσει εξέταση δεύτερης γραμμής σε ασθενείς με υψηλή υποψία NC και αρνητικό ενδοσκοπικό και απεικονιστικό έλεγχο. Φυσιολογικό αποτέλεσμα ενδοσκοπικής κάψουλας έχει πολύ υψηλή αρνητική διαγνωστική αξία για τον αποκλεισμό της νόσου του ΛΕ. Το μειονέκτημα της ενδοσκοπικής κάψουλας είναι η χαμηλή ειδικότητα. Η ενδοσκόπηση του ΛΕ με διπλό μπαλόνι (Double balloon enteroscopy, DBE) έχει επίσης υψηλότερη ευαισθησία στην ανάδειξη των βλαβών του ΛΕ σε σχέση με την ΥΤ και τη ΜΤ, όμως είναι επεμβατική μέθοδος και έχει περισσότερες επιπλοκές από την ενδοσκοπική κάψουλα. Υπερέχει όμως αυτής στη λήψη βιοψιών και στους θεραπευτικούς χειρισμούς²⁹⁵.

7.1.5. Ιστοπαθολογική προσέγγιση

Για την ιστολογική διάγνωση της NC απαιτούνται πολλαπλές (σημ.: τουλάχιστον 2 από κάθε σημείο) βιοψίες από τουλάχιστον 5 σημεία του ΠΕ και του ειλεού²⁹⁶⁻³⁰⁴. Προτιμότερη είναι η λήψη βιοψιών τόσο από φλεγμαίνοντα όσο και από φυσιολογικό βλεννογόνο. Τα ευρέως αποδεκτά ιστολογικά χαρακτηριστικά για τη διάγνωση της NC περιλαμβάνουν εστιακή (ασυνεχή) χρόνια φλεγμονώδη διήθηση από λεμφοκύτταρα και πλασματοκύτταρα και ακανόνιστη κατά τόπους χρόνια φλεγμονή ποικίλης βαρύτητας, εστιακή (ασυνεχή) διαταραχή των κρυπτών (τουλάχιστον σε ποσοστό >10%) και επιθηλιοειδή κοκκιώματα, μη σχετιζόμενα με την βλάβη των κρυπτών. Τα ίδια κριτήρια με την προσθήκη της διαταραχής της αρχιτεκτονικής των θηλών, χρησιμοποιούνται και για την ανάλυση των βιοψιών από τον τελικό ειλέο²⁵¹. Τα παραπάνω κριτήρια επιτυγχάνουν ευαισθησία και ειδικότητα >50% και μέτρια προς καλή επαναληψιμότητα, με ποσοστό συμφωνίας τουλάχιστον 80%³⁰⁴⁻³⁰⁷. Επί απουσίας κοκκιωμάτων, απαιτούνται 3 κριτήρια, ή –επί παρουσίας κοκκιώματος– ένα κριτήριο επιπλέον του κοκκιώματος³⁰⁸. Επιπλέον ιστολογικά χαρακτηριστικά που ανευρίσκονται στη NC είναι αυξημένα ενδοεπιθηλιακά λεμφοκύτταρα, εστιακή χρόνια φλεγμονή χωρίς ατροφία των κρυπτών, εστιακή κρυπτίτιδα^{301,309}, αφθοειδή έλκη, δυσανάλογη υποβλεννογόνια φλεγμονή, υπερπλασία νευρικών ινών³¹⁰ και κεντρομόλος θέση εξελκώσεων και αρχιτεκτονικής διαταραχής.

7.2. Ελκώδης Κολίτιδα²⁵¹

7.2.1. Κλινική προσέγγιση

Η διάγνωση στηρίζεται σε συνδυασμό κλινικών, ενδοσκοπικών και ιστολογικών ευρημάτων. Η συμπτωματολογία της ΕΚ εξαρτάται από την έκταση και τη βαρύτητα της νόσου και συνήθως περιλαμβάνει αιματηρή διάρροια, αιμορραγία από το ορθό ή/και αίσθημα τεινισμού και επιτακτικής κένωσης. Συχνά αναφέρονται νυκτερινές κενώσεις. Πυρετός, αδιαθεσία και ανορεξία είναι συστηματικά συμπτώματα που χαρακτηρίζουν συνήθως τη σοβαρή προσβολή. Αίμα στα κόπρανα εμφανίζεται σε πάνω από 90% των ασθενών. Οι ασθενείς με εκτεταμένη ενεργό νόσο παρουσιάζουν χρόνια διάρροια με αιμορραγία από το ορθό, ή τουλάχιστον αιματηρή πρόσμιξη στα κόπρανα. Επίσης εμφανίζουν επιτακτική κένωση, τεινισμό, αποβολή βλέννης, νυκτερινές κενώσεις και κολικοειδές κοιλιακό άλγος που υφίεται με την κένωση. Αντίθετα, οι ασθενείς με ορθίτιδα παρουσιάζουν αιμορραγία από το ορθό, επιτακτικότητα, τεινισμό και περιστασιακά σοβαρή δυσκοιλιότητα³¹¹⁻³²². Η εμφάνιση της νόσου ακολουθεί μία αργή

πορεία και τα συμπτώματα συνήθως υπάρχουν για εβδομάδες ή μήνες πριν την αναζήτηση ιατρικής βοήθειας. Η νόσος μπορεί να εμφανισθεί με διαλείποντα επεισόδια εξάρσεων ή ως σοβαρή προσβολή (περίπου στο 15%), με συστηματικά συμπτώματα, όπως απώλεια βάρους, πυρετό, ταχυκαρδία, ναυτία ή εμέτους³²³. Στο 10% των ασθενών, τα εντερικά συμπτώματα μπορεί να συνοδεύονται από εξωεντερικές εκδηλώσεις, ιδίως αξονική ή περιφερική αρθροπάθεια, επισκληρίτιδα και οζώδες ερύθημα, οι οποίες σπανίως μπορεί να προηγούνται των εντερικών συμπτωμάτων³²⁴. Το κάπνισμα έχει ένα προστατευτικό αποτέλεσμα στην ανάπτυξη και τη βαρύτητα της ΕΚ³²⁵⁻³²⁹. Η σκωληκοειδεκτομή φαίνεται να προστατεύει σχετικά με τη μελλοντική νόσηση από ΕΚ, αλλά και μειώνοντας τη βαρύτητά της αν αυτή εκδηλωθεί, με την προϋπόθεση ότι προηγήθηκε της ΕΚ και η διάγνωση της σκωληκοειδίτιδας ήταν «αληθής»³³⁰⁻³³⁴. Η χρήση μη-εκλεκτικών ΜΣΑΦ πιθανώς σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο έξαρσης της νόσου³³⁵⁻³³⁸. Το οικογενειακό ιστορικό ΝΚ ή ΕΚ αυξάνει τον κίνδυνο για εμφάνιση ΕΚ σε άλλα μέλη της οικογένειας (περίπου 10-15X)³³⁹. Το ιστορικό θα πρέπει να περιλαμβάνει στοιχεία σχετικά με τα προαναφερθέντα κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου, πρόσφατα ταξίδια, διατροφικές δυσανεξίες, λήψη φαρμάκων (περιλαμβανομένων αντιβιοτικών και ΜΣΑΦ), ιστορικό σκωληκοειδεκτομής και καπνίσματος, σεξουαλικές συνήθειες. Επίσης, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη το οικογενειακό ιστορικό και πρόσφατη λοιμώδης γαστρεντερίτιδα. Αξιόλογα στοιχεία επίσης αποτελούν τα νυκτερινά συμπτώματα και συμπτώματα και σημεία εξωεντερικών εκδηλώσεων. Το μοτίβο της νόσου συνήθως σταθεροποιείται μέσα στην πρώτη ζετία, με τις υποτροπές να χαρακτηρίζονται συχνές (2 ή περισσότερες/έτος) ή ασυνήθεις (έως 1/έτος).

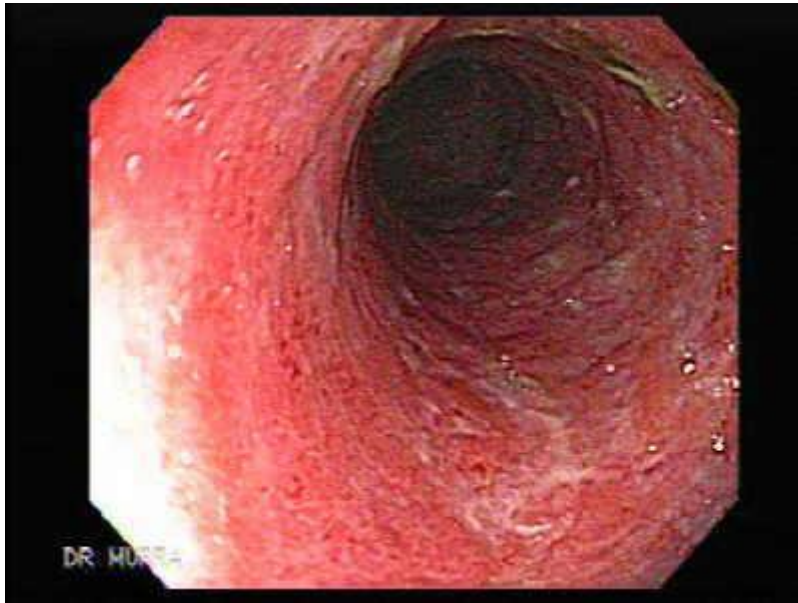
7.2.2. Εργαστηριακή προσέγγιση

Η εργαστηριακή προσέγγιση περιλαμβάνει το βασικό αιματολογικό και βιοχημικό έλεγχο καθώς και CRP & ΤΚΕ για την παρακολούθηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία, σε περίπτωση βαρείας προσβολής. Συνιστάται πάντοτε ο έλεγχος για λοιμώδη διάρροια, με ανίχνευση της τοξίνης του *Clostridium difficile*, ειδικά σε ανθεκτικές υποτροπές ή όταν υπάρχει ιστορικό λήψεως αντιβιοτικών εντός 3μήνου. Επίσης, σε ανθεκτική ή βαρεία νόσο, συνιστάται ο έλεγχος για κυτταρομεγαλοϊό (*Cytomegalovirus, CMV*)²⁵¹. Οι φλεγμονώδεις δείκτες των κοπράνων, γενικά δε θεωρούνται επαρκείς για τη συνήθη διαγνωστική διερεύνηση της ΕΚ. Αναφορικά με τους ορολογικούς δείκτες, τα pANCA (perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic

antibodies), συνήθως ανευρίσκονται στο 65% των ασθενών με ΕΚ και σε λιγότερο από 10% των ασθενών με ΝC^{340,341}.

7.2.3. Ενδοσκοπική προσέγγιση

Ενδοσκοπικά, η προσβολή του βλεννογόνου είναι συνεχής και συμμετρική, άρχεται δε πάντοτε από το ορθό. Η άφθονη παραγωγή βλέννας, που είναι ορατή ως ένα κρεμμώδες και λευκωπό επίχρισμα, είναι συχνό ενδοσκοπικό εύρημα πρώιμης νόσου ή υποτροπής. Σε ήπια νόσο, το αγγειακό δίκτυο του βλεννογόνου ελέγχεται θολερό, οι δε αγγειακοί κλάδοι είναι ανώμαλοι και παραμορφωμένοι. Ο βλεννογόνος έχει λεπτόκοκκη εμφάνιση με κατάργηση της φυσιολογικής αντανάκλασης του φωτός. Συνυπάρχει ερύθημα και ευθρυπτότητα του βλεννογόνου, καθώς και οίδημα, πάχυνση και άμβλυση της οξύτητας των μνηοειδών εντομών (εικόνα 2). Σε βαρύτερη προσβολή παρατηρείται βλεννοπυώδες επίχρισμα, διάχυτο βλεννογόσιο ερύθημα, έντονο οίδημα των πτυχών, αιμορραγική διαπότιση και εξελκώσεις. Οι τελευταίες είναι ποικίλλου μεγέθους (από λίγα χιλ έως αρκετά εκ) και σχήματος (γραμμοειδείς, ερπυστικές, ωοειδείς). Το σημαντικότερο ενδοσκοπικό χαρακτηριστικό δεν είναι ωστόσο οι εξελκώσεις, αλλά ο υποκείμενος, διαχύτως πάσχων βλεννογόνος. Κατά τη φάση της ύφεσης παρατηρείται υποστροφή των εξελκώσεων και επαναεπιθηλιοποίηση. Κατά την υποχώρηση της φλεγμονής και επί νόσου με μακρά διαδρομή, παρατηρούνται φλεγμονώδεις ψευδοπολύποδες, που οφείλονται στην υπερπλασία του μεταξύ των ελκών βλεννογόνου. Σε μακρά νόσο παρατηρούνται επίσης στενώσεις (οι οποίες αντίθετα από τη ΝC οφείλονται σε εστιακή μυική υπερτροφία και σύσπαση) και σηληνοειδής εμφάνιση του αυλού (εικόνα μολυβδοσωλήνα). Ενίοτε, παρατηρούνται βλάβες ενδεικτικές δυσπλασίας (Dysplasia Associated Lesions or Masses- DALM)²⁸⁰. Η εικονική κολονογραφία με ΥΤ ή ΜΤ δε φαίνεται να έχει προς το παρόν μεγάλη διαγνωστική αξία στην εκτίμηση της έκτασης της νόσου, σε ασθενείς με πιθανή ή επιβεβαιωμένη ΕΚ³⁴²⁻³⁴⁴. Κάθε στένωση του ΠΕ στην ΕΚ θα πρέπει να εγείρει την υποψία καρκίνου του ΠΕ και να διερευνάται καταλλήλως²⁵¹.



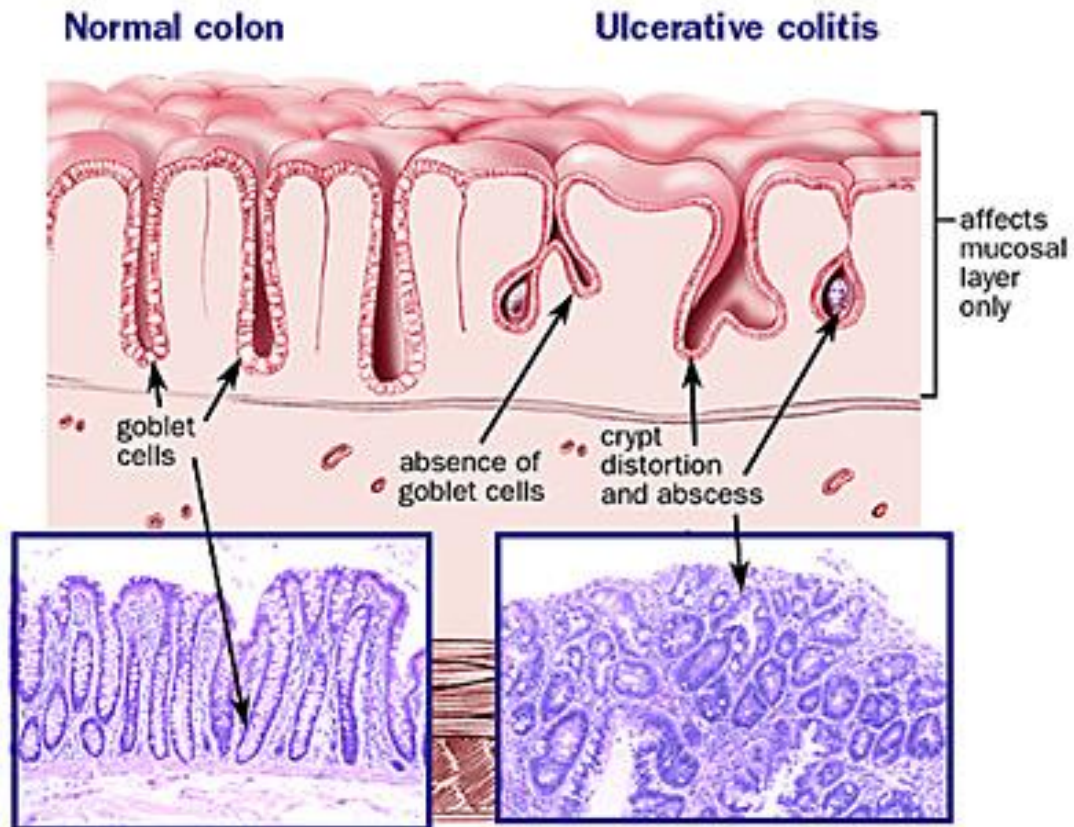
Εικόνα 2. Χαρακτηριστική ενδοσκοπική εικόνα Ελκώδους Κολίτιδας.

7.2.4. Ιστοπαθολογική προσέγγιση³⁴⁵

Το κύριο χαρακτηριστικό της οξείας φάσης είναι η παρουσία ουδετεροφίλων που διηθούν το επιθήλιο των κρυπών (κρυπτίτιδα) και σχηματίζουν κρυπτικά αποστημάτια, τα οποία τελικά προκαλούν ρήξη των κρυπών. Συνυπάρχουν επιφανειακές εξελκώσεις. Στην κεραυνοβόλο μορφή της νόσου, τα έλκη μπορεί να είναι βαθιά και διατοιχωματικά. Άλλα χαρακτηριστικά ιστολογικά ευρήματα είναι η διαταραχή της αρχιτεκτονικής δομής των κρυπών, η σημαντική μείωση του αριθμού των καλυκοειδών κυττάρων και η ομότιμος ενδοβλεννογόνιος κατανομή των λοιπών φλεγμονωδών στοιχείων (πλασματοκύτταρα, λεμφοκύτταρα, ηωσινόφιλα, μαστοκύτταρα). Τα φλεγμονώδη στοιχεία σπάνια διηθούν τη βλεννογόνια μυική στοιβάδα. Επιπρόσθετο ιστολογικό εύρημα είναι η αγγειακή διάταση και συμφόρηση.

Η φάση υποστροφής χαρακτηρίζεται από μείωση της αγγειακής διάτασης και εξαφάνιση των οξέων φλεγμονωδών στοιχείων και των κρυπτικών αποστηματίων. Παρατηρείται αναγέννηση του επιθηλίου και αποκατάσταση του αριθμού των καλυκοειδών κυττάρων στο επιθήλιο των κρυπών. Οι κρύπτες εμφανίζουν διαταραχή της αρχιτεκτονικής τους δομής- διακλαδιζόμενες, ελικοειδείς και διατεταμένες. Τα φλεγμονώδη στοιχεία του στρώματος μειώνονται σε αριθμό και συγκεντρώνονται εστιακά, προσδίδοντας ανισοτιμία στη φλεγμονή. Η φάση ύφεσης χαρακτηρίζεται από διαταραχή της αρχιτεκτονικής δομής των κρυπών και παρουσία μεταπλάσεως (τύπου

Paneth ή ψευδοπυλωρικού τύπου). Τα φλεγμονώδη στοιχεία του στρώματος αποτελούνται κυρίως από λεμφοκύτταρα και πλασματοκύτταρα, των οποίων ο αριθμός είναι λίγο μόνο αυξημένος. Ανευρίσκονται επίσης φλεγμονώδεις ψευδοπολύποδες και υπερπλασία των ενδοκρινικών κυττάρων (εικόνα 3).



Εικόνα 3. Σχηματική σύνοψη ιστολογικών διαταραχών στην ΕΚ.



Οι Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Εντερικές Νόσοι

Μέρος 1ο

Κεφάλαιο 8: Θεραπευτική αντιμετώπιση

8.1. Νόσος Crohn³⁴⁶

Tο θεραπευτικό πλάνο για ένα ασθενή με NC θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη την ενεργότητα, την εντόπιση και τη συμπεριφορά της νόσου και θα πρέπει πάντοτε να συζητείται με τον ασθενή. Θα πρέπει να αποκλείονται άλλα αίτια των συμπτωμάτων και είναι απαραίτητη η αντικειμενική εκτίμηση της ενεργότητας της νόσου, προ της έναρξης ή της αλλαγής θεραπευτικής αγωγής. Η απόφαση για τη χρήση ενός φαρμάκου επηρεάζεται από την ισορροπία ανάμεσα στη θεραπευτική του δράση και τις πιθανές ανεπιθύμητες ενέργειες, την ανταπόκριση σε προηγούμενα θεραπευτικά σχήματα και την παρουσία εξωεντερικών εκδηλώσεων και άλλων επιπλοκών. Το θεραπευτικό σχήμα θα πρέπει να εξατομικεύεται όσο είναι δυνατόν στον κάθε ασθενή, για καλύτερα θεραπευτικά αποτελέσματα. Πολλές φορές μία θεραπευτική επιλογή σε περιπτώσεις ήπιας νόσου είναι η μη χορήγηση θεραπείας. Το γενικό θεραπευτικό πλαίσιο που ακολουθεί βασίζεται στις κατευθυντήριες οδηγίες του ECCO (European Crohn's & Colitis Organization), όπως αυτές δημοσιεύθηκαν μετά τη δεύτερη αναθεώρησή τους, το 2010 *[για λόγους οικονομίας και ομοιομορφίας παρουσιάζονται μόνο οι κατευθυντήριες οδηγίες, καθώς η ανάλυση και βιβλιογραφική τεκμηρίωση της κάθε μίας οδηγίας ξεχωριστά ξεφεύγει από τους σκοπούς της παρούσας παρουσίασης]*:

- 1. Εντοπισμένη ειλεοτυφλική νόσος, χαμηλής ενεργότητας:** η θεραπεία εκλογής είναι η Βουδεζονίδη 9 mg ημερησίως. Το όφελος από τη Μεσαλαζίνη είναι περιορισμένο. Αντιβιοτικά δεν συνιστώνται. Η μη-θεραπεία είναι μία επιλογή σε μερικούς ασθενείς με ήπια συμπτώματα.
- 2. Εντοπισμένη ειλεοτυφλική νόσος, μέτριας ενεργότητας:** θα πρέπει να θεραπεύεται με Βουδεζονίση 9 mg ημερησίως ή με συστηματικά κορτικοστεροειδή. Επί σηπτικών επιπλοκών μπορούν να προστεθούν αντιβιοτικά. Μία κατάλληλη επιλογή είναι επίσης η αζαθειοπρίνη/6-μερκαπτοπουρίνη ή η μεθοτρεξάτη, σε συνδυασμό με κορτικοστεροειδή. Η θεραπεία με παράγοντες εναντίον του παράγοντα νέκρωσης του όγκου (tumor necrosis factor, TNF) (anti-TNF παράγοντες) είναι μία επιλογή για ασθενείς με αντικειμενικά ευρήματα ενεργού νόσου, και με νόσο κορτικο-ανθεκτική ή – εξαρτώμενη ή με δυσανεξία σε αυτά. Οι κίνδυνοι θα πρέπει να λαμβάνονται σοβαρά υπόψη και να συζητώνται με τους ασθενείς.
- 3. Εντοπισμένη ειλεοτυφλική νόσος, υψηλής ενεργότητας:** θα πρέπει να θεραπεύεται αρχικά με συστηματικά κορτικοστεροειδή. Επί υποτροπής, η θεραπεία με anti-TNF με ή χωρίς ανοσοτροποποιητικό φάρμακο είναι μία

θεραπευτική επιλογή, σε ασθενείς με αντικειμενικά ενεργό νόσο. Σε ασθενείς με αραιά υποτροπιάζουσα νόσο, είναι κατάλληλη η επανέναρξη των στεροειδών με ένα ανοσοτροποποιητικό φάρμακο. Η χειρουργική επέμβαση αποτελεί πάντα μία εναλλακτική λύση και θα πρέπει να συζητείται με τους ασθενείς.

4. **Νόσος ΠΕ (Crohn's κολίτιδα):** η νόσος του ΠΕ θα πρέπει να θεραπεύεται με Σουλφασαλαζίνη αν είναι ήπια, ή με συστηματικά κορτικοστεροειδή. Επί υποτροπής, η θεραπεία με anti-TNF με ή χωρίς ανοσοτροποποιητικό φάρμακο είναι μία θεραπευτική επιλογή, σε ασθενείς με αντικειμενικά μέτρια ή σοβαρή ενεργό νόσο. Σε ασθενείς με αραιά υποτροπιάζουσα νόσο, είναι κατάλληλη η επανέναρξη των στεροειδών με ένα ανοσοτροποποιητικό φάρμακο. Η χειρουργική επέμβαση αποτελεί πάντα μία εναλλακτική λύση και θα πρέπει να συζητείται με τους ασθενείς, προ της έναρξης θεραπείας με anti-TNF ή ανοσοτροποποιητικά.
5. **Εκτεταμένη νόσος ΛΕ:** θα πρέπει να θεραπεύεται με συστηματικά κορτικοστεροειδή και θειοπουρίνες ή μεθοτρεξάτη. Επί υποτροπής, η θεραπεία με anti-TNF με ή χωρίς αζαθειοπρίνη είναι μία κατάλληλη επιλογή επί αντικειμενικά μέτρια ή σοβαρά ενεργού νόσου. Συνιστάται η επιπρόσθετη διαιτητική υποστήριξη. Οι χειρουργικές επιλογές θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη και να συζητώνται σε πρώιμο στάδιο. Οι ασθενείς με πτωχή πρόγνωση είναι οι πλέον κατάλληλοι για πρώιμη θεραπεία με θειοπουρίνες, μεθοτρεξάτη ή anti-TNF.
6. **Νόσος οισοφάγου & ανωτέρου πεπτικού:** θα πρέπει να θεραπεύεται με αναστολέα αντλίας πρωτονίων, και με συστηματικά κορτικοστεροειδή και θειοπουρίνες ή μεθοτρεξάτη, αν είναι απαραίτητο. Επί σοβαρής ή ανθεκτικής νόσου, η anti-TNF θεραπεία είναι μία επιλογή. Επί αποφρακτικών συμπτωμάτων, έχει θέση θεραπεία με διαστολές ή χειρουργική επέμβαση.
7. **Κορτικο-ανθεκτική νόσος:** συνιστάται anti-TNF παράγοντας, με ή χωρίς θειοπουρίνες ή μεθοτρεξάτη, μολονότι θα πρέπει να συζητηθούν και οι χειρουργικές επιλογές.
8. **Θεραπεία συντήρησης σε πρώτη εκδήλωση εντοπισμένης νόσου:** σε περίπτωση επαγωγής ύφεσης με στεροειδή, συνιστάται θειοπουρίνη ή μεθοτρεξάτη. Δεν υπάρχει στοιχειοθέτηση για την αποτελεσματικότητα του από του στόματος 5-αμινοσαλικυλικού οξέος. Διακοπή της θεραπείας είναι μία επιλογή σε κάποιους ασθενείς.

- 9. Υποτροπή εντοπισμένης νόσου:** θα πρέπει να γίνεται αύξηση της δόσης της θεραπείας συντήρησης. Τα στεροειδή δε θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ως θεραπεία συντήρησης. Σε εντοπισμένη νόσο θα πρέπει να συζητείται η χειρουργική θεραπεία.
- 10. Θεραπεία συντήρησης εκτεταμένης νόσου:** συνιστάται η αζαθειοπρίνη.
- 11. Κορτικο-εξαρτώμενη νόσος:** θα πρέπει να χορηγούνται θειοπουρίνες ή μεθοτρεξάτη με ή χωρίς παράγοντα anti-TNF και να συζητείται η χειρουργική θεραπεία.
- 12. Υποτροπή επί θεραπείας με αζαθειοπρίνη:** θα πρέπει να ελέγχεται η τήρηση της θεραπείας και να γίνεται βελτιστοποίηση της δόσης. Μπορεί να γίνει αλλαγή σε μεθοτρεξάτη ή anti-TNF. Σε εντοπισμένη νόσο θα πρέπει να συζητείται η χειρουργική θεραπεία.
- 13. Θεραπεία συντήρησης σε ύφεση με anti-TNF:** θα πρέπει να χορηγείται anti-TNF σε τακτικό σχήμα. Ο συνδυασμός με αζαθειοπρίνη είναι μία επιλογή ενώ η μονοθεραπεία με αζαθειοπρίνη μπορεί να τεθεί σε ασθενείς παρθένους σε θειοπουρίνες.
- 14. Διάρκεια θεραπείας συντήρησης:** σε θεραπεία με αζαθειοπρίνη, μπορεί να γίνει διακοπή αυτής μετά 4 έτη ύφεσης. Δεν υπάρχει οδηγία για τη διάρκεια θεραπείας με μεθοτρεξάτη ή anti-TNF, αν και η παρατεταμένη χρήση τους μπορεί να είναι μία επιλογή επί ενδείξεων. Θα πρέπει να συζητώνται με τον ασθενή τα οφέλη και οι κίνδυνοι.
- 15. Χειρουργική θεραπεία Νόσου Crohn:**
1. Η εντοπισμένη ειλεοτυφλική νόσος με αποφρακτικά συμπτώματα, χωρίς ενεργό φλεγμονή, θα πρέπει να αντιμετωπίζεται χειρουργικά.
 2. Η ενεργός νόσος του ΛΕ με συνοδό ενδοκοιλιακό απόστημα θα πρέπει να αντιμετωπίζεται με αντιβιοτικά και διαδερμική ή χειρουργική παροχέτευση, ακολουθούμενη από καθυστερημένη χειρουργική εκτομή, επί ενδείξεων.
 3. Η πλαστική των στενώσεων είναι μία ασφαλής εναλλακτική επιλογή στην εκτομή της νήστιδας/ειλεού, που όμως ενέχει τον κίνδυνο της υποτροπής και έχει παρόμοια βραχυ- και μακρο-πρόθεσμα αποτελέσματα. Η συμβατική πλαστική συνιστάται επί στενώσεων μήκους <10 εκ.

4. Σε τελική ειλεΐτιδα, μιμούμενη NC, που ανευρίσκεται τυχαία σε λαπαροτομή λόγω υποψίας σκωληκοειδίτιδας, δε θα πρέπει να γίνεται εκτομή.
5. Επί εντοπισμένης κολίτιδας (<1/3 του μήκους του ΠΕ), προτιμάται η εκτομή μόνο του προσβεβλημένου τμήματος.
6. Σε ασθενείς με προσβεβλημένα τα δύο άκρα του ΠΕ, που χρήζουν χειρουργικής επέμβασης, συνιστώνται δύο τμηματικές εκτομές.
7. Η ενδοσκοπική διαστολή των στενώσεων προτιμάται σε περιπτώσεις προσβάσιμων ενδοσκοπικά στενώσεων.
8. Η πλαστική στενώσεων του ΠΕ δε συνιστάται.
9. Η ειλεο-ορθική αναστόμωση μετά δημιουργία νεοληκύθου δε συνιστάται σε ασθενείς με Crohn's κολίτιδα.

8.2. Ελκώδης Κολίτιδα³⁴⁷

Οι γενικές αρχές θεραπείας της ενεργού ΕΚ στηρίζονται στον καθορισμό της ενεργότητας, της κατανομής (ορθίτις, αριστερή κολίτις, εκτεταμένη) και της συμπεριφοράς της νόσου (συχνότητα υποτροπών, εξέλιξη νόσου, ανταπόκριση σε προηγηθείσες θεραπείες, παρενέργειες θεραπειών, εξωεντερικές εκδηλώσεις) πριν τη λήψη θεραπευτικών αποφάσεων, σε συνεργασία με τον ασθενή. Έχει ιδιαίτερη σημασία η αναγνώριση της σοβαρής νόσου που χρήζει ενδονοσοκομειακής αντιμετώπισης και που δυνητικά είναι απειλητική για τη ζωή. Οι ασθενείς θα πρέπει να ενθαρρύνονται στη συμμετοχή στη λήψη των θεραπευτικών αποφάσεων για αυτούς. Η επιλογή της κατάλληλης θεραπευτικής προσέγγισης στηρίζεται σε πολλούς παράγοντες, που θα πρέπει να εξετασθούν στον κάθε ασθενή. Η απόφαση για τη χρήση ενός φαρμάκου επηρεάζεται από την ισορροπία ανάμεσα στη θεραπευτική του δράση και τις πιθανές ανεπιθύμητες ενέργειες, την ανταπόκριση σε προηγούμενα θεραπευτικά σχήματα και την παρουσία εξωεντερικών εκδηλώσεων και άλλων επιπλοκών. Το γενικό θεραπευτικό πλαίσιο που ακολουθεί βασίζεται στις κατευθυντήριες οδηγίες του ECCO (European Crohn's & Colitis Organization), όπως αυτές δημοσιεύθηκαν το 2008 *[για λόγους οικονομίας και ομοιομορφίας παρουσιάζονται μόνο οι κατευθυντήριες οδηγίες, καθώς η ανάλυση και βιβλιογραφική τεκμηρίωση της κάθε μίας οδηγίας ξεχωριστά ξεφεύγει από τους σκοπούς της παρούσας παρουσίασης]*:

1. **Ορθίτιδα:** η αρχική θεραπευτική προσέγγιση είναι τα υπόθετα Μεσαλαζίνης 1 gr, για ήπια ή μέτρια ενεργό νόσο. Εναλλακτικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν

υποκλυσμοί με αφρό Μεσαλαζίνης. Τα υπόθετα μπορούν να διανείμουν το φάρμακο στο ορθό πιο αποτελεσματικά από τους υποκλυσμούς, και είναι καλύτερα ανεκτά. Ο συνδυασμός μεσαλαζίνης τοπικά με μεσαλαζίνη από του στόματος ή τοπικά στεροειδή μπορεί να είναι πιο αποτελεσματικός από τη μονοθεραπεία και θα πρέπει να δοκιμάζεται σε περίπτωση κλιμάκωσης της θεραπείας. Η από του στόματος Μεσαλαζίνη είναι λιγότερο αποτελεσματική.

2. **Αριστερή ΕΚ:** η αριστερή ΕΚ ήπιας-μέτριας ενεργότητας θα πρέπει αρχικώς να αντιμετωπίζεται με τοπικά αμινοσαλικυλικά, σε συνδυασμό με μεσαλαζίνη από του στόματος >2 gr ημερησίως. Τα τοπικά στεροειδή ή η μεσαλαζίνη μόνη της είναι επίσης αποτελεσματικά, αλλά λιγότερο από τη συνδυαστική θεραπεία. Η τοπική μεσαλαζίνη είναι αποτελεσματικότερη των τοπικών στεροειδών. Τα από του στόματος αμινοσαλικυλικά μόνα τους είναι λιγότερο αποτελεσματικά. Τα συστηματικά κορτικοστεροειδή έχουν θέση επί μη ανταπόκρισης στη μεσαλαζίνη. Η σοβαρή αριστερή ΕΚ είναι συνήθως ένδειξη εισαγωγής στο νοσοκομείο για συστηματική θεραπεία.
3. **Εκτεταμένη ΕΚ:** η εκτεταμένη ΕΚ ήπιας-μέτριας βαρύτητας θα πρέπει αρχικώς να αντιμετωπίζεται με μεσαλαζίνη >2 gr ημερησίως, σε συνδυασμό με μεσαλαζίνη και τοπικά. Τα από του στόματος αμινοσαλικυλικά ως μονοθεραπεία επάγουν ύφεση μόνο σε μία μικρή μειοψηφία των ασθενών. Επί μη ανταπόκρισης, ή σε ασθενείς που ήδη βρίσκονται σε θεραπεία συντήρησης, συνιστώνται κορτικοστεροειδή συστηματικά. Η σοβαρή εκτεταμένη ΕΚ χρήζει συνήθως ενδονοσοκομειακής αντιμετώπισης.
4. **Βαρειά ΕΚ, οποιασδήποτε έκτασης:** για τον καθορισμό της βαρειάς ΕΚ χρησιμοποιούνται τα κριτήρια Truelove & Witts. Ασθενείς με ≥ 6 αιματηρές διάρροιες ημερησίως και σημεία συστηματικής τοξικότητας (ταχυκαρδία >90 σφ/λ, εμπύρετο $>37,8^{\circ}$ C, αιμοσφαιρίνη <10,5 g/dl ή ΤΚΕ>30 mm/h) θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ενδονοσοκομειακά, με εφ στεροειδή. Σε ασθενείς με δυσανεξία στα εφ στεροειδή, μπορεί να χορηγηθεί μονοθεραπεία με εφ κυκλοσπορίνη. Απαραίτητη είναι η συνεργασία με χειρουργό.
5. **Ανθεκτική σε εφ στεροειδή ΕΚ, οποιασδήποτε έκτασης:** η ανταπόκριση στα εφ στεροειδή αξιολογείται καλύτερα την ή γύρω στην 3^η ημέρα (βάσει του αριθμού κενώσεων, της CRP και της ακτινογραφίας κοιλίας). Θεραπεία δεύτερης γραμμής μπορεί να περιλαμβάνει είτε κυκλοσπορίνη, είτε infliximab, είτε tacrolimus. Επί επιδείνωσης, συνιστάται κολεκτομή. Επί μη βελτίωσης

εντός επιπλέον 4-7 ημερών, συνιστάται επίσης κολεκτομή ή εξειδικευμένη θεραπεία σε κέντρο αναφοράς.

6. Θεραπεία υποτροπής: οι ασθενείς που υποτροπιάζουν θα πρέπει να θεραπεύονται με τον ίδιο παράγοντα στον οποίο ανταποκρίθηκαν προηγουμένως.

7. Κορτικο-εξαρτώμενη ενεργός ΕΚ: συνιστάται θεραπεία με αζαθειοπρίνη.

8. ΕΚ ανθεκτική σε από του στόματος στεροειδή: συνιστάται θεραπεία με αζαθειοπρίνη/μερκαπτοπουρίνη καθώς και συζήτηση σχετικά με την επιλογή χειρουργικής θεραπείας. Εναλλακτικά, μπορούν να χορηγηθούν εφ στεροειδή, infliximab ή αναστολείς calcineurin (cyclosporin, tacrolimus).

9. ΕΚ ανθεκτική σε ανοσοτροποποιητικά: συνιστάται θεραπεία με infliximab ή χειρουργική εκτομή.

10. Θεραπεία συντήρησης:

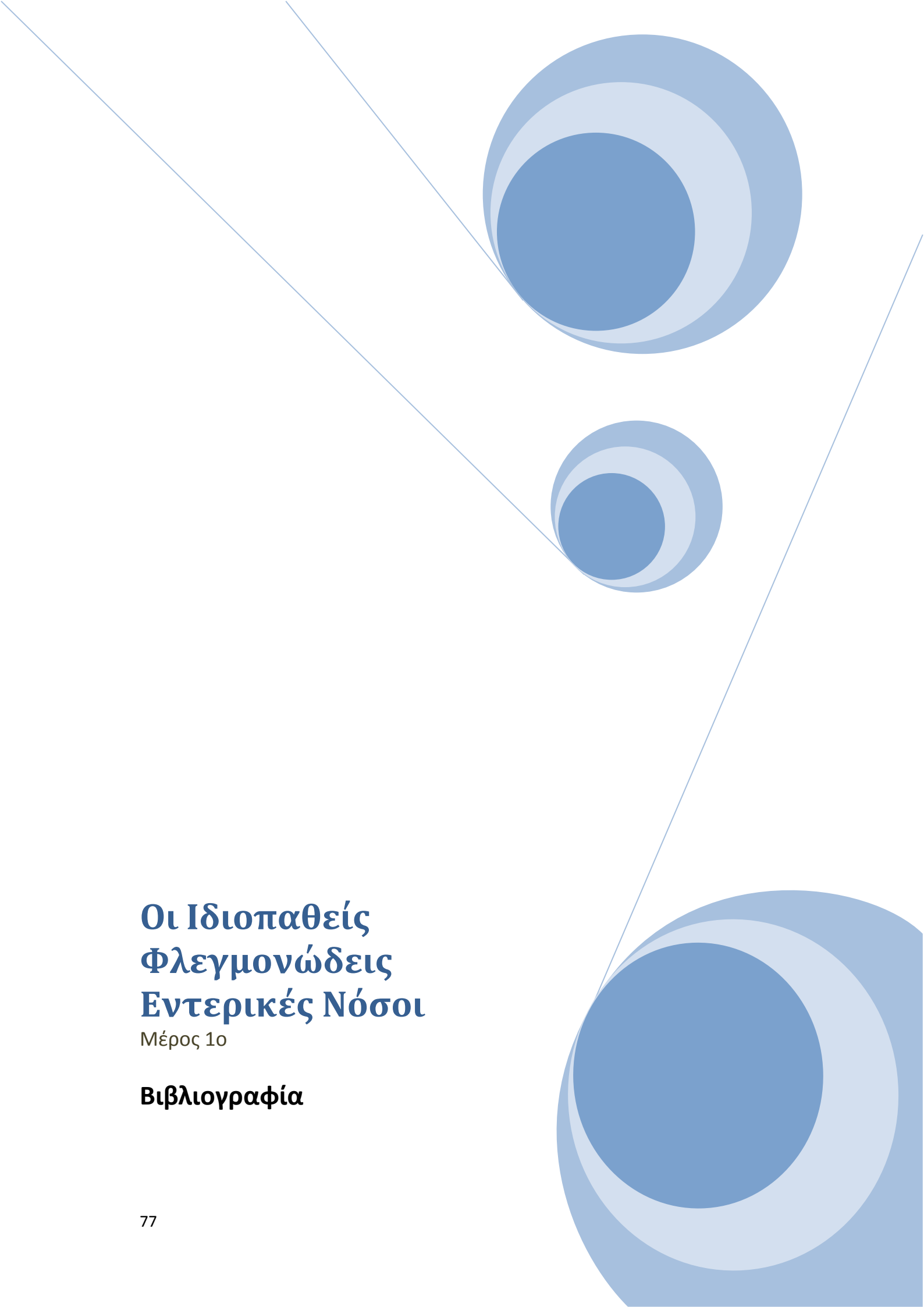
1. ο στόχος είναι επίτευξη κλινικής και ενδοσκοπικής ύφεσης εκτός στεροειδών.
2. Συνιστάται η χορήγηση θεραπείας συντήρησης σε όλους τους ασθενείς, εκτός λίγων, με τοπική νόσο, στους οποίους μπορεί να χορηγηθεί διαλείπουσα θεραπεία.
3. Η εκλογή θεραπείας συντήρησης καθορίζεται από την έκταση της νόσου, τη συχνότητα των υποτροπών, την προηγηθείσα θεραπευτική αγωγή, τη βαρύτητα της πιο πρόσφατης υποτροπής, την αγωγή για την επίτευξη ύφεσης κατά την τελευταία υποτροπή, την ασφάλεια της θεραπείας συντήρησης και την πρόληψη του καρκίνου.
4. Τα από του στόματος σκευάσματα που περιέχουν 5-αμινοσαλικυλικό οξύ (5-ASA) είναι η 1^η γραμμής θεραπεία συντήρησης, σε ασθενείς που ανταποκρίθηκαν σε 5-ASA ή στεροειδή (από το στόμα ή το ορθό). Η θεραπεία συντήρησης με 5-ASA τοπικά έχει αξία εναλλακτικά στην ορθίτιδα και στην αριστερή ΕΚ. Ως θεραπεία 2^{ης} γραμμής μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο συνδυασμός 5-ASA από το στόμα και το ορθό.
5. Η ελάχιστη αποτελεσματική δόση του 5-ASA από του στόματος είναι 1 gr ημερησίως. Για θεραπεία από το ορθό, 3 gr/εβδ, σε διαιρεμένες δόσεις, είναι επαρκή για τη διατήρηση της ύφεσης.
6. Η αζαθειοπρίνη/μερκαπτοπουρίνη συνιστάται σε ασθενείς με πρώιμη ή συχνή υποτροπή, ενώ βρίσκονται σε αγωγή με 5-ASA σε βέλτιστη δόση, ή έχουν δυσανεξία στο 5-ASA, ή είναι κορτικο-εξαρτώμενοι ή που

ανταποκρίθηκαν σε κυκλοσπορίνη ή tacrolimus για επαγωγή της ύφεσης. Επίσης, συνιστάται για συντήρηση σε ασθενείς που ανταποκρίθηκαν σε εφ στεροειδή για επαγωγή της ύφεσης. Προσθήκη ή συνέχιση του από του στόματος 5-ASA μπορεί να συστηθεί, με ιδιαίτερη προσοχή στην πιθανή μυελοτοξικότητα.

7. Σε ασθενείς που ανταποκρίθηκαν σε infliximab, συνιστάται η συνέχιση του ίδιου φαρμάκου για συντήρηση. Εναλλακτικά, μπορεί να χορηγηθεί αζαθειοπρίνη, σε παρθένους σε αυτήν ασθενείς.
8. Συνδυασμός infliximab με ανοσοκατασταλτικό για τουλάχιστον 6 μήνες, συνιστάται για τη μείωση της ανοσογονικότητας.
9. Συνιστάται η χορήγηση 5-ASA επί μακρόν, καθώς φαίνεται ότι έτσι μειώνεται ο κίνδυνος για εμφάνιση καρκίνου ΠΕ.
10. Δεν υπάρχει επίσημη σύσταση για τη διάρκεια της θεραπείας με αζαθειοπρίνη ή infliximab, αν και μπορούν να χορηγηθούν επί μακρόν, επί ενδείξεων.

11. Χειρουργική θεραπεία:

1. Η κολεκτομή συνιστάται σε οξεία φάση, μη ανταποκρινόμενη στη φαρμακευτική θεραπεία ή όταν ο ασθενής λαμβάνει 20 mg ή περισσότερα πρεδνιζολόνης για πάνω από 6 εβδομάδες.
2. Σε επείγουσα κολεκτομή, το ορθό θα πρέπει να διατηρείται.
3. Κατά τη δημιουργία νεοληκύθου, το μέγιστο μήκος βλεννογόνου μεταξύ της οδοντωτής γραμμής και της αναστόμωσης, δε θα πρέπει να ξεπερνά τα 2 εκ.
4. Σε κολεκτομή λόγω κακοήθειας ή δυσπλασίας, συνιστάται η αναστόμωση να γίνεται επί της οδοντωτής γραμμής.
5. Η ειλεοστομία είναι μία επιλογή όταν δεν υπάρχει η δυνατότητα να γίνει ειλεο-πρωκτική αναστόμωση με νεολήκυθο, ή όταν η τελευταία αποτυγχάνει για λόγους άλλους πλην της ληκυθίτιδας, ή όταν είναι επιθυμία του ασθενούς.
6. Ειλεο-ορθική αναστόμωση θα πρέπει να διενεργείται μόνο σε ειδικές περιπτώσεις, όπως για λόγους γονιμότητας.



Οι Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Εντερικές Νόσοι

Μέρος 1ο

Βιβλιογραφία

1. Wilks S. Morbid appearances in the intestines of Miss Bankes. *London Medical Gazette* 1859;2:264-5.
2. Dalziel TK. Chronic interstitial enteritis. *Br Med J* 1913.
3. Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD. Regional ileitis: A pathologic and clinical entity. *JAMA* 1932;99:1323-9.
4. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, Brant SR, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol*. 2005;19 Suppl A:5-36.
5. Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2011 May;140(6):1785-94.
6. Vind I, Riis L, Jess T, et al. Increasing incidences of inflammatory bowel disease and decreasing surgery rates in Copenhagen City and County, 2003-2005: a population-based study from the Danish Crohn colitis database. *Am J Gastroenterol* 2006;101:1274–1282.
7. Yapp TR, Stenson R, Thomas GA, et al. Crohn's disease incidence in Cardiff from 1930: an update for 1991-1995. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000;12:907–911.
8. Rubin GP, Hungin AP, Kelly PJ, et al. Inflammatory bowel disease: epidemiology and management in an English general practice population. *Aliment Pharmacol Ther* 2000;14:1553–1559.
9. Loftus CG, Loftus EV Jr, Harmsen WS, et al. Update on the incidence and prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-2000. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:254–261.
10. Bernstein CN, Wajda A, Svenson LW, et al. The epidemiology of inflammatory bowel disease in Canada: a population-based study. *Am J Gastroenterol* 2006;101:1559–1568.
11. Pinchbeck BR, Kirdeikis J, Thomson AB. Inflammatory bowel disease in northern Alberta. An epidemiologic study. *J Clin Gastroenterol* 1988;10:505–515.
12. Bernstein CN, Blanchard JF, Rawsthorne P, et al. Epidemiology of Crohn's disease and ulcerative colitis in a central Canadian province: a population-based study. *Am J Epidemiol* 1999;149: 916–924.

13. Gunesh S, Thomas GA, Williams GT, et al. The incidence of Crohn's disease in Cardiff over the last 75 years: an update for 1996–2005. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;27:211–219.
14. Molinie F, Gower-Rousseau C, Yzet T, et al. Opposite evolution in incidence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Northern France (1988-1999). *Gut* 2004;53:843–848.
15. Latour P, Louis E, Belaiche J. Incidence of inflammatory bowel disease in the area of Liege: a 3 years prospective study (1993-1996). *Acta Gastroenterol Belg* 1998;61:410–413.
16. Ott C, Obermeier F, Thieler S, et al. The incidence of inflammatory bowel disease in a rural region of Southern Germany: a prospective population-based study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008;20:917–923.
17. Gearry RB, Richardson A, Frampton CM, et al. High incidence of Crohn's disease in Canterbury, New Zealand: results of an epidemiologic study. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:936–943.
18. Yang SK, Hong WS, Min YI, et al. Incidence and prevalence of ulcerative colitis in the Songpa-Kangdong District, Seoul, Korea, 1986-1997. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:1037–1042.
19. Sood A, Midha V, Sood N, et al. Incidence and prevalence of ulcerative colitis in Punjab, North India. *Gut* 2003;52:1587–1590.
20. Edouard A, Paillaud M, Merle S, et al. Incidence of inflammatory bowel disease in the French West Indies (1997-1999). *Gastroenterol Clin Biol* 2005;29:779–783.
21. Thia KT, Loftus EV Jr, Sandborn WJ, et al. An update on the epidemiology of inflammatory bowel disease in Asia. *Am J Gastroenterol* 2008;103:3167–3182.
22. Devlin HB, Datta D, Dellipiani AW. The incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in North Tees Health District. *World J Surg* 1980;4:183–193.
23. Jacobsen BA, Fallingborg J, Rasmussen HH, et al. Increase in incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in northern Denmark: a population-based study, 1978-2002. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006;18:601–606.
24. Kappelman MD, Rifas-Shiman SL, Kleinman K, et al. The prevalence and geographic distribution of Crohn's disease and ulcerative colitis in the United States. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007;5:1424–1429.

25. Auvin S, Molinie F, Gower-Rousseau C, et al. Incidence, clinical presentation and location at diagnosis of pediatric inflammatory bowel disease: a prospective population-based study in northern France (1988–1999). *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005;41:49–55.
26. Kelsen J, Baldassano RN. Inflammatory bowel disease: the difference between children and adults. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14(Suppl 2):S9–S11.
27. Langholz E, Munkholm P, Krasilnikoff PA, et al. Inflammatory bowel diseases with onset in childhood. Clinical features, morbidity, and mortality in a regional cohort. *Scand J Gastroenterol* 1997;32:139–147.
28. Chouraki V, Savoye G, Dauchet L, et al. The changing pattern of Crohn's disease incidence in northern France: a continuing increase in the 10- to 19-year-old age bracket (1988–2005). *Aliment Pharmacol Ther* 2010. [Epub ahead of print]
29. Abramson O, Durant M, Mow W, et al. Incidence, prevalence, and time trends of pediatric inflammatory bowel disease in Northern California, 1996 to 2006. *J Pediatr* 2010;157:233–239.
30. Turunen P, Kolho KL, Auvinen A, et al. Incidence of inflammatory bowel disease in Finnish children, 1987–2003. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:677–683.
31. Probert CS, Jayanthi V, Pinder D, et al. Epidemiological study of ulcerative proctocolitis in Indian migrants and the indigenous population of Leicestershire. *Gut* 1992;33:687–693.
32. Ahuja V, Tandon RK. Inflammatory bowel disease in the Asia-Pacific area: a comparison with developed countries and regional differences. *J Dig Dis* 2010;11:134–147.
33. Sonnenberg A. Demographic characteristics of hospitalized IBD patients. *Dig Dis Sci* 2009;54:2449–2455.
34. Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, et al. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* 1996;39:690–697.
35. Ladas SD, Mallas E, Giorgiotis K, et al. Incidence of ulcerative colitis in Central Greece: a prospective study. *World J Gastroenterol* 2005;11:1785–1787.
36. Rodrigo L, Riestra S, Nino P, et al. A population-based study on the incidence of inflammatory bowel disease in Oviedo (Northern Spain). *Rev Esp Enferm Dig* 2004;96:296–305.

37. Kurata JH, Kantor-Fish S, Frankl H, et al. Crohn's disease among ethnic groups in a large health maintenance organization. *Gastroenterology* 1992;102:1940–1948.
38. Gilat T, Hacothen D, Lilos P, et al. Childhood factors in ulcerative colitis and Crohn's disease. An international cooperative study. *Scand J Gastroenterol* 1987;22:1009–1024.
39. Fireman Z, Grossman A, Lilos P, et al. Epidemiology of Crohn's disease in the Jewish population of central Israel, 1970-1980. *Am J Gastroenterol* 1989;84:255–258.
40. Shapira M, Tamir A. Crohn's disease and the Jews. *J Clin Gastroenterol* 1992;15:278–280.
41. Birkenfeld S, Zvidi I, Hazazi R, et al. The prevalence of ulcerative colitis in Israel: a twenty-year survey. *J Clin Gastroenterol* 2009;43:743–746.
42. Zvidi I, Hazazi R, Birkenfeld S, et al. The prevalence of Crohn's disease in Israel: a 20-year survey. *Dig Dis Sci* 2009;54:848–852.
43. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2011;474:307-17.
44. Cho JH, Brant SR. Recent insights into the genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2011;140:1704-12.
45. Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C et al. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996; 379: 821-823.
46. Satsangi J, Parkes M, Louis E et al. Two-stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nat Genet* 1996; 14: 199-202.
47. Cho JH, Nicolae DL, Gold LH et al. Identification of novel susceptibility loci for inflammatory bowel disease on chromosomes 1p, 3q, and 4q: evidence for epistasis between 1p and IBD1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 7502-7507.
48. Hampe J, Schreiber S, Shaw SH et al. A genome wide analysis provides evidence for novel linkages in inflammatory bowel disease in a large European cohort. *Am J Hum Genet* 1999;64:808-816.
49. Ma Y, Ohmen JD, Li Z et al. A genome wide search identifies potential new susceptibility loci for Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases* 1999; 5: 271-278.

50. Duerr RH, Barmada MM, Zhang L et al. High-density genome scan in Crohn's disease shows confirmed linkage to chromosome 14q11-12. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1857-1862.
51. Rioux JD, Silverberg MS, Daly MS et al. Genome wide search in Canadian families with inflammatory bowel disease reveals two novel susceptibility loci. *Am J Hum Genet* 2000;66: 1863-1870.
52. Williams CN, Kocher K, Lander ES, Daly MJ, Rioux JD. Using a genome-wide scan and meta-analysis to identify a novel IBD locus and confirm previously identified IBD loci. *InflammBowel Dis* 2002; 8: 375-81.
53. Paavola-Sakki P, Ollikainen V, HelioT et al. Genome-wide search in Finnish families with inflammatory bowel disease provides evidence for novel susceptibility loci. *Eur J Hum Genet* 2003; 11: 112-20.
54. Vermeire S, Rutgeerts P, Van Steen K et al. Genome wide scan in a Flemish inflammatory bowel disease population: support for the IBD4 locus, population heterogeneity, and epistasis. *Gut* 2004; 53: 980-6.
55. Barmada MM, Brant SR, Nicolae DL et al. A genome scan in 260 inflammatory bowel disease-affected relative pairs. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 15-22.
56. Yamazaki K, McGovern D, Ragoussis J et al. Single nucleotide polymorphisms in TNFSF15 confer susceptibility to Crohn's disease. *Hum Mol Genet.* 2005;14:3499-506.
57. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science.* 2006;314:1461-3.
58. Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, et al. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *NatGenet.* 2007;39:596-604.
59. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, et al. Genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet.* 2007;39:207-11.
60. Libioulle C, Louis E, Hansoul S, et al. Novel Crohn disease locus identified by genome-wide association maps to a gene desert on 5p13.1 and modulates expression of PTGER4. *PLoS Genet.* 2007; 3:e58.
61. Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ et al. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet.* 2007;39:830-2.

62. Raelson JV, Little RD, Ruether A, et al. Genome-wide association study for Crohn's disease in the Quebec Founder Population identifies multiple validated disease loci. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:14747-52.
63. Franke A, Hampe J, Rosenstiel P. Systematic association mapping identifies NELL1 as a novel IBD disease gene. *PLoS ONE*. 2007;2:e691.
64. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H et al. Association of CARD15 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 599-603.
65. Lesage S, Zouali H, Cezard JP et al. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 845-857.
66. Lala S, Ogura Y, Osborne C et al. Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology* 2003; 125: 47-57.
67. Hisamatsu T, Suzuki M, Reinecker HC, Nadeau WJ, McCormick BA, Podolsky DK. CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2003; 124: 993-1000.
68. Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science*. 2005; 307: 731-4.
69. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M et al. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 2004; 53: 1658-64.
70. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 603-6.
71. Stoll M, Corneliussen B, Costello CM, et al. Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 2004; 36: 476-480.
72. Daly MJ, Pearce AV, Farwell L et al. Association of DLG5 R30Q variant with inflammatory bowel disease. *Eur J Hum Genet* 2005;13:835-9.
73. Noble CL, Nimmo ER, Drummond H et al. DLG5 variants do not influence susceptibility to inflammatory bowel disease in the Scottish population. *Gut* 2005; 54: 1416-20.
74. Torok HP, Glas J, Tonenchi L et al. Polymorphisms in the DLG5 and OCTN cation transporter genes in Crohn's disease. *Gut*. 2005; 54: 1421-7.
75. Vermeire S, Pierik M, Henckaerts L et al. Association of organic cation transporter risk haplotype with perianal penetrating Crohn's disease but not with susceptibility to IBD. *Gastroenterol* 2005; 129: 1845-53.

76. Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA et al. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat Genet* 2004; 36: 471-475.
77. Rioux JD, Daly MJ, Silverberg MS et al. Genetic variation in the 5q31 cytokine gene cluster confers susceptibility to Crohn disease. *Nat Genet* 2001; 29: 223-8.
78. Grundemann D, Gorboulev V, Gambaryan S et al. Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. *Nature* 1994; 372: 549-552.
79. Lahjouji K, Mitchell GA, Qureshi IA. Carnitine transport by organic cation transporters and systemic carnitine deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism* 2001; 73: 287-97.
80. Roediger WE, Nance S. Metabolic induction of experimental ulcerative colitis by inhibition of fatty acid oxidation. *Br J Exp* 1986; 67: 773-782.
81. McGovern DP, Hysi P, Ahmad T et al. Association between a complex insertion/deletion polymorphism in NOD1 (CARD4) and susceptibility to inflammatory bowel disease. *Hum Mol Genet.* 2005; 14: 1245-50.
82. Toyoda H, Wang SJ, Yang HY et al. Distinct associations of HLA class II genes with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1993; 104: 741-748.
83. Danze PM, Colombel JF, Jacquot S, et al. Association of HLA class II genes with susceptibility to Crohn's disease. *Gut* 1996; 39: 69-72.
84. Satsangi J, Welsh KI, Bunce M et al. Contribution of genes of the major histocompatibility complex to susceptibility and disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Lancet* 1996; 347: 1212-7.
85. Stokkers PC, Reitsma PH, Tytgat GN et al. HLA-DR and -DQ phenotypes in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Gut* 1999; 45: 395-401.
86. Franchimont D, Vermeire S, El Housni H et al. Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 2004; 53: 987-992.
87. Gewirtz AT, Vijay-Kumar M, Brant SR, Duerr RH, Nicolae DL, Cho JH. Dominant-negative TLR5 polymorphism reduces adaptive immune response to flagellin and negatively associates with Crohn's disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006;290:1157-63.
88. Roberts RL, Gearry RB, Hollis-Moffatt JE. IL23R R381Q and ATG16L1 T300A are strongly associated with Crohn's disease in a study of New Zealand

- Caucasians with Inflammatory Bowel Disease. *Am J Gastroenterol.* 2007;102:2754-61.
89. Baldassano RN, Bradfield JP, Monos DS. Association of variants of the interleukin-23 receptor gene with susceptibility to pediatric Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2007;5:972-6.
90. Van Limbergen J, Russell RK, Nimmo ER. IL23R Arg381Gln is associated with childhood onset inflammatory bowel disease in Scotland. *Gut.* 2007;56:1173-4.
91. Tremelling M, Cummings F, Fisher SA, IL23R variation determines susceptibility but not disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2007;132:1657-64.
92. Kabashima K, Saji T, Murata T, Nagamachi M, Matsuoka T, Segi E, Tsuboi K, Sugimoto Y, Kobayashi T, Miyachi Y, Ichikawa A, Narumiya S. The prostaglandin receptor EP4 suppresses colitis, mucosal damage and CD4 cell activation in the gut. *J Clin Invest.* 2002;109:883-93.
93. Abreu MT, Taylor KD, Lin YC et al. Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002;123:679-688.
94. Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M et al. The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002; 122: 854-866.
95. Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM et al. The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2002; 122: 867-874.
96. Esters N, Pierik M, van Steen K et al. Transmission of CARD15 (NOD2) variants within families of patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 299-305.
97. Mendoza JL, Murillo LS, Fernandez L et al. Prevalence of mutations of the NOD2/CARD15 gene and relation to phenotype in Spanish patients with Crohn disease. *Scand J Gastroenterol.* 2003; 38: 1235-40.
98. Roussomoustakaki M, Koutroubakis I, Vardas EM et al. NOD2 insertion mutation in a Cretan Crohn's disease population. *Gastroenterology.* 2003;124: 272-273.
99. Vermeire S, Wild G, Kocher K et al. CARD15 genetic variation in a Quebec population: prevalence, genotype-phenotype relationship, and haplotype structure. *Am J Hum Genet.* 2002; 71: 74-83.

100. Helio T, Halme L, Lappalainen M et al. CARD15/NOD2 gene variants are associated with familiarly occurring and complicated forms of Crohn's disease. *Gut* 2003; 52: 558-562.
101. Bairead E, Harmon DL, Curtis AM et al. Association of NOD2 with Crohn's Disease in a homogenous Irish population. *Eur J Hum Genet.* 2003; 11: 237-244.
102. Arnott ID, Nimmo ER, Drummond HE et al. NOD2/CARD15, TLR4 and CD14 mutations in Scottish and Irish Crohn's disease patients: evidence for genetic heterogeneity within Europe? *Genes Immun* 2004;5:417-25.
103. Inoue N, Tamura K, Kinouchi Y et al. Lack of common NOD2 variants in Japanese patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002; 123: 86-91.
104. Leong RWL, Armuzzi A, Ahmad T et al. NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in the Chinese population. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17:1465-1470.
105. Bonen DK, Nicolae DL, Moran T et al. Racial differences in NOD2 variation: characterization of NOD2 in African-Americans with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002; 122(Suppl):A29.
106. Alvarez-Lobos M, Arostegui JI, Sans M et al. Crohn's disease patients carrying Nod2/CARD15 gene variants have an increased and early need for first surgery due to stricturing disease and higher rate of surgical recurrence. *Ann Surg.* 2005;242:693-700.
107. Seiderer J, Brand S, Herrmann KA, et al. Predictive value of the CARD15 variant 1007fs for the diagnosis of intestinal stenoses and the need for surgery in Crohn's disease in clinical practice: results of a prospective study. *Inflamm Bowel Dis.* 2006; 12:1114-21.
108. Armuzzi A, Ahmad T, Ling KL et al. Genotype-phenotype analysis of the Crohn's disease susceptibility haplotype on chromosome 5q31. *Gut*2003;52: 1133-9.
109. Libioulle C, Thys J, Farnir F et al. Functional variants of OCTN cation transporter gene are associated with perianal Crohn's disease. *Gastroenterol* 2005; 128:A445.
110. Newman B, Gu X, Wintle R et al. A risk haplotype in the Solute Carrier Family 22A4/22A5 gene cluster influences phenotypic expression of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2005;128:260-9.

111. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007;448:427–434.
112. Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol* 2010;28:573–621.
113. Cerf-Bensussan N, Gaboriau-Routhiau V. The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nat Rev Immunol* 2010;10:735–744.
114. Mow WS, Vasilias EA, Lin YC, et al. Association of antibody responses to microbial antigens and complications of small bowel Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004;126:414–424.
115. Standaert-Vitse A, Jouault T, Vandewalle P, et al. *Candida albicans* is an immunogen for anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibody markers of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2006;130:1764–1775.
116. Duchmann R, Neurath MF, Meyer zum Buschenfelde KH. Responses to self and non-self intestinal microflora in health and inflammatory bowel disease. *Res Immunol* 1997;148:589–594.
117. Lodes MJ, Cong Y, Elson CO, et al. Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn's disease. *J Clin Invest* 2004;113:1296–1306.
118. Ivanov II, Frutos Rde L, Manel N, et al. Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe* 2008;4:337–349.
119. Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002;122:44–54.
120. Neut C, Bulois P, Desreumaux P, et al. Changes in the bacterial flora of the neoterminal ileum after ileocolonic resection for Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2002;97:939–946.
121. Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, et al. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 2006;55:205–211.
122. Mondot S, Kang S, Furet JP, et al. Highlighting new phylogenetic specificities of Crohn's disease microbiota. *Inflamm Bowel Dis* 2011;17:185–192.
123. Frank DN, St. Amand AL, Feldman RA, et al. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:13780–13785.

124. Nishikawa J, Kudo T, Sakata S, et al. Diversity of mucosa-associated microbiota in active and inactive ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 2009;44:180–186.
125. Ott SJ, Plamondon S, Hart A, et al. Dynamics of the mucosa associated flora in ulcerative colitis patients during remission and clinical relapse. *J Clin Microbiol* 2008;46:3510–3513.
126. Martinez C, Antolin M, Santos J, et al. Unstable composition of the fecal microbiota in ulcerative colitis during clinical remission. *Am J Gastroenterol* 2008;103:643–648.
127. Andoh A, Sakata S, Koizumi Y, et al. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis of the diversity of fecal microbiota in patients with ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:955–962.
128. Willing BP, Dicksved J, Halfvarson J, et al. A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes. *Gastroenterology* 2010;139:1844–1854.e1.
129. Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, et al. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* 2003;52:237–242.
130. Garrett WS, Lord GM, Punit S, et al. Communicable ulcerative colitis induced by T-bet deficiency in the innate immune system. *Cell* 2007;131:33–45.
131. Lepage P, Colombet J, Marteau P, et al. Dysbiosis in inflammatory bowel disease: a role for bacteriophages? *Gut* 2008;57:424–425.
132. Chassaing B, Darfeuille-Michaud A. The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 2011;140:1720-28.
133. Abraham C, Medzhitov R. Interactions between the host innate immune system and microbes in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 2011;140:1729-37.
134. Kaser A, Blumberg RS. Autophagy, microbial sensing, endoplasmic reticulum stress, and epithelial function in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 2011;140:1738-47.
135. Glover LE, Colgan SP. Hypoxia and metabolic factors that influence Inflammatory Bowel Disease pathogenesis. *Gastroenterology* 2011;140:1748-55.

136. MacDonald TT. Aetiology of Crohn's disease. *Arch Dis Child* 1993;68:623–625.
137. Hatoum OA, Heidemann J, Binion DG. The intestinal microvasculature as a therapeutic target in inflammatory bowel disease. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1072:78–97.
138. Hatoum OA, Binion DG, Otterson MF, et al. Acquired microvascular dysfunction in inflammatory bowel disease: loss of nitric oxide-mediated vasodilation. *Gastroenterology* 2003;125:58–69.
139. Rampton DS, Collins CE. Review article: thromboxanes in inflammatory bowel disease—pathogenic and therapeutic implications. *Aliment Pharmacol Ther* 1993;7:357–367.
140. Chidlow JH Jr, Greer JJ, Anthoni C, et al. Endothelial caveolin-1 regulates pathologic angiogenesis in a mouse model of colitis. *Gastroenterology* 2009;136:575–584.
141. Scaldaferri F, Vetrano S, Sans M, et al. VEGF-A links angiogenesis and inflammation in inflammatory bowel disease pathogenesis. *Gastroenterology* 2009;136:585–595.
142. Binion DG, Rafiee P. Is inflammatory bowel disease a vascular disease? Targeting angiogenesis improves chronic inflammation in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2009;136:400–403.
143. Jackson JR, Seed MP, Kircher CH, et al. The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *FASEB J* 1997;11:457–465.
144. Majno G. Chronic inflammation: links with angiogenesis and wound healing. *Am J Pathol* 1998;153:1035–1039.
145. Strober W, Fuss IJ. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* 2011;140:1756–67.
146. MacDonald TT, Monteleone I, Fantini MC, Monteleone G. Regulation of homeostasis and inflammation in the intestine. *Gastroenterology* 2011;140:1768–75.
147. MacDonald TT, Monteleone G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science* 2005;307:1920–1925.
148. Denning TL, Wang YC, Patel SR, et al. Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nat Immunol* 2007;8:1086–1094.

149. Travis MA, Reizis B, Melton AC, et al. Loss of integrin alpha-(v)beta8 on dendritic cells causes autoimmunity and colitis in mice. *Nature* 2007;449:361–365.
150. Coombes JL, Powrie F. Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat Rev Immunol* 2008;8:435–446.
151. Rescigno M, Di Sabatino A. Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease. *J Clin Invest* 2009;119:2441–2450.
152. Sun CM, Hall JA, Blank RB, et al. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med* 2007;204:1775–1785.
153. Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Carcamo CV, et al. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* 2007;204:1757–1764.
154. Iliev ID, Mileti E, Matteoli G, et al. Intestinal epithelial cells promote colitis-protective regulatory T-cell differentiation through dendritic cell conditioning. *Mucosal Immunol* 2009;2:340–350.
155. Zaph C, Du Y, Saenz SA, et al. Commensal-dependent expression of IL-25 regulates the IL-23-IL-17 axis in the intestine. *J Exp Med* 2008;205:2191–2198.
156. Caruso R, Sarra M, Stolfi C, et al. Interleukin-25 inhibits interleukin-12 production and Th1 cell-driven inflammation in the gut. *Gastroenterology* 2009;136:2270–2279.
157. Smythies LE, Shen R, Bimczok D, et al. Inflammation anergy in human intestinal macrophages is due to Smad-induced IkappaBalpha expression and NF-kappaB inactivation. *J Biol Chem* 2010;285:19593–19604.
158. Medvedev AE, Lentschat A, Wahl LM, et al. Dysregulation of LPS-induced Toll-like receptor 4-MyD88 complex formation and IL-1 receptor-associated kinase 1 activation in endotoxin-tolerant cells. *J Immunol* 2002;169:5209–5216.
159. Adib-Conquy M, Cavillon JM. Gamma interferon and granulocyte/monocyte colony-stimulating factor prevent endotoxin tolerance in human monocytes by promoting interleukin-1 receptor-associated kinase expression and its association to MyD88 and not by modulating TLR4 expression. *J Biol Chem* 2002;277:27927–27934.

160. Autschbach F, Braunstein J, Helmke B, et al. In situ expression of interleukin-10 in noninflamed human gut and in inflammatory bowel disease. *Am J Pathol* 1998;153:121–130.
161. Monteleone G, Pallone F, MacDonald TT. Smad7 in TGF-beta-mediated negative regulation of gut inflammation. *Trends Immunol* 2004;25:513–517.
162. Monteleone I, Platt AM, Jaensson E, et al. IL-10-dependent partial refractoriness to Toll-like receptor stimulation modulates gut mucosal dendritic cell function. *Eur J Immunol* 2008;38:1533–1547.
163. Platt AM, Mowat AM. Mucosal macrophages and the regulation of immune responses in the intestine. *Immunol Lett* 2008;119:22–31.
164. Kronenberg M, Rudensky A. Regulation of immunity by self-reactive T cells. *Nature* 2005;435:598–604.
165. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4:330–336.
166. Hayday A, Tigelaar R. Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells. *Nat Rev Immunol* 2003;3:233–242.
167. Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, et al. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* 1999;162:5317–5326.
168. Chen W, Jin W, Hardegen N, et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003;198:1875–1886.
169. Fantini MC, Becker C, Monteleone G, et al. Cutting edge: TGFbeta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol* 2004;172:5149–5153.
170. Rao PE, Petrone AL, Ponath PD. Differentiation and expansion of T cells with regulatory function from human peripheral lymphocytes by stimulation in the presence of TGF- β . *J Immunol* 2005;174:1446–1455.
171. Asseman C, Mauze S, Leach MW, et al. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* 1999;190:995–1004.

172. Asseman C, Read S, Powrie F. Colitogenic Th1 cells are present in the antigen-experienced T cell pool in normal mice: control by CD4+ regulatory T cells and IL-10. *J Immunol* 2003;171:971–978.
173. Uhlig HH, Coombes J, Mottet C, et al. Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis. *J Immunol* 2006;177:5852–5860.
174. Maloy KJ, Salaun L, Cahill R, et al. CD4+CD25+ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J Exp Med* 2003;197:111–119.
175. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, et al. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993;75:263–274.
176. Powrie F, Carlino J, Leach MW, et al. A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4+ T cells. *J Exp Med* 1996;183:2669–2674.
177. Fahlen L, Read S, Gorelik L, et al. T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med* 2005;201:737–746.
178. Naganuma M, Wiznerowicz EB, Lappas CM, et al. Cutting edge: critical role for A2A adenosine receptors in the T cell-mediated regulation of colitis. *J Immunol* 2006;177:2765–2769.
179. Odashima M, Bamias G, Rivera-Nieves J, et al. Activation of A2A adenosine receptor attenuates intestinal inflammation in animal models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2005;129:26–33.
180. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 2007;450:566–569.
181. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, et al. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol* 2007;8:1353–1362.
182. Rutgeerts P, Geboes K, Vantrappen G, et al. Predictability of the postoperative course of Crohn's disease. *Gastroenterology* 1990;99:956–963.
183. Olaison G, Smedh K, Sjodahl R. Natural course of Crohn's disease after ileocolic resection: endoscopically visualised ileal ulcers preceding symptoms. *Gut* 1992;33:331–335.

184. D'Haens GR, Geboes K, Peeters M, et al. Early lesions of recurrent Crohn's disease caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum. *Gastroenterology* 1998;114:262–267.
185. Silverberg M, Satsangi J, Ahmad T, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a working party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol* 2005;19:1A–32A.
186. Gasche C, Scholmerich J, Brynskov J, et al. A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm Bowel Dis* 2000;6:8–15.
187. Louis E, Collard A, Oger AF, et al. Behaviour of Crohn's disease according to the Vienna classification: changing pattern over the course of the disease. *Gut* 2001;49:777–782.
188. Peschard S, Carbonnel F, Beaugerie L, et al. Colonic involvement in ileal Crohn's disease. *Gastroenterol Clin Biol* 1998;22:594–600.
189. Hamon JF, Cosnes J, Carbonnel F, et al. The risk of extra-colonic extension in Crohn's colitis. *Ann Gastroenterol Hepatol (Paris)* 1993;29:1–10.
190. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. Perianal Crohn's disease: classification and clinical evaluation. *Dig Liver Dis* 2007;39:959–962.
191. Vermeire S, van Assche G, Rutgeerts P. Review article: altering the natural history of Crohn's disease—evidence for and against current therapies. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;25:3–12.
192. Schwartz DA, Pemberton JH, Sandborn WJ. Diagnosis and treatment of perianal fistulas in Crohn disease. *Ann Intern Med* 2001;135:906–918.
193. Cosnes J. Crohn's disease phenotype, prognosis, and long-term complications: what to expect? *Acta Gastroenterol Belg* 2008;71:303–307.
194. Sachar DB, Bodian CA, Goldstein ES, et al. Is perianal Crohn's disease associated with intestinal fistulization? *Am J Gastroenterol* 2005;100:1547–1549.
195. Greenstein AJ, Lachman P, Sachar DB, et al. Perforating and non-perforating indications for repeated operations in Crohn's disease: evidence for two clinical forms. *Gut* 1988;29:588–592.
196. Cosnes J, Cattan S, Blain A, et al. Long-term evolution of disease behavior of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2002;8:244–250.

197. Thia KT, Sandborn WJ, Harmsen WS, et al. Risk factors associated with progression to intestinal complications of Crohn's disease in a population-based cohort. *Gastroenterology* 2010;139:1147–1155.
198. Oberhuber G, Stangl PC, Vogelsang H, et al. Significant association of strictures and internal fistula formation in Crohn's disease. *Virchows Arch* 2000;437:293–297.
199. Munkholm P, Langholz E, Davidsen M, et al. Disease activity courses in a regional cohort of Crohn's disease patients. *Scand J Gastroenterol* 1995;30:699–706.
200. Peyrin-Biroulet L, Loftus EV Jr, Colombel JF, et al. Long-term complications, extraintestinal manifestations, and mortality in adult Crohn's disease in population-based cohorts. *Inflamm Bowel Dis* 2011;17:471–478.
201. Vavricka SR, Brun L, Ballabeni P, et al. Frequency and risk factors for extraintestinal manifestations in the Swiss Inflammatory Bowel Disease Cohort. *Am J Gastroenterol* 2011;106:110–119.
202. Froslic KF, Jahnsen J, Moum BA, et al. Mucosal healing in inflammatory bowel disease: results from a Norwegian population-based cohort. *Gastroenterology* 2007;133:412–422.
203. Solberg IC, Vatn MH, Hoie O, et al. Clinical course in Crohn's disease: results of a Norwegian population-based ten-year follow-up study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007;5:1430–1438.
204. Mekhjian HS, Switz DM, Melnyk CS, et al. Clinical features and natural history of Crohn's disease. *Gastroenterology* 1979;77:898–906.
205. Sands BE, Arsenault JE, Rosen MJ, et al. Risk of early surgery for Crohn's disease: implications for early treatment strategies. *Am J Gastroenterol* 2003;98:2712–2718.
206. Cosnes J, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, et al. Impact of the increasing use of immunosuppressants in Crohn's disease on the need for intestinal surgery. *Gut* 2005;54:237–241.
207. Wolters FL, Russel MG, Stockbrugger RW. Systematic review: has disease outcome in Crohn's disease changed during the last four decades? *Aliment Pharmacol Ther* 2004;20:483–496.
208. Picco MF, Zubiaurre I, Adluni M, et al. Immunomodulators are associated with a lower risk of first surgery among patients with non-penetrating non-stricturing Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2009;104:2754–2759.

209. Lichtenstein GR. Infliximab: lifetime use for maintenance is appropriate in Crohn's disease. PRO: maintenance therapy is superior to episodic therapy. *Am J Gastroenterol* 2005;100:1433–1435.
210. Feagan BG, Panaccione R, Sandborn WJ, et al. Effects of adalimumab therapy on incidence of hospitalization and surgery in Crohn's disease: results from the CHARM study. *Gastroenterology* 2008;135:1493–1499.
211. Lemann M, Mary JY, Colombel JF, et al. A randomized, double-blind, controlled withdrawal trial in Crohn's disease patients in long-term remission on azathioprine. *Gastroenterology* 2005;128:1812–1818.
212. Bernell O, Lapidus A, Hellers G. Recurrence after colectomy in Crohn's colitis. *Dis Colon Rectum* 2001;44:647–654.
213. Andersson P, Olaison G, Bodemar G, et al. Surgery for Crohn colitis over a twenty-eight-year period: fewer stomas and the replacement of total colectomy by segmental resection. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:68–73.
214. Hurst RD, Molinari M, Chung TP, et al. Prospective study of the features, indications, and surgical treatment in 513 consecutive patients affected by Crohn's disease. *Surgery* 1997;122:661–668.
215. Galandiuk S, Kimberling J, Al-Mishlab TG, et al. Perianal Crohn disease: predictors of need for permanent diversion. *Ann Surg* 2005;241:796–802.
216. Moum B, Ekbohm A, Vatn MH, et al. Change in the extent of colonoscopic and histological involvement in ulcerative colitis over time. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1564–1569.
217. Byeon JS, Yang SK, Myung SJ, et al. Clinical course of distal ulcerative colitis in relation to appendiceal orifice inflammation status. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:366–371.
218. Mutinga ML, Odze RD, Wang HH, et al. The clinical significance of right-sided colonic inflammation in patients with left-sided chronic ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2004;10:215–219.
219. Joo M, Odze RD. Rectal sparing and skip lesions in ulcerative colitis: a comparative study of endoscopic and histologic findings in patients who underwent proctocolectomy. *Am J Surg Pathol* 2010;34:689–696.
220. Bousvaros A, Antonioli DA, Colletti RB, et al. Differentiating ulcerative colitis from Crohn disease in children and young adults: report of a working group of the North American Society for Pediatric Gastroenterology,

- Hepatology, and Nutrition and the Crohn's and Colitis Foundation of America. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007;44:653–674.
221. Langholz E, Munkholm P, Davidsen M, et al. Changes in extent of ulcerative colitis: a study on the course and prognostic factors. *Scand J Gastroenterol* 1996;31:260–266.
222. Langholz E, Munkholm P, Davidsen M, et al. Course of ulcerative colitis: analysis of changes in disease activity over years. *Gastroenterology* 1994;107:3–11.
223. Turner D, Walsh CM, Benchimol EI, et al. Severe paediatric ulcerative colitis: incidence, outcomes and optimal timing for second-line therapy. *Gut* 2008;57:331–338.
224. Henriksen M, Jahnsen J, Lygren I, et al. Ulcerative colitis and clinical course: results of a 5-year population-based follow-up study (the IBSEN study). *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:543–550.
225. Hoie O, Wolters FL, Riis L, et al. Low colectomy rates in ulcerative colitis in an unselected European cohort followed for 10 years. *Gastroenterology* 2007;132:507–515.
226. Shen B, Fazio VW, Remzi FH, et al. Comprehensive evaluation of inflammatory and noninflammatory sequelae of ileal pouch-anal anastomoses. *Am J Gastroenterol* 2005;100:93–101.
227. Καρμύρης Κ. Διαταραχές του λίπους και ο ρόλος των ορμονών της ενεργειακής ομοιόστασης σε ασθενείς με Ιδιοπαθή Φλεγμονώδη Εντερική Νόσο. Πανεπιστήμιο Κρήτης, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής. Διδακτορική Διατριβή, προσωπική έκδοση, Ηράκλειο, 2009. Σελ. 14-5.
228. Best WR, Beckett JM, Singleton JW, and Kern F Jr. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* 1976; 70:439-444.
229. Harvey RF, Bradshaw JM. A simple index of Crohn's disease activity. *Lancet* 1980; 1:514.
230. Irvine EJ. Usual therapy improves perianal Crohn's disease as measured by a new disease activity index. McMaster IBD Study Group. *J Clin Gastroenterol* 1995; 20:27-32.
231. Mary JY, Modigliani R. Development and validation of an endoscopic index of the severity for Crohn's disease: a prospective multicentre study.

- Groupe d'Etudes Therapeutiques des Affections Inflammatoires du Tube Digestif (GETAID). *Gut* 1989; 30:983-989.
232. Rutgeerts P, Geboes K, Vantrappen G, Beyls J, et al. Predictability of the postoperative course of Crohn's disease. *Gastroenterology* 1990; 99:956-963.
233. D'Haens GR, Geboes K, Peeters M, et al. Early lesions of recurrent Crohn's disease caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum. *Gastroenterology* 1998; 114: 262-267.
234. Truelove SC, Witts LJ. Cortisone in ulcerative colitis. Final report on a therapeutic trial. *BMJ* 1955;2: 1041-1048.
235. Powell-Tuck J, Bown RL, Lennard-Jones JE. A comparison of oral prednisolone given as single or multiple daily doses for active proctocolitis. *Scan J Gastroenterol* 1978; 13: 833-837.
236. Rachmilewitz D. Coated mesalazine (5-aminosalicylic acid) versus sulphasalazine in the treatment of active ulcerative colitis: a randomized trial. *BMJ* 1989; 298: 82-86.
237. Seo M, Okada M, Yao T, et al. An index of disease activity in patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1992; 87: 971-976.
238. Lichtiger S, Present DH, Kornbluth A, et al. Cyclosporine in severe active ulcerative colitis refractory to steroid therapy. *N Engl J Med* 1994; 330: 1841-1845.
239. Walmsey RS, Ayres RC, Pounder RE, Allan RN. A simple clinical colitis activity index. *Gut* 1998;43: 29-32.
240. Feagan BG, Greenberg GR, Wild G, et al. Treatment of ulcerative colitis with a humanized antibody to the $\alpha 4\beta 7$ integrin. *N Engl J Med* 2005; 352: 2499-2507.
241. Baron JH, Connell AM, Lennard-Jones JE. Variation between observers in describing mucosal appearances in proctocolitis. *BMJ* 1964; 1: 89-92.
242. Schroeder KW, Tremaine WJ, Ilstrup DM. Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized trial. *N Engl J Med* 1987; 317: 1625-1629.
243. Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, et al. Infliximab induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2005; 353:2462-2476.
244. Sandborn WJ, Tremaine WJ, Schroeder KW, et al. A placebo-controlled trial of cyclosporine enemas for mildly to moderately active left-sided ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1994; 106: 1429-1435.

245. Sandborn WJ, Tremaine WJ, Hurt RD. Transdermal nicotine for ulcerative colitis. *Ann Intern Med* 1997; 127: 491-493.
246. Sandborn WJ, Sands BE, Wolf DC, et al. Repifermin (keratinocyte growth factor-2) for the treatment of active ulcerative colitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 1355-1364.
247. Van Assche G, Sandborn WJ, Feagan BG, et al. Daclizumab, a humanized monoclonal antibody to the interleukin-2 receptor (CD25), for the treatment of moderately to severely active ulcerative colitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trial. *Gut* 2006; 55: 1568-1574.
248. Sutherland LR, Martin F, Greer S, et al. 5-aminosalicylic acid enema in the treatment of distal ulcerative colitis, proctosigmoiditis, and proctitis. *Gastroenterology* 1987; 92: 1894-1898.
249. Sandborn WJ, Feagan BG, Hanauer SB, et al. A review of activity indices and efficacy end points for clinical trials of medical therapy in adults with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002; 122: 512-530.
250. D'Haens G, Sandborn WJ, Feagan BG, et al. A review of activity indices and efficacy end points for clinical trials of medical therapy in adults with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2007; 132:763-786.
251. Van Assche G, Dignass A, Panes J, et al. for the European Crohn's and Colitis Organization (ECCO). The second European evidence –based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Definitions and diagnosis. *J Crohn's Colitis* 2010;4: 7-27.
252. Sands BE. From symptom to diagnosis: clinical distinctions among various forms of intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2004;126(6):1518–32.
253. American Gastroenterological Association medical position statement: guidelines for the evaluation and management of chronic diarrhea. *Gastroenterology* 1999;116(6):1461–3.
254. Burgmann T, Clara I, Graff L, Walker J, Lix L, Rawsthorne P, et al. The Manitoba Inflammatory Bowel Disease Cohort Study: prolonged symptoms before diagnosis—how much is irritable bowel syndrome? *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4(5):614–20.

255. Pimentel M, Chang M, Chow EJ, Tabibzadeh S, Kirit-Kiriak V, Targan SR, et al. Identification of a prodromal period in Crohn's disease but not ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2000;95(12):3458–62.
256. Lennard-Jones JE, Shivananda S. Clinical uniformity of inflammatory bowel disease at presentation and during the first year of disease in the north and south of Europe. EC-IBD Study Group. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997;9(4):353–9.
257. Farmer RG, Hawk WA, Turnbull Jr RB. Clinical patterns in Crohn's disease: a statistical study of 615 cases. *Gastroenterology* 1975;68(4 Pt 1):627–35.
258. Schwartz DA, Loftus Jr EV, Tremaine WJ, Panaccione R, Harmsen WS, Zinsmeister AR, et al. The natural history of fistulizing Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota. *Gastroenterology* 2002;122(4):875–80.
259. Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekblom A. Appendectomy is followed by increased risk of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2003;124(1):40–6.
260. Bridger S, Lee JC, Bjarnason I, Jones JE, Macpherson AJ. In siblings with similar genetic susceptibility for inflammatory bowel disease, smokers tend to develop Crohn's disease and non-smokers develop ulcerative colitis. *Gut* 2002;51(1):21–5.
261. Garcia Rodriguez LA, Ruigomez A, Panes J. Acute gastroenteritis is followed by an increased risk of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2006;130(6):1588–94.
262. Sachar DB, Luppescu NE, Bodian C, Shlien RD, Fabry TL, Gumaste VV. Erythrocyte sedimentation as a measure of Crohn's disease activity: opposite trends in ileitis versus colitis. *J Clin Gastroenterol* 1990;12(6):643–6.
263. D'Inca R, Dal PE, Di LV, et al. Calprotectin and lactoferrin in the assessment of intestinal inflammation and organic disease. *Int J Colorectal Dis* 2007;22(4):429–37.
264. Gaya DR, Lyon TD, Duncan A, Neilly JB, Han S, Howell J, et al. Faecal calprotectin in the assessment of Crohn's disease activity. *QJM* 2005;98(6):435–41.
265. Tibble J, Teahon K, Thjodleifsson B, Roseth A, Sigthorsson G, Bridger S, et al. A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease. *Gut* 2000;47(4):506–13.

266. Tibble JA, Sigthorsson G, Bridger S, Fagerhol MK, Bjarnason I. Surrogate markers of intestinal inflammation are predictive of relapse in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2000;119(1):15–22.
267. Kane SV, Sandborn WJ, Rufo PA, Zholudev A, Boone J, Lyerly D, et al. Fecal lactoferrin is a sensitive and specific marker in identifying intestinal inflammation. *Am J Gastroenterol* 2003;98(6):1309–14.
268. de Jong NS, Leach ST, Day AS. Fecal S100A12: a novel noninvasive marker in children with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12(7):566–72.
269. Kaiser T, Langhorst J, Wittkowski H, Becker K, Friedrich AW, Rueffer A, et al. Faecal S100A12 as a non-invasive marker distinguishing inflammatory bowel disease from irritable bowel syndrome. *Gut* 2007;56(12):1706–13.
270. Mylonaki M, Langmead L, Pantes A, Johnson F, Rampton DS. Enteric infection in relapse of inflammatory bowel disease: importance of microbiological examination of stool. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004;16(8):775–8.
271. Bossuyt X. Serologic markers in inflammatory bowel disease. *Clin Chem* 2006;52(2):171–81.
272. Reese GE, Constantinides VA, Simillis C, Darzi AW, Orchard TR, Fazio VW, et al. Diagnostic precision of anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies and perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2006;101(10):2410–22.
273. Dubinsky MC, Kugathasan S, Mei L, Picorjnell Y, Nebel J, Wrobel I, et al. Increased immune reactivity predicts aggressive complicating Crohn's disease in children. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6(10):1105–11.
274. Ferrante M, Henckaerts L, Joossens M, Pierik M, Joossens S, Dotan N, et al. New serological markers in inflammatory bowel disease are associated with complicated disease behaviour. *Gut* 2007;56(10):1394–403.
275. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys? *Gut* 2006;55(3):426–31.
276. Coremans G, Rutgeerts P, Geboes K, Van den Oord J, Ponette E, Vantrappen G. The value of ileoscopy with biopsy in the diagnosis of intestinal Crohn's disease. *Gastrointest Endosc* 1984;30(3):167–72.

277. Geboes K, Ectors N, D'Haens G, Rutgeerts P. Is ileoscopy with biopsy worthwhile in patients presenting with symptoms of inflammatory bowel disease? *Am J Gastroenterol* 1998;93(2):201–6.
278. Cherian S, Singh P. Is routine ileoscopy useful? An observational study of procedure times, diagnostic yield, and learning curve. *Am J Gastroenterol* 2004;99(12):2324–9.
279. Allez M, Lemann M, Bonnet J, Cattan P, Jian R, Modigliani R. Long term outcome of patients with active Crohn's disease exhibiting extensive and deep ulcerations at colonoscopy. *Am J Gastroenterol* 2002;97(4):947–53.
280. Silverstein FE, Tytgat GNJ. Ulcerative colitis. In: *Atlas of Gastrointestinal Endoscopy*, 3rd edition. Silverstein FE, Tytgat GNJ (editors). London: Mosby Inc; 1997. Pp 294-317.
281. Koh DM, Miao Y, Chinn RJ, Amin Z, Zeegen R, Westaby D, et al. MR imaging evaluation of the activity of Crohn's disease. *Am J Roentgenol* 2001;177(6):1325–32.
282. Wold PB, Fletcher JG, Johnson CD, Sandborn WJ. Assessment of small bowel Crohn disease: noninvasive peroral CT enterography compared with other imaging methods and endoscopy— feasibility study. *Radiology* 2003;229(1):275–81.
283. Gourtsoyiannis NC, Grammatikakis J, Papamastorakis G, Koutroubakis J, Prassopoulos P, Rousomoustakaki M, et al. Imaging of small intestinal Crohn's disease: comparison between MR enteroclysis and conventional enteroclysis. *Eur Radiol* 2006;16(9):1915–25.
284. Rimola J, Rodriguez S, Garcia-Bosch O, et al. Magnetic resonance for assessment of disease activity and severity in ileocolonic Crohn's disease. *Gut* 2009;58(8):1113-20.
285. Albert JG, Martiny F, Krummenerl A, Stock K, Lesske J, Göbel CM, et al. Diagnosis of small bowel Crohn's disease: a prospective comparison of capsule endoscopy with magnetic resonance imaging and fluoroscopic enteroclysis. *Gut* 2005;54(12):1721–7.
286. Sailer J, Peloschek P, Schober E, Schima W, Reinisch W, Vogelsang H, et al. Diagnostic value of CT enteroclysis compared with conventional enteroclysis in patients with Crohn's disease. *Am J Roentgenol* 2005;185(6):1575–81.

287. Schmidt S, Lepori D, Meuwly JY, Duvoisin B, Meuli R, Michetti P, et al. Prospective comparison of MR enteroclysis with multidetector spiral-CT enteroclysis: interobserver agreement and sensitivity by means of "sign-by-sign" correlation. *Eur Radiol* 2003;13(6):1303–11.
288. Negaard A, Paulsen V, Sandvik L, Berstad AE, Borthne A, Try K, et al. A prospective randomized comparison between two MRI studies of the small bowel in Crohn's disease, the oral contrast method and MR enteroclysis. *Eur Radiol* 2007;17(9):2294–301.
289. Biancone L, Calabrese E, Petruzzello C, Onali S, Caruso A, Palmieri G, et al. Wireless capsule endoscopy and small intestine contrast ultrasonography in recurrence of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13(10):1256–65.
290. Martinez MJ, Ripollés T, Paredes JM, Blanc E, Marti-Bonmati L. Assessment of the extension and the inflammatory activity in Crohn's disease: comparison of ultrasound and MRI. *Abdom Imaging* 2009;34(2):141–8.
291. Rapaccini GL, Pompili M, Orefice R, Covino M, Riccardi L, Cedrone A, et al. Contrast-enhanced power doppler of the intestinal wall in the evaluation of patients with Crohn disease. *Scand J Gastroenterol* 2004;39(2):188–94.
292. Sans M, Fuster D, Llach J, Lomena F, Bordas JM, Herranz R, et al. Optimization of technetium-99m-HMPAO leukocyte scintigraphy in evaluation of active inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2000;45(9):1828–35.
293. Marshall JK, Cawdron R, Zealley I, Riddell RH, Somers S, Irvine EJ. Prospective comparison of small bowel meal with pneumocolon versus ileo-colonoscopy for the diagnosis of ileal Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2004;99(7):1321–9.
294. Voderholzer WA, Beinhold J, Rogalla P, Murrer S, Schachschal G, Lochs H, et al. Small bowel involvement in Crohn's disease: a prospective comparison of wireless capsule endoscopy and computed tomography enteroclysis. *Gut* 2005;54(3):369–73.
295. Seiderer J, Herrmann K, Diepolder H, Schoenberg SO, Wagner AC, Göke B, et al. Double-balloon enteroscopy versus magnetic resonance enteroclysis in diagnosing suspected small-bowel Crohn's disease: results of a pilot study. *Scand J Gastroenterol* 2007;42(11):1376–85.
296. Bentley E, Jenkins D, Campbell F, Warren B. How could pathologists improve the initial diagnosis of colitis? Evidence from an international workshop. *J Clin Pathol* 2002;55:955–60.

297. DeJaco C, Osterreicher C, Angelberger S, Püspök A, Birner P, Poetzi R, et al. Diagnosing colitis: a prospective study on essential parameters for reaching a diagnosis. *Endoscopy* 2003;35:1004–8.
298. Tanaka M, Riddell RH, Saito H, Soma Y, Hidaka H, Kudo H, et al. Morphologic criteria applicable to biopsy specimens for effective distinction of inflammatory bowel disease from other forms of colitis and of Crohn's disease from ulcerative colitis. *Scan J Gastroenterol* 1999;34:55–67.
299. Geboes K, Ectors N, D'Haens G, Rutgeerts P, et al. Is ileoscopy with biopsy worthwhile in patients presenting with symptoms of IBD? *Am J Gastroenterol* 1998;93:201–6.
300. Jenkins D, Balsitis M, Gallivan S, Dixon MF, Gilmour HM, Shepherd NA, et al. Guidelines for the initial biopsy diagnosis of suspected chronic idiopathic inflammatory bowel disease. The British Society of Gastroenterology Initiative. *J Clin Pathol* 1997;50:93–105.
301. Schumacher G, Kollberg B, Sandstedt B. A prospective study of first attacks of inflammatory bowel disease and infectious colitis. Histologic course during the 1st year after presentation. *Scand J Gastroenterol* 1994;29:318–32.
302. Seldenrijk CA, Morson BC, Meuwissen SGM, Schipper NW, Lindeman J, Meijer CJ, et al. Histopathological evaluation of colonic mucosal biopsy specimens in chronic inflammatory bowel disease: diagnostic implications. *Gut* 1991;32:151420.
303. Theodossi A, Spiegelhalter DJ, Jass J, Firth J, Dixon M, Leader M, et al. Observer variation and discriminatory value of biopsy features in inflammatory bowel disease. *Gut* 1994;35:961–8.
304. Surawicz CM. Serial sectioning of a portion of a rectal biopsy detects more focal abnormalities. A prospective study of patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1982;27:434–6.
305. Goldman H. Colonic mucosal biopsy in inflammatory bowel disease. *Surgical Pathology* 1991;4:3–23.
306. Jenkins D, Goodall A, Drew K. What is colitis? Statistical approach to distinguishing clinically important inflammatory change in rectal biopsy specimens. *J Clin Pathol* 1988;41:72–9.
307. Kleer CG, Appelman HD. Ulcerative colitis: patterns of involvement in colorectal biopsies and changes with time. *Am J Surg Pathol* 1998;22:983–9.

308. Tanaka M, Saito H, Fukuda S, Sasaki Y, Munakata A, Kudo H, et al. Simple mucosal biopsy criteria differentiating among Crohn's disease, ulcerative colitis, and other forms of colitis. Measurement of validity. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:281–6.
309. Cook MG, Dixon MF. An analysis of the reliability of detection and diagnostic value of various pathological features in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 1973;14:255–62.
310. Ectors NL, Dixon MF, Geboes KJ, Rutgeerts PJ, Desmet VJ, Vantrappen GR. Granulomatous gastritis : a morphological and diagnostic approach. *Histopathology* 1993;23:55–61.
311. Powell-Tuck J, Day DW, Buckell NA, Wadsworth J, Lennard-Jones JE. Correlations between defined sigmoidoscopic appearances and other measures of disease activity in ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 1982;27:533–7.
312. Both H, Torp-Pedersen K, Kreiner S, Hendriksen C, Binder V. Clinical appearance at diagnosis of ulcerative colitis and Crohn's disease in a regional patient group. *Scand J Gastroenterol* 1983;18:987–91.
313. Gomes P, du Boulay C, Smith CL, Holdstock G. Relationship between disease activity indices and colonoscopic findings in patients with colonic inflammatory bowel disease. *Gut* 1986;27: 92–5.
314. Rao SS, Holdsworth CD, Read NW. Symptoms and stool patterns in patients with ulcerative colitis. *Gut* 1988;29:342–5.
315. Drossman DA, Leserman J, Mitchell CM, et al. Ulcerative colitis and Crohn's disease health status scales for research and clinical practice. *J Clin Gastroenterol* 1992;15:104–12.
316. Lennard-Jones JE, Shivananda S, the EC-IBD Study Group. Clinical uniformity of inflammatory bowel disease at presentation and during the first year of disease in the north and south of Europe. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997;9:353–9.
317. Rath HC, Andus T, Caesar I, Scholmerich J. Initial symptoms, extra-intestinal manifestations and course of pregnancy in chronic inflammatory bowel diseases. *Med Klin (Munich)* 1998;93:6–10.
318. Seo M, Okada M, Maeda K, Oh K. Correlation between endoscopic severity and the clinical activity index in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1998;93:2124–9.

319. Illescas L, Garcia L, Faggioni F, Velasco L. Ulcerative colitis: a 52 year retrospective study. *Rev Gastroenterol Peru* 1999;19: 116–23.
320. Sands BE. From symptom to diagnosis: clinical distinctions among various forms of intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2004;126:1518–32.
321. Collins P, Rhodes J. Ulcerative colitis: diagnosis and management. *BMJ* 2006;333(7563):340–3.
322. Fine KD, Schiller LR. AGA technical review on the evaluation and management of chronic diarrhea. *Gastroenterology* 1999;116:1464–86.
323. Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet* 2007;369:1641–57.
324. Danese S, Semeraro S, Papa A, et al. Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2005;11:7227–36.
325. Mahid SS, Minor KS, Soto RE, Hornung CA, Galandiuk S. Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Mayo Clin Proc* 2006;81(11):1462–71.
326. Höie O, Wolters F, Riis L, et al. On behalf of the European Collaborative Study Group of Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). Ulcerative colitis: patient characteristics may predict 10-yr disease recurrence in a European-wide population based cohort. *Am J Gastroenterol* 2007;102(8):1692–701.
327. Beaugerie L, Massot N, Carbonnel F, et al. Impact of cessation of smoking on the course of ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2133–6.
328. Birrenbach T, Bocker U. Inflammatory bowel disease and smoking: a review of epidemiology, pathophysiology, and therapeutic implications. *Inflamm Bowel Dis* 2004;10:848–59.
329. Rudra T, Motley R, Rhodes J. Does smoking improve colitis? *Scand J Gastroenterol* 1989;170:61–3.
330. Rutgeerts P, D'Haens G, Hiele M, Geboes K, Vantrappen G. Appendectomy protects against ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1994;106:1251–3.
331. Frisch M, Johansen C, Mellekjær L, et al. Appendectomy and subsequent risk of inflammatory bowel diseases. *Surgery* 2001;130:36–43.
332. Koutroubakis IE, Vlachonikolis IG, Kouroumalis IE. Role of appendicitis and appendectomy in the pathogenesis of ulcerative colitis: a critical review. *Inflamm Bowel Dis* 2002;8:277–86.

333. Cosnes J, Carbonnel F, Beaugerie L, et al. Effects of appendectomy on the course of ulcerative colitis. *Gut* 2002;51:803–7.
334. Radford-Smith GL, Edwards JE, Purdie DM, et al. Protective role of appendectomy on onset and severity of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 2002;51:808–13.
335. Forrest K, Symmons D, Foster P. Systemic review: is ingestion of paracetamol or non-steroidal anti-inflammatory drugs associated with exacerbations of inflammatory bowel disease? *Aliment Pharmacol Ther* 2004;20:1035–43.
336. Takeuchi K, Smale S, Premchand P, et al. Prevalence and mechanisms of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced clinical relapse in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4:196–202.
337. Korzenik JR, Podolsky DK. Selective use of selective nonsteroidal anti-inflammatory drugs in inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4:157–9.
338. Sandborn WJ, Stenson WF, Brynskov J, et al. Safety of celecoxib in patients with ulcerative colitis in remission: placebo-controlled pilot study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4:203–11.
339. Vermeire S. Review article: genetic susceptibility and application of genetic testing in clinical management of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;24 (Suppl 3): 2–10.
340. Riis L, Vind I, Vermeire S, et al. The prevalence of genetic and serologic markers in an unselected European population-based cohort of IBD patients. R, Langholz E; European Collaborative Study Group on Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:24–32.
341. Joossens S, Daperno M, Shums Z, et al. Interassay and interobserver variability in the detection of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in patients with ulcerative colitis. *Clin Chem* 2004;50:1422–5.
342. Ajaj WM, Lauenstein TC, Pelster G, et al. Magnetic resonance colonography for the detection of inflammatory diseases of the large bowel: quantifying the inflammatory activity. *Gut* 2005;54:257–63.
343. Schreyer AG, Scheibl K, Heiss P, et al. MR colonography in inflammatory bowel disease. *Abdom Imaging* 2006;31:302–7.
344. Triester SL, Leighton JA, Leontiadis GI, et al. A meta-analysis of the yield of capsule endoscopy compared to other diagnostic modalities in patients

with non-stricturing small bowel Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2006;101:954–64.

345. Τζαρδή Μ, Ζώης Ε. Ιστολογική διάγνωση και διαφορική διάγνωση της ιδιοπαθούς φλεγμονώδους εντεροπάθειας. ΙΦΕΝ και δυσπλασία. Στο: Φλεγμονώδεις εντεροπάθειες, η ελληνική κατάσταση. Εκδοτική επιμέλεια: Μουζάς Ι, Εμμανουηλίδης Τ, Κουρούμαλης Η. Αθήνα 2001. Σελ. 143-52.
346. Dignass A, Van Assche G, Lindsay JO, et al. for the European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO). The second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management. *J Crohn's Colitis* 2010;4:28-62.
347. Travis SPL, Stange EF, Lemann M, et al. for the European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO). European evidence-based consensus on the management of Ulcerative Colitis: current management. *J Crohn's Colitis* 2008;2:24-62.

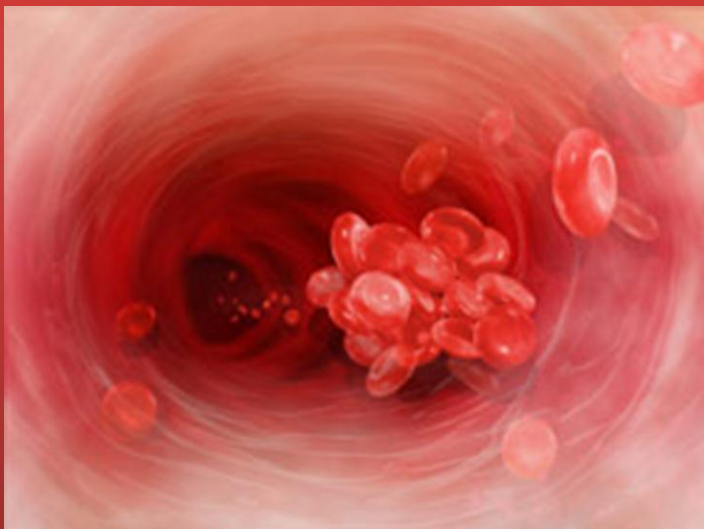
Η ΑΝΑΙΜΙΑ ΣΤΙΣ
ΙΔΙΟΠΑΘΕΙΣ
ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ
ΕΝΤΕΡΙΚΕΣ ΝΟΣΟΥΣ

Μέρος 2ο

Κεφάλαιο 1: Ορισμός, αιτιολογία, κλινικά
χαρακτηριστικά

Η αναιμία στις Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Εντερικές Νόσους

Μέρος 2ο



Η αναιμία είναι μία από τις συχνότερες εξωεντερικές εκδηλώσεις των ΙΦΕΝ, με ισχυρή επίδραση στην ποιότητα ζωής¹⁻⁵. Μόνο κατά τη διάρκεια της προηγούμενης δεκαετίας, έγινε η παθοφυσιολογία, διάγνωση και θεραπεία της αναιμίας των ΙΦΕΝ, σημαντικό κομμάτι της καθημερινής κλινικής πρακτικής. Μέχρι τότε, υποδιαγιγνώσκονταν, λόγω της φτωχής συσχέτισης των συμπτωμάτων με τα αίτια, ή αποδιδόταν σε άλλες αιτίες. Από την άλλη μεριά, μέχρι πρόσφατα η αναιμία αποτελούσε ένα μυστήριο για τον κλινικό των ΙΦΕΝ, εξαιτίας της ανεπαρκούς γνώσης των παθοφυσιολογικών μηχανισμών της^{6,7}. Κατά τη δεκαετία του 2010, ένας μεγάλος όγκος ερευνητικών εργασιών αποκάλυψε τους μηχανισμούς της, αναγνώρισε τη σημαντική επίδρασή της στην ποιότητα ζωής^{8,9}, συσχέτισε τα συμπτώματα με τις εργαστηριακές τιμές, προσπάθησε να σκιαγραφήσει τους δύο κύριους τύπους της στις ΙΦΕΝ και τελικά συντελέστηκε και μεγάλη πρόοδος στην ανάπτυξη νέων, πρωτοπόρων διαγνωστικών δεικτών. Ταυτόχρονα, αναπτύχθηκαν νέα θεραπευτικά μοντέλα, ιδίως στο πεδίο της θεραπείας υποκατάστασης με σίδηρο και ερυθροποιητίνη. Όλη αυτή η εξέλιξη, έχει οδηγήσει στις μέρες μας στην αναγνώριση της διάγνωσης και θεραπείας της αναιμίας ως έναν από τους πιο προκλητικούς τομείς της κλινικής πρακτικής των ΙΦΕΝ.

Η αναιμία είναι ένα από τα κυρίαρχα συμπτώματα μίας πληθώρας διαφορετικών αιματολογικών και όχι μόνο νοσημάτων, ειδικά σε νέες γυναίκες και σε γηριατρικό πληθυσμό, ενώ αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα δημόσιας υγείας στις αναπτυσσόμενες χώρες. Η παρουσία της δε θα πρέπει σε καμία περίπτωση να εκλαμβάνεται ως «φυσιολογική» ενώ θα πρέπει πάντοτε να αναζητείται η πραγματική αιτία της. Ως αναιμία μπορεί να ορισθεί η μειωμένη μάζα των ερυθροκυττάρων, αλλά στην κλινική πρακτική η διερεύνηση αυτής της παραμέτρου είναι αρκετά πολύπλοκη. Εκτός μερικών εξαιρέσεων (αναιμία της κύησης, οξεία αιμορραγία, κλπ), το επίπεδο της αιμοσφαιρίνης είναι επαρκές για την εκτίμηση του όγκου αίματος. Στην πραγματικότητα, δεν υπάρχει ένας ομοιόμορφος και ενιαίος ορισμός της αναιμίας, καθώς θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη διάφοροι παράγοντες όπως η ηλικία, το φύλο, η φυλή, η τοποθεσία (επίπεδο της επιφάνειας της θάλασσας ή υψηλότερο), η κύηση, το κάπνισμα και η φυσική κατάσταση^{10,11}. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ), ως αναιμία ορίζεται το επίπεδο αιμοσφαιρίνης κάτω από 120 g/L σε γυναίκες (<110 g/L για εγκύους) και κάτω από 130 g/L σε άνδρες, στο επίπεδο της θάλασσας¹² (πίνακας 1). Ο ορισμός αυτός περιλαμβάνει τις λεγόμενες ψευδο-αναιμικές καταστάσεις

(κύηση, καρδιακή ανεπάρκεια και υπερπρωτεϊναιμία), στις οποίες η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης μειώνεται, σαν αποτέλεσμα της αύξησης του όγκου πλάσματος.

| Age or Sex Group | Hemoglobin | | Hematocrit |
|------------------------------|------------|----------|------------|
| | (g/dL) | (mmol/L) | (%) |
| Children 6 months to 5 years | 11.0 | 6.83 | 33 |
| Children 5-11 years | 11.5 | 7.14 | 34 |
| Children 12-13 years | 12.0 | 7.45 | 36 |
| Nonpregnant women | 12.0 | 7.45 | 36 |
| Pregnant women | 11.0 | 6.83 | 33 |
| Men | 13.0 | 8.07 | 39 |

Πίνακας 1. Ελάχιστες τιμές αιμοσφαιρίνης και αιματοκρίτη που χρησιμοποιούνται στον ορισμό της αναιμίας, σε άτομα που ζουν στο επίπεδο της θάλασσας. (Πηγή: αναφορά 12)

Αντίθετα, μία ελαττωμένη μάζα των ερυθροκυττάρων μπορεί να επισκιασθεί από αιμοσυμπύκνωση, σαν αποτέλεσμα ελαττωμένου όγκου πλάσματος. Η σιδηροπενική αναιμία (ΣΠΑ) λαμβάνει χώρα όταν εξαντλούνται οι αποθήκες σιδήρου και μειώνεται η προμήθεια με σίδηρο του μυελού των οστών. Η ΣΠΑ είναι μία ακραία κατάσταση σιδηροπενίας, στην οποία η αιμοσφαιρίνη μειώνεται σε επίπεδο κατώτερο του κατώτερου φυσιολογικού ορίου. Ως ΣΠΑ ορίζεται η αναιμία με τη βιοχημική τεκμηρίωση της σιδηροπενίας. Ως αναιμία χρόνιας νόσου (AXN) ορίζεται η αναιμία που προκύπτει ως αποτέλεσμα διαταραχής του μεταβολισμού του σιδήρου (κατακράτησή του στο δικτυοενδοθηλιακό σύστημα), της ερυθροποίησης και της επιβίωσης των ερυθροκυττάρων, από μεσολαβητές της φλεγμονής, σε ενεργό νόσο^{13,14}.

Η αναιμία στους ασθενείς με ΙΦΕΝ μπορεί να οφείλεται πρωταρχικά σε σιδηροπενία εξαιτίας χρόνιας απώλειας αίματος αλλά και μειωμένης απορρόφησης του σιδήρου των τροφών από τον εντερικό βλεννογόνο, λόγω της φλεγμονής¹⁵⁻¹⁹. Ωστόσο, η αναιμία των ΙΦΕΝ φαίνεται να είναι πολυπαραγοντικής αιτιολογίας, και συχνότερα εμφανίζεται ως το αποτέλεσμα του συνδυασμού της σιδηροπενίας (συχνότερης αιτίας) και της αναιμίας της φλεγμονής ή αναιμίας χρόνιας νόσου (δεύτερης συχνότερης αιτίας)²⁰. Σε μερικές περιπτώσεις, μπορεί να προκαλείται από φάρμακα (Σουλφασαλαζίνη, θειοπουρίνες)^{21,22}, από αιμόλυση ή μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο.

Επιπρόσθετα, σε μερικούς ασθενείς με NC, η μειωμένη πρόσληψη της βιταμίνης B12 ή/και του φυλικού οξέος, εξαιτίας της φλεγμονής του ΛΕ ή/και εκτεταμένης εντερεκτομής, μπορεί να συμβάλλει στην εμφάνιση αναιμίας, ενώ συνήθως υπάρχει αλληλοεπικάλυψη όλων των ανωτέρω καταστάσεων²⁰ (πίνακας 2).

| | |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Common | Iron deficiency Anemia of chronic disease |
| Occasional | Vitamin B ₁₂ deficiency Folate deficiency Drug-induced (sulfasalazine, thiopurines) |
| Exceptional | Hemolysis Myelodysplastic syndrome Aplasia (often drug-induced) Inborn hemoglobinopathies or disorders of erythropoiesis |

Πίνακας 2. Αιτιολογία της αναιμίας στις ΙΦΕΝ. (Πηγή: αναφορά 13)

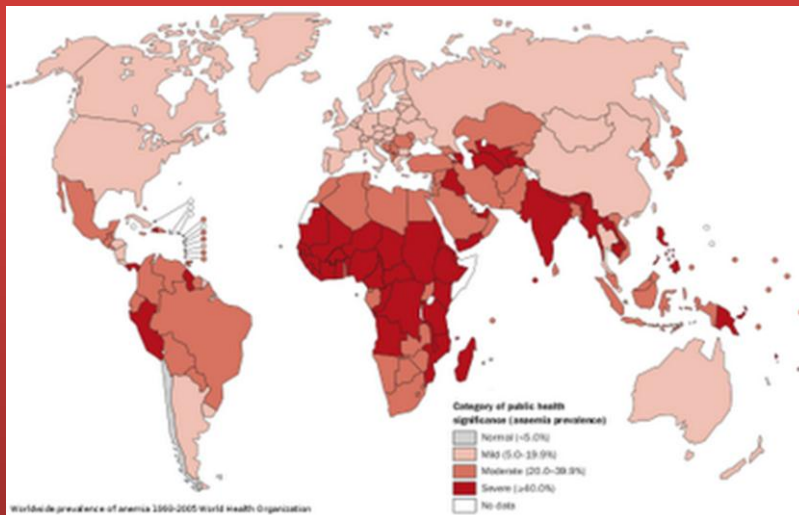
Η επίδραση της αναιμίας στην ποιότητα ζωής τόσο γενικά σε όλους τους ασθενείς^{23,24}, όσο ειδικότερα και σε ασθενείς με ΙΦΕΝ^{5,6,7,9}, είναι εξαιρετικά σημαντική. Επιπλέον, η αναιμία μπορεί να επιδεινώσει την ποιότητα ζωής ακόμα και πριν την εμφάνιση ειδικής συμπτωματολογίας^{8,9}. Όπως έχει πολύ εύστοχα επισημανθεί από τους Gasche και συν^{6,7}, επί μακρόν θεωρούνταν ότι η κλινική εικόνα της αναιμίας- όπως αυτή εκδηλώνεται με κόπωση, αδυναμία, ζάλη, κεφαλαλγία, δύσπνοια, ταχυκαρδία, αδυναμία συγκέντρωσης και έκπτωση των πνευματικών λειτουργιών- εμφανίζεται μόνο μετά από σημαντική πτώση των επιπέδων αιμοσφαιρίνης. Υπήρχε η πεποίθηση ότι οι ασθενείς είχαν την ικανότητα προσαρμογής στα χαμηλά επίπεδα αιμοσφαιρίνης, εάν η αναιμία εξελισσόταν με αργό ρυθμό. Αυτό οδήγησε στον όρο της «ασυμπτωματικής» αναιμίας. Στην πραγματικότητα, ο όρος «ασυμπτωματική» φαίνεται να αντικατοπτρίζει το γεγονός ότι πιθανώς η έκπτωση της φυσικής και πνευματικής κατάστασης, αλλά και της ποιότητας ζωής, να παραμένει μη αναγνωρίσιμη τόσο από τους ασθενείς, όσο και από τους ιατρούς. Ως εκ τούτου, η διαδικασία προσαρμογής στη χρόνια αναιμία, θα μπορούσε στην πραγματικότητα, να αποτελεί προσαρμογή σε χαμηλότερη ποιότητα ζωής^{6,7,25}. Είναι λοιπόν πολύ σημαντικό, το γεγονός ότι μπορεί να υπάρχει αναιμία, χωρίς σημαντικά συμπτώματα, λόγω «προσαρμογής» σε χαμηλότερο επίπεδο ζωής

όπως περιγράφηκε ανωτέρω, αλλά και αντίθετα, η συμπτωματολογία της να εκδηλωθεί πριν την επιδείνωση των αιματολογικών δεικτών, γεγονός που επισημαίνει το χαμηλό διαγνωστικό ουδό που θα πρέπει να διακρίνει το θεράποντα ιατρό, για την έγκαιρη αναγνώριση και αντιμετώπιση της διαταραχής αυτής.

Είναι αξιοσημείωτο ότι η ποιότητα ζωής των αναιμικών ασθενών με ΙΦΕΝ, μπορεί να είναι τόσο χαμηλή όσο και εκείνη των αναιμικών ασθενών με προχωρημένο καρκίνο²⁶. Επιπλέον, η χρόνια κόπωση λόγω αναιμίας, μπορεί να εξουθενώσει, επηρεάσει και ενοχλήσει τους ασθενείς, σε βαθμό παρόμοιο με εκείνον λόγω κοιλιακού άλγους ή διάρροιας⁷. Ως εκ τούτου, το όφελος στην ποιότητα ζωής που προσδοκείται από τη διόρθωση της αναιμίας, σε ασθενείς με ΙΦΕΝ, μπορεί να είναι παρόμοιο με το όφελος από τον έλεγχο της διάρροιας^{7,9,27}. Φαίνεται τέλος ότι, η επίδραση της αναιμίας στην κόπωση και τις καθημερινές δραστηριότητες είναι ανεξάρτητη από το βαθμό ενεργότητας της νόσου²⁸, γι' αυτό άλλωστε θα πρέπει να διαγιγνώσκεται και να αντιμετωπίζεται ακόμη και σε περιπτώσεις όπου η νόσος βρίσκεται σε ύφεση.

Η αναιμία στις Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Εντερικές Νόσους

Μέρος 2ο



Είναι σύνηθες φαινόμενο η μη αναφορά της αναιμίας, ως στοιχείο της κλινικής εικόνας του ασθενούς ή ως κλινικό πρόβλημα, τόσο στην κλινική πρακτική, όσο και στη βιβλιογραφία^{2,29}. Αυτό το γεγονός, φαίνεται να στηρίζεται, πιθανώς, στην πεποίθηση ορισμένων συγγραφέων ότι η αναιμία είναι ένα μάλλον ασύνηθες πρόβλημα στις ΙΦΕΝ. Αντιθέτως, η αναιμία είναι πολύ συχνή σε ασθενείς με ΙΦΕΝ, μολοντί ο αναφερόμενος επιπολασμός παρουσιάζει ευρεία διακύμανση, καθώς εξαρτάται τόσο από τον ορισμό της αναιμίας, όσο και από τον υπό διερεύνηση πληθυσμό ασθενών (νοσηλεύόμενοι έναντι εξωτερικών ασθενών)^{1,5,21} (πίνακας 1). Σε μία συστηματική ανασκόπηση που δημοσιεύθηκε το 2004, ο επιπολασμός της αναιμίας σε ασθενείς με ΙΦΕΝ κυμαινόταν από 9% έως 74%⁵. Σε μία άλλη, μεταγενέστερη, συστηματική ανασκόπηση, που συμπεριέλαβε 19 μελέτες (κυρίως με ασθενείς με NC), ο επιπολασμός κυμαινόταν μεταξύ 6% και 74%¹. Μετά από μία ενδελεχή διερεύνηση της βιβλιογραφίας, σε βάθος χρόνου^{16-18,30-48}, η υπολογιζόμενη μέση τιμή του επιπολασμού της αναιμίας στις ΙΦΕΝ, φαίνεται να κυμαίνεται γύρω στο 17%². Ωστόσο, όπως προαναφέρθηκε, ο επιπολασμός εξαρτάται από τον πληθυσμό υπό διερεύνηση: σε μη νοσηλεύόμενους ασθενείς είναι περίπου 16%, ενώ σε νοσηλεύόμενους ανεβαίνει μέχρι και το 68%. Σε πρόσφατη μελέτη 253 ασθενών με ΙΦΕΝ, από την Ισπανία⁴⁹, αναιμία βρέθηκε στο 30% των ασθενών, εκ των οποίων το 67% εμφάνιζε ΣΠΑ. Η παρουσία αναιμίας σχετιζόταν με την ενεργότητα της νόσου, τη χρήση στεροειδών, την ανάγκη νοσηλείας και την παρουσία δεικτών ενεργού φλεγμονής. Ο επιπολασμός της αναιμίας ήταν υψηλότερος σε ασθενείς με NC, απ' ότι με ΕΚ. Σε άλλη μελέτη από τη νότια Ευρώπη (Ιταλία)⁵⁰, σε ομάδα 168 ασθενών με NC και 98 με ΕΚ, αναιμία εμφάνιζε το 43% και το 34%, αντίστοιχα. Η αναιμία ήταν συχνότερη κατά τη διάγνωση (65%), παρά κατά την παρακολούθηση. Οι περισσότεροι αναιμικοί ασθενείς εμφάνιζαν είτε ΣΠΑ, είτε ΑΧΝ, ακολουθούμενες από τα άλλα αίτια αναιμίας. Σε μία πολυκεντρική μελέτη από τη βόρεια Ευρώπη, που περιελάμβανε 429 εξωτερικούς ασθενείς από έξι κέντρα της Δανίας, Νορβηγίας και Σουηδίας⁵¹, ο συνολικός επιπολασμός της αναιμίας ήταν 19%, ενώ ήταν σημαντικά υψηλότερος σε ασθενείς με NC, παρά με ΕΚ. Από αυτούς, το 20% εμφάνιζε ΣΠΑ, το 12% ΑΧΝ, ενώ το 68% μεικτή αναιμία. Όσον αφορά τη διαστρωμάτωση της αναιμίας στις διάφορες ηλικιακές ομάδες, σε μία πολύ πρόσφατη μελέτη από το Ηνωμένο Βασίλειο⁵², με 59 παιδιά, 54 εφήβους και 124 ενήλικες, ο επιπολασμός της αναιμίας ήταν 70%, 42% και 40%, αντίστοιχα, καθιστώντας τη έτσι πιο συχνή σε παιδιά/εφήβους απ' ότι σε ενήλικες. Φαίνεται λοιπόν ότι η αναιμία κατέχει την πρώτη σε συχνότητα θέση στην κατάταξη με τις εξωεντερικές εκδηλώσεις των ΙΦΕΝ².

| Author | Number of patients | Population | Prevalence (%) |
|-------------------------------|--------------------|--------------------------|----------------|
| Bambach and Hill (11) | 36 | Outpatient | 17 |
| Beeken (12) | 11 | Outpatient | 73 |
| Beeken (13) | 63 | Inpatient | 70 |
| Burbige <i>et al.</i> (14) | 58 | Outpatient | 52 |
| Dyer <i>et al.</i> (15) | 63 | Inpatient | 64 |
| Ebinger <i>et al.</i> (16) | 390 | Outpatient | 6 |
| Ershler <i>et al.</i> (17) | 7,200 | Outpatient | 13 |
| Gasche <i>et al.</i> (18) | 49 | Outpatient | 34 |
| Greenstein <i>et al.</i> (19) | 160 | Inpatient | 71 |
| Harries <i>et al.</i> (20) | 55 | Outpatient | 44 |
| Hoffbrand <i>et al.</i> (21) | 64 | Inpatient and outpatient | 44 |
| Horina <i>et al.</i> (22) | 85 | Outpatient | 33 |
| Lakatos <i>et al.</i> (23) | 254 | Outpatient | 60 |
| Niv and Abukasis (24) | 147 | Outpatient | 9 |
| Niv <i>et al.</i> (25) | 53 | Outpatient | 37 |
| Oldenburg <i>et al.</i> (26) | – | Outpatient | 29 |
| Reilly <i>et al.</i> (27) | 34 | Inpatient | 55 |
| Revel-Vilk <i>et al.</i> (28) | 63 | Outpatient | 41 |
| Schreiber <i>et al.</i> (29) | 676 | Outpatient | 31 |
| Vijverman <i>et al.</i> (30) | 170 | Outpatient | 25 |
| Walker <i>et al.</i> (31) | 2,894 | Outpatient | 13 |
| Werlin and Grand (32) | 19 | Inpatient | 74 |

Πίνακας 1. Επιπολασμός της αναιμίας σε ασθενείς με Νόσο Crohn (Πηγή: αναφορά 21)

Αναφορικά με τον επιπολασμό της σιδηροπενίας σε ασθενείς με ΙΦΕΝ, φαίνεται ότι αυτή είναι ακόμα πιο συχνή από την αναιμία καθ' εαυτή, αν και η διερεύνηση και ανάδειξή της απαιτεί πιο ενδελεχή έλεγχο² (πίνακας 2). Στην πραγματικότητα, η σιδηροπενία είναι η κύρια αιτία αναιμίας σε ασθενείς με ΙΦΕΝ, σαν αποτέλεσμα διαιτητικών περιορισμών, δυσσαπορρόφησης (εν μέρει λόγω φλεγμονής), απώλειας αίματος από τον εντερικό βλεννογόνο, ή/και υποθεραπείας της αναιμίας (επαναφορά των επιπέδων αιμοσφαιρίνης στις φυσιολογικές τιμές, χωρίς όμως αναπλήρωση των αποθηκών σιδήρου). Σε μία συστηματική ανασκόπηση¹, ο επιπολασμός της σιδηροπενίας κυμαινόταν μεταξύ 36% και 90%, ανάλογα με τον ορισμό της

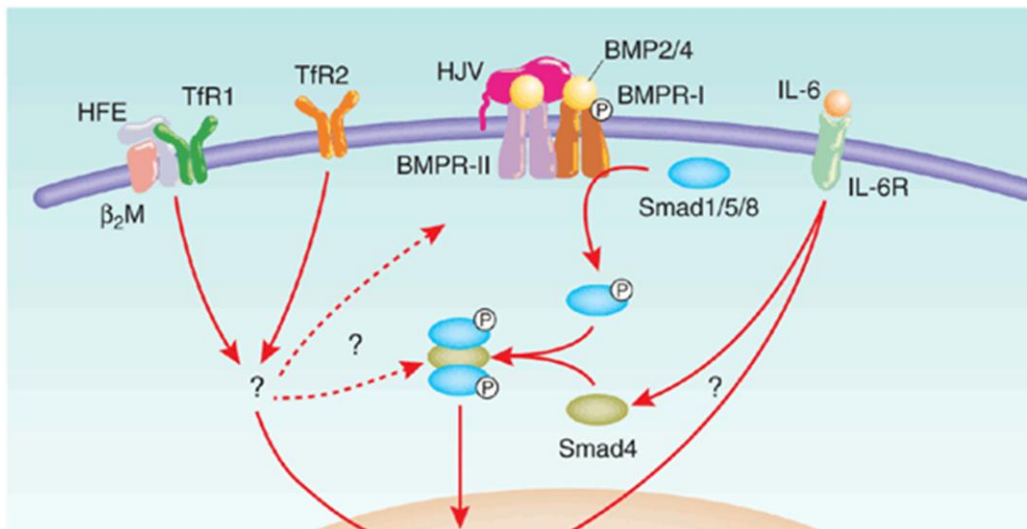
σιδηροπενίας και τον πληθυσμό ελέγχου^{17,40,44,53-55}. Σε μία μεταγενέστερη συστηματική ανασκόπηση², ο μέσος επιπολασμός σιδηροπενίας στις ΙΦΕΝ ήταν 45%, γεγονός που την καθιστά τον κανόνα μάλλον, παρά την εξαίρεση σε τέτοιους ασθενείς, ειδικά σε πιο σοβαρές περιπτώσεις. Σε έτερη, πολύ πρόσφατη πολυκεντρική μελέτη, με 429 εξωτερικούς ασθενείς από τη Δανία, Νορβηγία και Σουηδία (βλέπε προηγούμενη παράγραφο)⁵¹, ο επιπολασμός της σιδηροπενίας ήταν 35%, ενώ σε επίσης πρόσφατη μελέτη με παιδιά, εφήβους και ενήλικες, ήταν 88%, 83% και 55%, αντίστοιχα⁵².

| Author | n | Prevalence (%) |
|-------------------------------------------------|-----|----------------|
| Bergamaschi <i>et al.</i> (2009) ¹⁰⁸ | 263 | 42 |
| deVizia <i>et al.</i> (1992) ¹⁰⁹ | 11 | 72 |
| Gasche <i>et al.</i> (1994) ¹¹⁰ | 49 | 76 |
| Lakatos <i>et al.</i> (2003) ¹¹¹ | 254 | 36 |
| Ormerod <i>et al.</i> (1968) ¹¹² | 24 | 75 |
| Revel-Vilk <i>et al.</i> (2000) ¹¹³ | 26 | 42 |
| Stein <i>et al.</i> (unpublished data) | 188 | 74 |
| Wells <i>et al.</i> (2006) ⁶ | 50 | 76 |

Πίνακας 2. Μελέτες αξιολόγησης του επιπολασμού της σιδηροπενικής αναιμίας σε ασθενείς με ΙΦΕΝ. (Πηγή: αναφορά 180)

Η αναιμία στις Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Εντερικές Νόσους

Μέρος 2ο

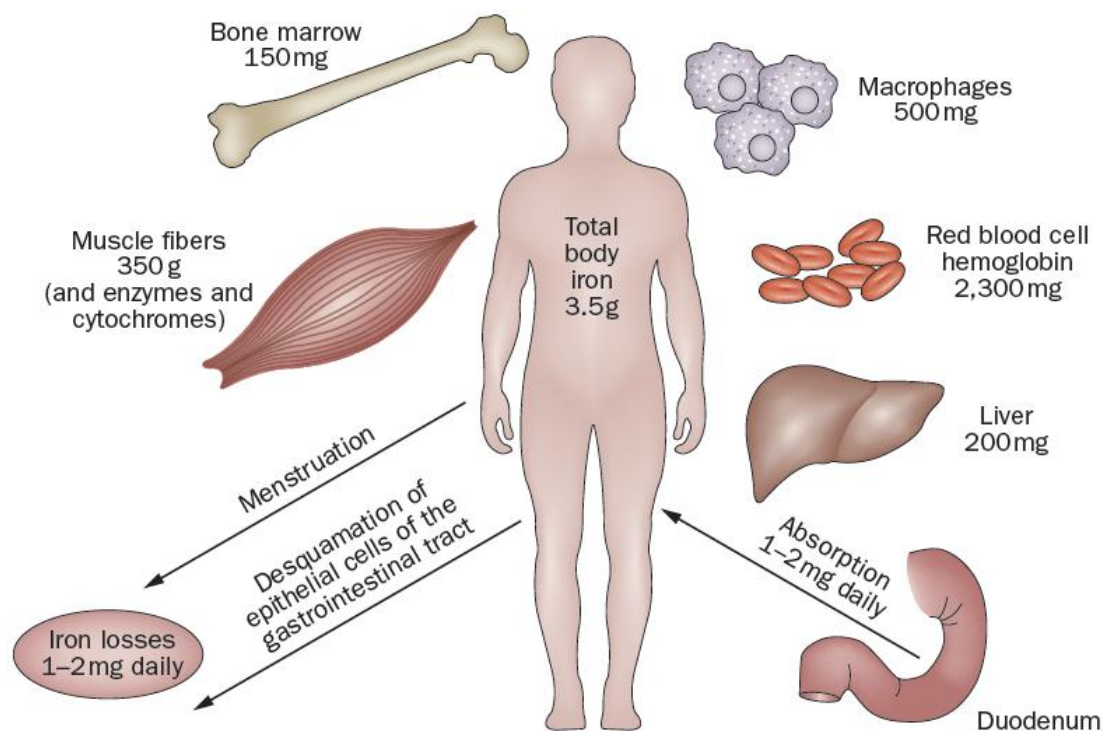


3.1. Εισαγωγή

Η αναιμία των ΙΦΕΝ στηρίζεται σε ένα μοντέλο συνδυασμού σιδηροπενίας και ΑΧΝ, το οποίο λειτουργεί στη βάση των αρνητικών επιδράσεων ενός ενεργοποιημένου ανοσολογικού μηχανισμού σε διάφορα στάδια της ερυθροποίησης^{7,14,29}. Πέρα από τη χρόνια απώλεια αίματος εξαιτίας του φλεγμαίνοντος βλεννογόνου, την περιορισμένη διαιτητική πρόσληψη σιδήρου και τη μειωμένη εντερική απορρόφηση του σιδήρου που στηρίζουν το ρόλο της ΣΠΑ στην αναιμία των ΙΦΕΝ, πολύ μεγάλο ρόλο στην τελική κλινική εικόνα παίζουν οι μηχανισμοί μέσω των οποίων οριοθετείται και εδραιώνεται η ΑΧΝ, η οποία σε συνδυασμό με το βαθμό σιδηροπενίας στον κάθε ασθενή, είναι υπεύθυνη για τη συνδυαστική εικόνα αναιμίας που είναι το πιο συχνό εύρημα στα νοσήματα αυτά⁵⁶.

Ο σίδηρος (Fe) είναι ένα παράδοξο χημικό στοιχείο, υπό την έννοια ότι είναι ταυτόχρονα απαραίτητο για κάθε μορφή ζωής, πρωταρχικώς για τη διασφάλιση της μεταφοράς οξυγόνου ή καταλύοντας αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων, χρήσης του αζώτου ή σύνθεσης DNA, αλλά είναι επίσης και τοξικό εξαιτίας της ικανότητάς του να αντιδρά με το οξυγόνο και να καταλύει την παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου. Υπό διάλυση, ο σίδηρος μπορεί να βρίσκεται υπό δύο μορφές οξείδωσης, τη δισθενή (FeII) και την τρισθενή (FeIII), ενώ είναι πολύ ασθενώς διαλυτός σε φυσιολογικό pH, ειδικά ως FeIII. Ως εκ τούτου, οι ζωντανοί οργανισμοί έχουν αναπτύξει πληθώρα πρωτεϊνών ώστε να τον μεταφέρουν σε βιολογικά υγρά ή διαμέσου κυτταρικών μεμβρανών και να τον αποθηκεύουν σε μη τοξικές και εύκολα κινητοποιήσιμες μορφές^{57,58}. Το συνολικό ποσό σιδήρου στο ανθρώπινο σώμα ενός ενήλικα είναι περίπου 4-5 gr, με το περισσότερο από αυτό να είναι δεσμευμένο στην αιμοσφαιρίνη στα κυκλοφορούντα ερυθρά αιμοσφαίρια (περίπου 2.5 gr). Περίπου 10% βρίσκεται στις μυϊκές ίνες (μυοσφαιρίνη) και άλλους ιστούς (ένζυμα και κυτοχρώματα). Ο υπόλοιπος αποθηκεύεται στο ήπαρ, στα μακροφάγα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος και στο μυελό των οστών. Ο σίδηρος της αίμης ανακυκλώνεται συνεχώς, ακολουθώντας τη φαγοκυττάρωση και τον καταβολισμό των γηραιών ερυθροκυττάρων από τα ιστικά μακροφάγα. Αυτή η διαδικασία καθιστά δυνατή την ανακύκλωση περίπου 25-30 mg σιδήρου ημερησίως, που αντιστοιχούν στις ημερήσιες ανάγκες σιδήρου για ερυθροποίηση⁵⁹. Η εντερική απορρόφηση του σιδήρου, που διασφαλίζεται από τα ώριμα εντεροκύτταρα στην κορυφή των εντερικών λαχνών, είναι 1-2 mg την ημέρα, που καλύπτει τις απώλειες που προκύπτουν από την απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων^{60,61} (εικόνα 1). Μόνο μία ακριβής ρύθμιση της εντερικής απορρόφησης του

σιδήρου μπορεί να αποτρέψει την υπερφόρτωση του οργανισμού με σίδηρο, καθώς δεν υπάρχουν τα μέσα για την καταστροφή του πλεονάζοντος απορροφηθέντος σιδήρου^{62,63}.



Εικόνα 1. Η ομοίωση του σιδήρου, στον ανθρώπινο οργανισμό, υπό φυσιολογικές συνθήκες. Για αναλυτική περιγραφή, βλέπε κείμενο. (Πηγή: αναφορά 180)

3.2. Κύρια μονοπάτια ομοιόστασης του σιδήρου

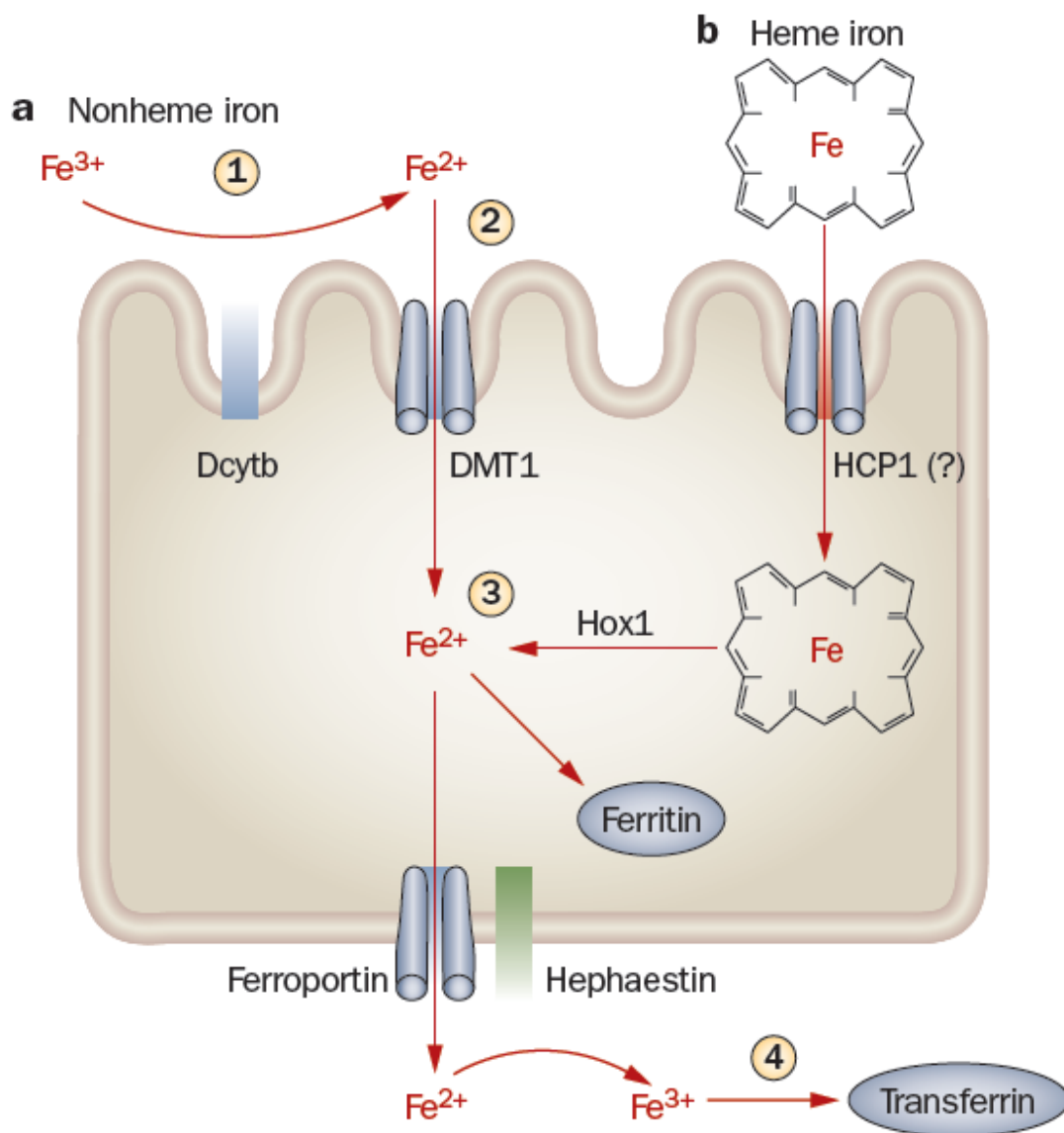
3.2.1. Απορρόφηση του σιδήρου

Η κανονική Δυτική δίαιτα περιέχει 15-20 mg σιδήρου σε μορφή αίμης (10%) και άλλες μορφές (ιοντική, 90%), εκ των οποίων τα 1-2 mg απορροφώνται καθημερινά κυρίως στο δωδεκαδάκτυλο. Η απορρόφηση του σιδήρου ισορροπείται έναντι των απωλειών λόγω πεπτοκότων εντερικών βλεννογονικών κυττάρων, εμμήνου ρύσεως και άλλων απωλειών. Η καθημερινή απορρόφηση του σιδήρου μπορεί να αυξηθεί ως απάντηση σε αυξημένες ανάγκες για σίδηρο (π.χ. ανάπτυξη, κύηση ή απώλεια αίματος).

Ο εκτός-αίμης σίδηρος των τροφών υπάρχει κυρίως στην οξειδωμένη 3σθενή μορφή του (FeIII), που δεν είναι κατάλληλη για βιολογικές λειτουργίες, και θα πρέπει πρώτα να αναχθεί στη 2σθενή μορφή του (FeII) από το ένζυμο ferrireductase (μία μεμβρανική αναγωγή της οικογένειας b561 των κυτοχρωμάτων που η έκφρασή της επάγεται ισχυρά από τη σιδηροπενία), που χρησιμοποιεί τη βιταμίνη C ως συνένζυμο, πριν μεταφερθεί διαμέσου του εντερικού επιθηλίου. Η μεταφορά διενεργείται από μία πρωτεΐνη μεταφορέα που καλείται “μεταφορέας 2σθενών μετάλλων-1” (divalent metal transporter 1, DMT1), η οποία διαχειρίζεται και τη μεταφορά και άλλων ιόντων μετάλλων, όπως ο ψευδάργυρος, ο χαλκός και το κοβάλτιο, μέσω ενός μηχανισμού σύζευξης πρωτονίων^{61,62} (εικόνα 2). Η απορρόφηση του εκτός-αίμης σιδήρου μπορεί να ελαττωθεί από τη συγχορήγηση τετρακυκλινών, αναστολέων αντλίας πρωτονίων και άλλων αντιόξινων, φυτικών ινών, ασβεστίου και τροφών που περιέχουν φαινόλες. Επιπλέον, το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού είναι αίτιο γαστρικής ατροφίας, που μπορεί να οδηγήσει σε ΣΠΑ⁶⁴.

Ο σίδηρος της αίμης απορροφάται από το εντεροκύτταρο από μία, όχι πλήρως ταυτοποιημένη, πρωτεΐνη μεταφορέα της αίμης-1 (HCP1)⁶⁵. Μετά την είσοδο στο εντεροκύτταρο, φαίνεται ότι το μεγαλύτερο ποσοστό της αίμης των τροφών μεταβολίζεται από την οξυγενάση της αίμης ώστε να αποδώσει 2σθενή σίδηρο, ο οποίος εισέρχεται σε ένα κοινό μονοπάτι με τον εκτός-αίμης σίδηρο των τροφών, πριν εξέλθει του εντεροκυττάρου^{60,61} (εικόνα 2). Ωστόσο, παραμένει αδιευκρίνιστο εάν ένα ποσοστό της αίμης που εισήλθε στο εντεροκύτταρο, εξέρχεται από αυτό άθικτη, μέσω της δράσης των προσφάτως χαρακτηρισθέντων εξαγωγέων αίμης, που εκφράζονται επίσης στους νεφρούς, στο ήπαρ και τους ερυθροβλάστες, υποδηλώνοντας ότι μπορούν να δρουν στα σημεία εκείνα⁶⁶. Η αίμη του πλάσματος δεσμεύεται και μεταφέρεται από την haemorexin στα ηπατοκύτταρα προς αποδόμηση.

Μετά την είσοδο στο εντερικό επιθηλιακό κύτταρο, ο περισσότερος 2σθενής σίδηρος εξέρχεται από την πλευρά της βασικής μεμβράνης με την ferroportin 1 και οξειδώνεται σε 3σθενή από την hephaestin/ceruloplasmin, πριν δεσμευθεί από την τρανσφερρίνη του πλάσματος (εικόνα 2). Η ferroportin 1 εκφράζεται στα ηπατοκύτταρα, στα δικτυοενδοθηλιακά μακροφάγα και στους συγκυτιοτροφοβλάστες του πλακούντα (όπου ρυθμίζει την είσοδο του σιδήρου στην εμβρυϊκή κυκλοφορία)⁶⁷.



Εικόνα 2. Μηχανισμοί εντερικής απορρόφησης αιμικού (heme) και μη-αιμικού (nonheme) σιδήρου. Για περιγραφή, βλέπε κείμενο. (Πηγή: αναφορά 180)

3.2.2. Κατανομή του σιδήρου

Ο σίδηρος που αποδεσμεύεται στην κυκλοφορία προσδένεται στην τρανσφερρίνη και μεταφέρεται στα σημεία χρήσης και αποθήκευσης. Υπό φυσιολογικές

συνθήκες, χρησιμοποιείται περίπου το 30-40% της σιδηρο-δεσμευτικής ικανότητας της τρανσφερρίνης, έτσι ο δεσμευμένος στην τρανσφερρίνη σίδηρος είναι περίπου 4 mg, όμως αυτή είναι η σημαντικότερη δυναμική αποθήκη σιδήρου⁶⁸. Ο δεσμευμένος στην τρανσφερρίνη σίδηρος εισέρχεται στα κύτταρα στόχους- κυρίως στα ερυθροκύτταρα αλλά επίσης και σε ανοσιακά και ηπατικά κύτταρα- διαμέσου μίας πολύ ειδικής διαδικασίας ενδοκυττάρωσης μέσω υποδοχέων. Καθώς η 2σθενής τρανσφερρίνη συνδέεται στον υποδοχέα τρανσφερρίνης 1 (TfR1) στην μεμβράνη από την πλευρά του πλάσματος, τμήματα της κυτταρικής μεμβράνης που περιέχουν το σύμπλοκο υποδοχέα-συνδέτη εγκοιλώνονται και σχηματίζουν ενδοσώματα (σιδηροσώματα)⁶⁸. Αυτά, οξειδώνονται μέσω μίας ATP-εξαρτώμενης προσθήκης πρωτονίων, μέσω μεσολάβησης πρωτεϊνών της οικογένειας STEAP (six transmembrane epithelial antigen of the prostate), οδηγώντας έτσι σε δομικές αλλαγές στην τρανσφερρίνη και τον TfR1 και στην αποδέσμευση του 3σθενούς σιδήρου από την τρανσφερρίνη. Ο 3σθενής σίδηρος ανάγεται σε 2σθενή από την αναγωγή και μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα μέσω του DMT1, ενώ ο TfR1 ανακυκλώνεται στην κυτταρική μεμβράνη και η τρανσφερρίνη επιστρέφει πίσω στην κυκλοφορία^{60,69}. Εντός του ερυθροβλάστη, ο μιτοχondριακός εισαγωγέας σιδήρου, mitoferrin, παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην προμήθεια της ferrochelatase με σίδηρο, για την εισαγωγή του στην πρωτοπορφυρίνη IX για το σχηματισμό αίμης (το τελικό στάδιο σύνθεσης αίμης στα μιτοχόνδρια)⁶⁹ (εικόνα 3). Υπάρχουν μερικές ενδείξεις ότι στα υπό ανάπτυξη κύτταρα της ερυθράς σειράς, ο σίδηρος μπορεί να μεταφερθεί κατευθείαν από τα σιδηροσώματα στα μιτοχόνδρια⁷⁰. Τελικά, οι εξαγωγείς αίμης, τη μεταφέρουν από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα και απομακρύνουν την περίσσεια αίμης από τα κύτταρα της ερυθράς σειράς.

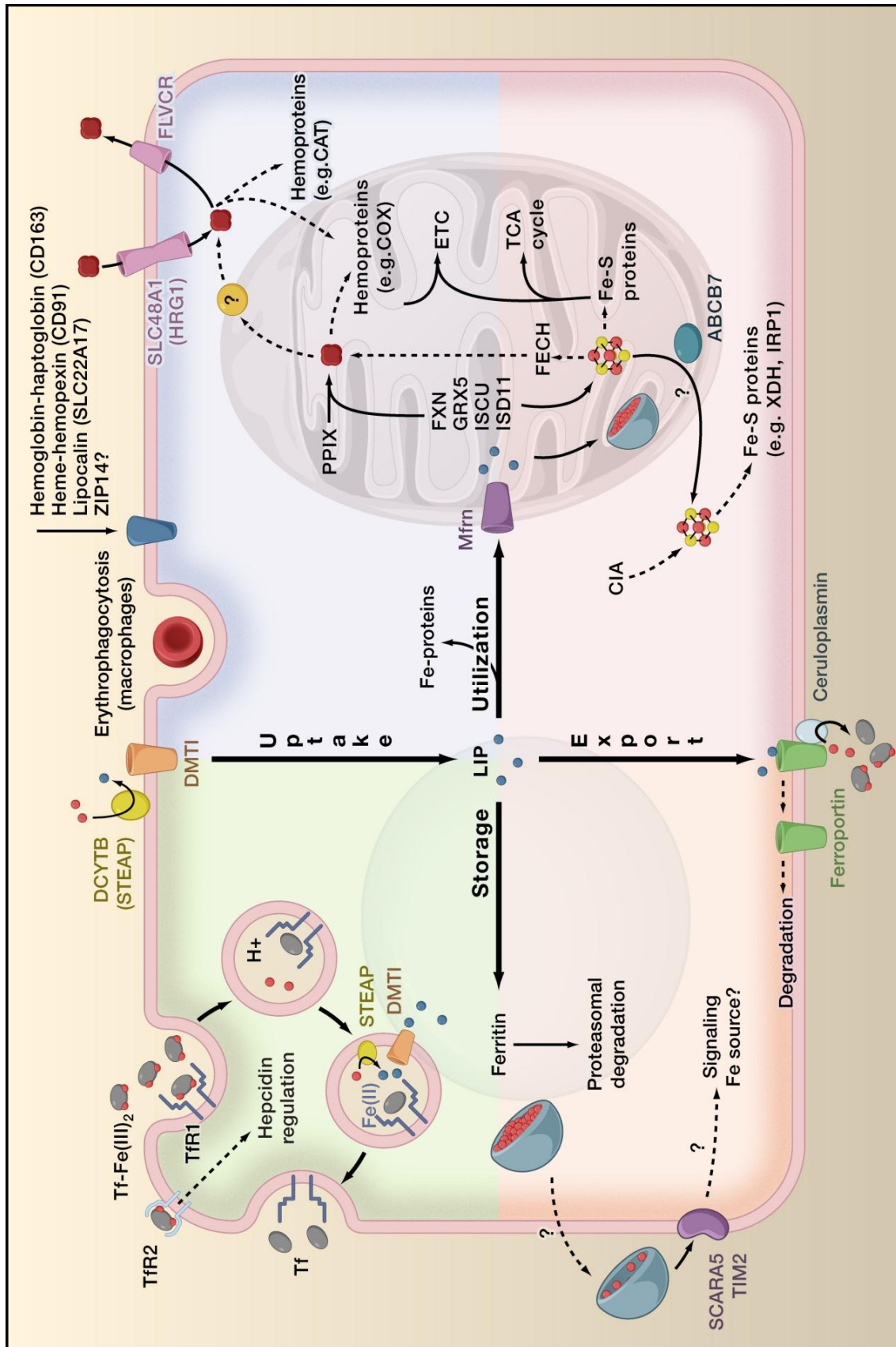
3.2.3. Αποθήκευση του σιδήρου

Ο σίδηρος της αιμοσφαιρίνης παρουσιάζει έναν σημαντικό ρυθμό ανακύκλωσης, καθώς τα γερασμένα ερυθροκύτταρα φαγοκυτταρώνονται από τα μακροφάγα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος (ΔΕΣ). Εντός των φαγοκυτταρικών σωματίων, η αίμη μεταβολίζεται από την οξυγενάση της αίμης και ο 2σθενής σίδηρος που αποδεσμεύεται εξωθείται προς το κυτταρόπλασμα μέσω της δράσης της NRAMP1 (natural resistance- associated macrophage protein-1), μίας πρωτεΐνης παρόμοιας στον DMT1 (εικόνα 3). Τα μακροφάγα μπορούν επίσης να αποσπάσουν σίδηρο από βακτήρια και αποπτωτικά κύτταρα, από το πλάσμα μέσω της δράσης του DMT1 και του TfR1, και από άλλες πηγές. Μέσα στο κύτταρο, ο σίδηρος μπορεί να αποθηκευθεί σε δύο μορφές: στο κυτταρόπλασμα ως φερριτίνη και, μετά την αποδόμηση της φερριτίνης, στα

λυσοσώματα ως αιμοσιδηρίνη. Η τελευταία αντιπροσωπεύει ένα πολύ μικρό κλάσμα των συνολικών αποθηκών σιδήρου του σώματος, κυρίως στα μακροφάγα, όμως αυξάνει δραματικά κατά την υπερφόρτωση με σίδηρο^{63,68}. Είναι αξιοσημείωτο, ότι η αποθήκευση σιδήρου στα μακροφάγα είναι ασφαλής, καθώς δεν οδηγεί σε οξειδωτικές βλάβες.

Η έξοδος του σιδήρου από τα μακροφάγα προς την τρανσφερρίνη διενεργείται κυρίως από τη ferroportin 1, την ίδια σιδηρο-εξαγωγό πρωτεΐνη που εκφράζεται στα εντεροκύτταρα του 12δακτύλου, και τη ceruloplasmin⁶⁰ (εικόνα 3). Το ποσό του σιδήρου που απαιτείται για την ημερήσια παραγωγή 300 δισεκατομμυρίων ερυθρών αιμοσφαιρίων (20-30 mg) παρέχεται κυρίως από την ανακύκλωση του σιδήρου των μακροφάγων⁶¹. Ως εκ τούτου, καθώς η ημερήσια απορρόφηση (1-2 mg) αντισταθμίζει τις ημερήσιες απώλειες, η εσωτερική ανακύκλωση του σιδήρου είναι καθοριστική για την ικανοποίηση των αναγκών του μυελού των οστών για ερυθροποίηση⁵⁹⁻⁶¹.

Το ήπαρ είναι το άλλο κύριο όργανο αποθήκευσης σιδήρου, και η παραγωγή ελευθέρων ριζών και προϊόντων υπεροξειδωσης των λιπιδίων σε καταστάσεις υπερσιδηρώσεως, μπορούν να οδηγήσουν σε προϊούσα ηπατική ιστική βλάβη και συνεπώς κίρρωση ή ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα⁷¹. Η πρόσληψη και μεταφορά από το πλάσμα, του συνδεδεμένου στην τρανσφερρίνη σιδήρου από το ήπαρ, λαμβάνει χώρα μέσω των υποδοχέων TfR1 & TfR2 (εικόνα 3), αν και μπορεί να δεσμεύσει και σίδηρο μη-συνδεδεμένο με τρανσφερρίνη (μέσω ενός μεταφορέα σταθερού με τον DMT1), από τη φερριτίνη, από συμπλέγματα αιμοσφαιρίνης- αιμοσφαιρίνης, και από συμπλέγματα αίμης- haemopexin. Ο σίδηρος αποθηκεύεται στα ηπατοκύτταρα κυρίως υπό μορφή φερριτίνης ή αιμοσιδηρίνης. Αντίθετα, και πάλι η ferroportin 1 φαίνεται να είναι η μόνη πρωτεΐνη που χειρίζεται την έξοδο του σιδήρου από τα ηπατοκύτταρα, ο οποίος κατόπιν οξειδώνεται από τη σερουλοπλασμίνη και προσδένεται στην τρανσφερρίνη^{60,61,63}.



Εικόνα 3.

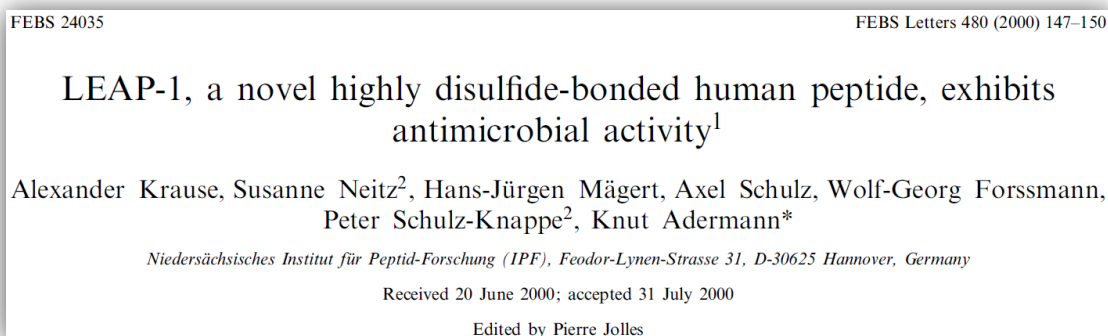
Η αποθήκευση του σιδήρου στα κύτταρα του μυοκαρδίου έχει επίσης εξαιρετικό ενδιαφέρον, καθώς η καρδιακή ανεπάρκεια είναι η κύρια αιτία θανάτου σε ασθενείς με μη θεραπευμένη κληρονομική αιμοχρωμάτωση ή με αιμοσιδήρωση λόγω μεταγγίσεων⁶⁰. Στα καρδιακά κύτταρα, η περίσσια σιδήρου μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες και μεταβολές στη λειτουργία του μυοκαρδίου, εξαιτίας καταστροφής του DNA από υπεροξείδιο του υδρογόνου, μέσω της αντίδρασης Fenton^{60,63}.

Εικόνα 3. (προηγούμενη σελίδα) Κυτταρική βιολογία του μεταβολισμού του σιδήρου σε ένα σωματικό κύτταρο. Για αναλυτική περιγραφή, βλέπε κείμενο. Επιπλέον, απεικονίζονται και άλλα μονοπάτια παροχής σιδήρου στο κύτταρο (π.χ. απόκτηση αιμικού σιδήρου των ερυθρών από τα μακροφάγα). LIP: labile iron pool (δεξαμενή ελεύθερου σιδήρου), Mfrn: mitoferrin. (Πηγή: αναφορά 57)

3.3. Το πεπτίδιο-ορμόνη Hcpcidin

3.3.1. Σύνθεση και καταβολισμός

Η ορμόνη hpcidin, ένα πεπτίδιο 25 αμινοξέων, είναι ο κύριος ρυθμιστής της απορρόφησης και κατανομής στους ιστούς, του σιδήρου. Συντίθεται κύρια στα ηπατοκύτταρα, όμως τα χαμηλά επίπεδα έκφρασής της και σε άλλα κύτταρα και ιστούς (μακροφάγα, λιποκύτταρα, εγκέφαλος) μπορεί να είναι σημαντικά για τον αυτοκρινή και παρακρινή έλεγχο της ροής σιδήρου, σε τοπικό επίπεδο^{72,73,74}. Η hpcidin απομονώθηκε για πρώτη φορά σε ανθρώπινο ορό και ούρα και μεταγενέστερες μελέτες σε μοντέλα ποντικών οδήγησαν στη δομή, λειτουργία και ρύθμισή της. Αρχικώς η hpcidin απομονώθηκε από υπερδιήθημα πλάσματος και ονομάστηκε liver-expressed antimicrobial peptide (LEAP-1)⁷⁵ (εικόνα 4). Αργότερα απομονώθηκε και σε ανθρώπινα ούρα και ονομάστηκε hepatic antimicrobial peptide (HAMP). Το όνομα hpcidin οφείλεται στην ηπατική της προέλευση και στις βακτηριοστατικές της ιδιότητες *in vitro*⁷⁶. Έχει βρεθεί ότι η hpcidin ρυθμίζεται από τη φλεγμονή, τα επίπεδα σιδήρου, την υποξία και την αναιμία^{77,78}.



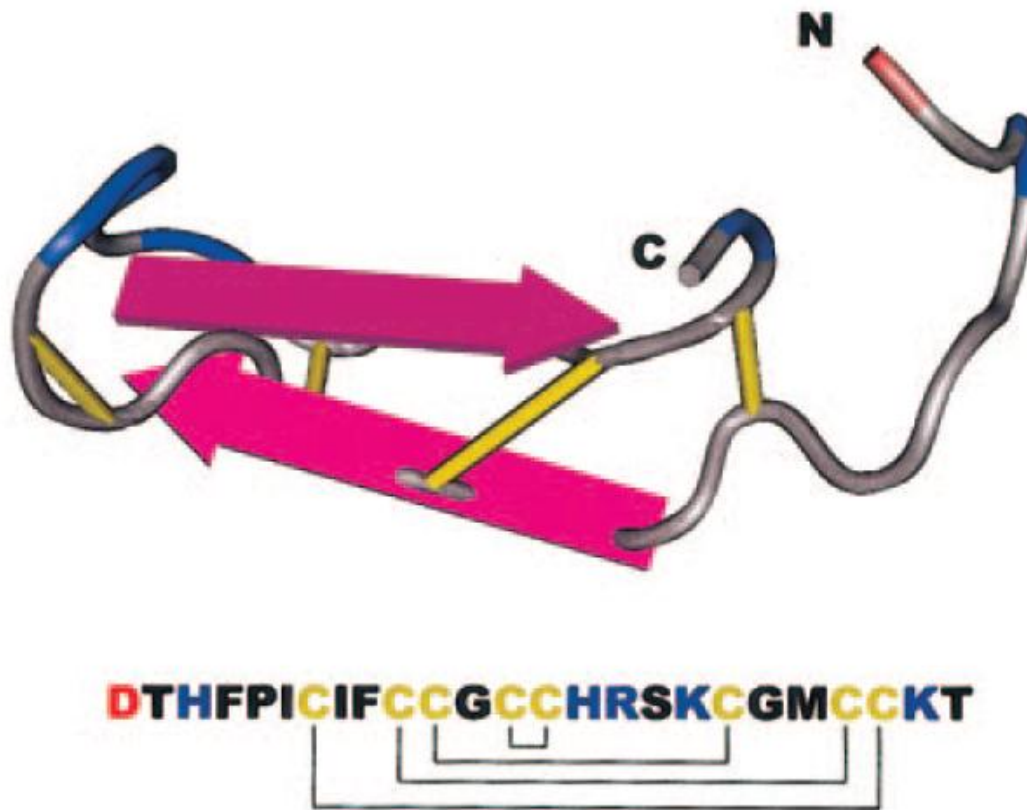
Εικόνα 4. Ο τίτλος του άρθρου όπου περιγράφεται για πρώτη φορά η ανακάλυψη της hpcidin. (Πηγή: αναφορά 75)

Η hpcidin κωδικοποιείται ως ένα προ-προπεπτίδιο 84 αμινοξέων, που περιέχει στο N άκρο του μία αλληλουχία 24 αμινοξέων, που στοχεύει στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η προορμόνη των 60 αμινοξέων περιέχει ένα μοτίβο ομοιόμορφης διάσχισης με το ένζυμο μετατροπής (convertase) furin, ενώ έχουν αναφερθεί διάφορα ανάλογα ένζυμα μετατροπής του προμορίου σε hpcidin *in vitro*, όπως PACE4, PC5/6 και PC7/LPC. Η διαδικασία μετατροπής λαμβάνει χώρα στο σύστημα Golgi, δε φαίνεται να ελέγχεται από κάπου, και μόνο το ώριμο πεπτίδιο, και όχι η prohpcidin, φαίνεται να εκκρίνεται από τα κύτταρα⁷⁹.

Η ώριμη ορμόνη κυκλοφορεί στο πλάσμα μάλλον προσδεμένη στη α2-μικροσφαιρίνη⁸⁰. Καθώς η αλληλεπίδραση αυτή είχε δειχθεί να προάγει την ενεργότητα της hepcidin *in vitro*, η επίδρασή της στην κάθαρση της hepcidin είναι ακόμη άγνωστη. Μία κύρια οδός κάθαρσης της hepcidin είναι η νεφρική απέκκριση. Υπό φυσιολογική νεφρική λειτουργία, οι συγκεντρώσεις hepcidin στα ούρα συσχετίζονται καλά με τα επίπεδα στην κυκλοφορία, με μη εμφανή ρύθμιση της διαδικασίας απέκκρισης. Ωστόσο, με βάση τη σύγκριση των συγκεντρώσεων αίματος και ούρων, φαίνεται ότι μόνο 5% της hepcidin πλάσματος που φιλτράρεται στους νεφρούς, καταλήγει άθικτη στα ούρα⁸¹, υποδηλώνοντας ότι πιθανώς η hepcidin να μην φιλτράρεται ελεύθερα στο σπείραμα ή/και ότι η hepcidin μετά το φιλτράρισμα επαναρροφάται και αποδομείται στα εγγύς σωληνάρια, παρόμοια με άλλες μικρές πεπτιδικές ορμόνες. Η hepcidin φαίνεται επίσης να υφίσταται κάθαρση με ενδοκυττάρωση μέσω υποδοχέων, σε ιστούς που εκφράζουν τον υποδοχέα της, ferroportin, όπως φαίνεται από τη συγκέντρωση ραδιοσημασμένης hepcidin σε ιστούς πλούσιους σε ferroportin⁸² και την αποδόμηση του συμπλέγματος ferroportin-hepcidin, που έχει ενδοκυτταρωθεί, σε κύτταρα καλλιέργειας. Ο βαθμός καταβολισμού μέσω νεφρικής κάθαρσης ή αποδόμησης σε ιστούς στόχους, δεν έχει ακόμη διευκρινισθεί⁷².

3.3.2. Δομή

Δομικά, η hepcidin μιμείται μία λυγισμένη φουρκέτα, που διατηρείται έτσι από 4 δισουλφιδικούς δεσμούς. Οι δεσμοί αυτοί αναθεωρήθηκαν πρόσφατα και το νέο μοντέλο υποδεικνύει ότι 2 δεσμοί σταθεροποιούν τις αντιπαράλληλες β-δομές, και 2 δημιουργούν την κυρτή δομή του πεπτιδίου⁷⁴ (εικόνα 5). Ένα ασυνήθιστο χαρακτηριστικό είναι η παρουσία μίας γέφυρας ανάμεσα σε δύο παρακείμενα μόρια κυστεΐνης, κοντά στην κορυφή της φουρκέτας, που πιθανώς να λειτουργούν ως σημαντικές περιοχές για την ενεργότητα του μορίου⁸³. Φαίνεται ότι η σύνδεση της hepcidin στον υποδοχέα της απαιτεί την εμπλοκή ενός από τους δισουλφιδικούς δεσμούς. Ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψη το ότι η αφαίρεση δεσμών ξεχωριστά δε μειώνει δραματικά την ενεργότητα της hepcidin *in vitro*, πιθανώς οι πολλαπλοί δισουλφιδικοί δεσμοί να είναι ικανοί να σχηματίζουν την επαφή με τη ferroportin⁷².

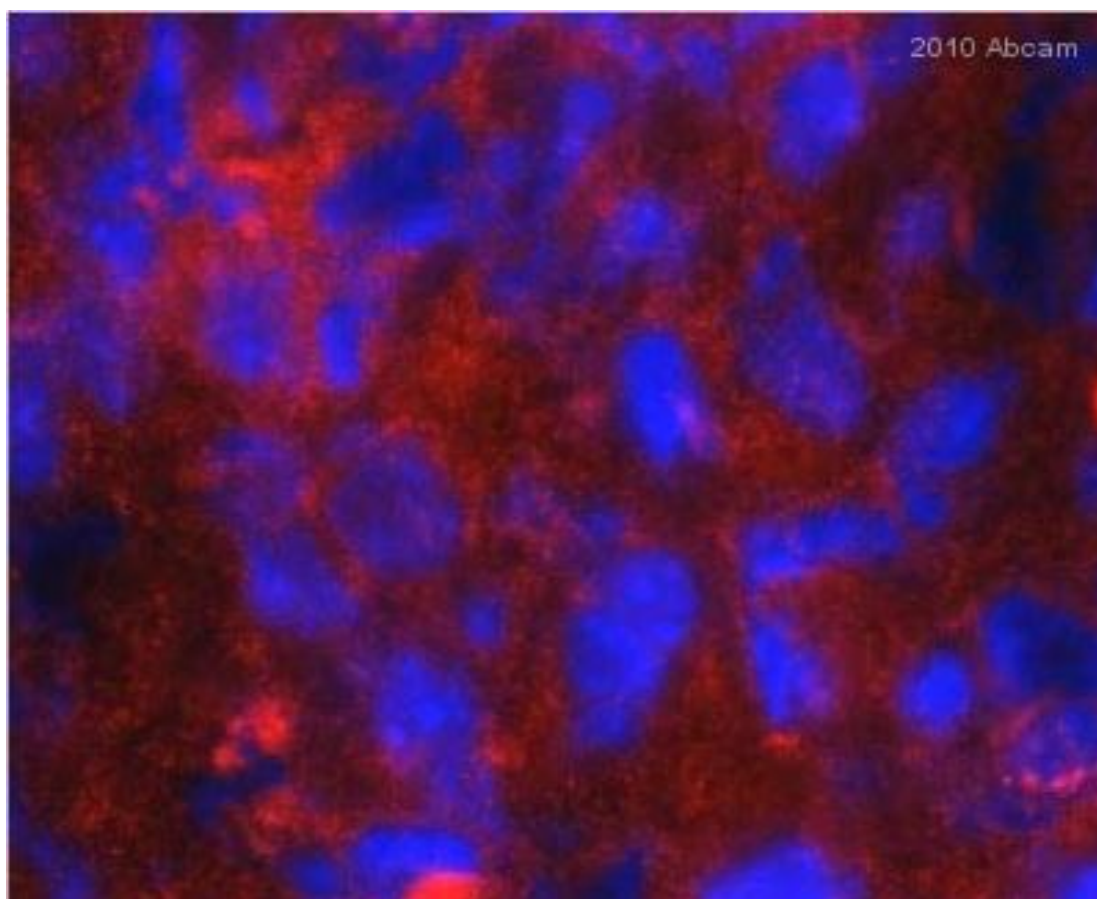


Εικόνα 5. Η ακολουθία αμινοξέων και το μοντέλο της κύριας μορφής της ανθρώπινης hepcidin. Οι δισουλφιδικοί δεσμοί απεικονίζονται με κίτρινο, τα βασικά αμινοξέα με μπλε και τα όξινα αμινοξέα με κόκκινο. Φαίνεται επίσης το μοτίβο των δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των 8 κυστεϊνών. (Πηγή: Ganz T, Blood. 2003;102:783-788)

Πέρα από τους δεσμούς αυτούς, δομικές μελέτες έχουν δείξει ότι το N-άκρο της hepcidin είναι σημαντικό για τη σιδηρο-ρυθμιστική της λειτουργία. Ένα ανθρώπινο πεπτίδιο 20 αμινοξέων, ελλιπές από το N-άκρο, είναι ανενεργό τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*, υποδηλώνοντας έτσι ότι αυτή η περιοχή πιθανώς περιέχει σημεία επαφής για την αλληλεπίδραση της hepcidin με τον υποδοχέα της. Αυτή η δομή της hepcidin και οι πολλαπλοί δισουλφιδικοί δεσμοί είναι κοινά χαρακτηριστικά των πεπτιδίων με αντιμικροβιακές και αντιμυκητιασικές ιδιότητες. Ωστόσο, η hepcidin δείχνει μικρές αντιμικροβιακές ιδιότητες *in vitro*, σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις (10-30 μM), ενώ η σπουδαιότητα των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων της *in vivo* μένει να διευκρινισθεί⁷².

3.3.3. Γενετική

Η ανθρώπινη hepcidin κωδικοποιείται από ένα mRNA μεγέθους 0.4kb, που δημιουργείται από 3 εξόνια ενός γονιδίου 2.5kb στο χρωμόσωμα 19q13.1. Στους ανθρώπους, το γονίδιο που κωδικοποιεί τη hepcidin είναι το HAMP. Το γεγονός της εμφάνισης σημαντικής υπερφόρτωσης με σίδηρο σε ποντίκια που είχαν έλλειψη του γονιδίου ήταν η αρχή της ανακάλυψης της εμπλοκής της hepcidin στο μεταβολισμό του σιδήρου⁸⁴. Ζωικά μοντέλα υπερφόρτωσης σιδήρου περιλαμβάνουν ποντίκια ελλειμματικά ως προς τον παράγοντα Upstream factor 2 (Usf2), που δεν εκφράζουν τη hepcidin⁸⁴. Αντίθετα, ιδιοσυστασιακή υπερέκφραση της hepcidin σε HAMP τρανσ-γονιδιακά ποντίκια οδηγεί σε ΣΠΑ⁸⁵. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν το ρόλο κλειδί της hepcidin στη ρύθμιση της απορρόφησης σιδήρου στα θηλαστικά και καθιστούν το HAMP λειτουργικό υποψήφιο για συσχέτιση με τη νεανική κληρονομική αιμοχρωμάτωση, που δε συνδέεται με το 1q⁷².

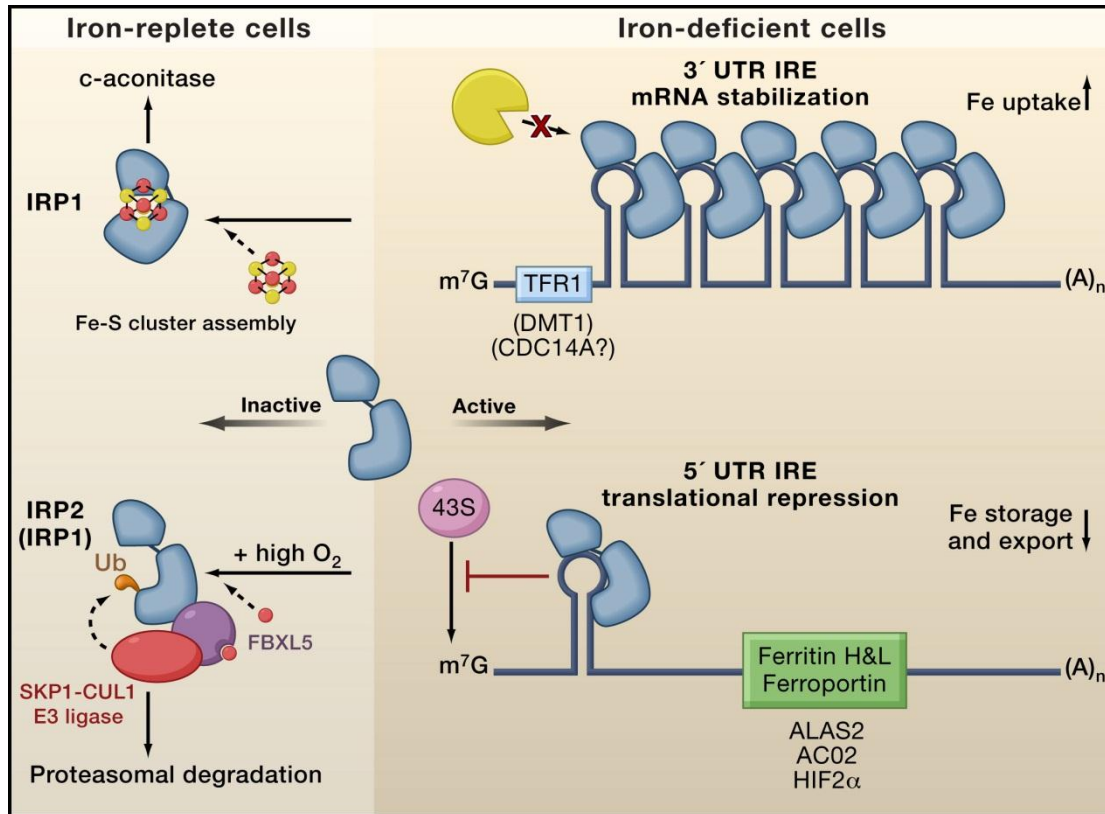


Ανοσοϊστοχημική έκφραση της hepcidin-25 (μπλε χρώμα) σε ηπατικό ιστό ποντικίου (Πηγή: www.abcam.com)

3.4. Ρύθμιση της ομοιόστασης του σιδήρου και ο ρόλος της hepcidin

Η απορρόφηση του σιδήρου από τα εντεροκύτταρα του 12δακτύλου εξαρτάται από τις αποθήκες σιδήρου του οργανισμού, την υποξία, τη φλεγμονή και το ρυθμό ερυθροποίησης. Έχουν προταθεί δύο ρυθμιστικά μοντέλα, καθένα εκ των οποίων μπορεί να συμβάλει στη ρύθμιση της απορρόφησης του σιδήρου: το μοντέλο του προγραμματισμού των κρυπών (crypt programming model) και το μοντέλο της hepcidin (hepcidin model). Το μοντέλο προγραμματισμού των κρυπών υποστηρίζει ότι τα εντεροκύτταρα των κρυπών του 12δακτύλου προσλαμβάνουν σίδηρο από το πλάσμα, μέσω των TfR1 και TfR2. Η ενδοκυττάρια συγκέντρωση σιδήρου ελέγχει την αλληλεπίδραση των κυτταροπλασματικών ρυθμιστικών του σιδήρου πρωτεϊνών (iron regulatory proteins, IRPs) 1 και 2 με τα αντιδρώντα στο σίδηρο στοιχεία (iron-responsive elements, IREs) (εικόνα 6). Σε ένδεια σιδήρου, η IRP1 συνδέεται στο IREs του mRNA του TfR1, DMT1 και ferroportin 1, η μεταγραφή σταθεροποιείται, εξελίσσεται η μετάφραση και έτσι συντίθενται οι πρωτεΐνες. Με αυτό τον τρόπο, μία υψηλή δεσμευτική δραστηριότητα των IRPs αντανakλά χαμηλές αποθήκες σιδήρου και καταλήγει στην αυξημένη επαγωγή αυτών των πρωτεϊνών στο 12δάκτυλο, αυξάνοντας έτσι την απορρόφηση του σιδήρου των τροφών. Όταν οι IRPs συνδέονται στα IREs του mRNA της φερριτίνης, η μετάφραση του μετάγραφου (transcript) μπλοκάρεται και η σύνθεση διακόπτεται (εικόνα 6). Έτσι, οι συγκεντρώσεις της φερριτίνης ρυθμίζονται αμοιβαία, καθώς αυξάνονται σε καταστάσεις περίσσειας σιδήρου και μειώνονται σε καταστάσεις ένδειας σιδήρου^{60,63}.

Το μοντέλο της hepcidin προτείνει ότι η hepcidin παράγεται κυρίως στα ηπατοκύτταρα, ως απάντηση στο ποσό σιδήρου στο αίμα. Ακολούθως, η hepcidin εισέρχεται στην κυκλοφορία και αλληλεπιδρά με τα εντεροκύτταρα των θηλών ώστε να καθορίσει το ρυθμό απορρόφησης του σιδήρου, μέσω του ελέγχου της έκφρασης της ferroportin 1 στην πλευρά της βασικής μεμβράνης τους. Η σύνδεση της hepcidin στη ferroportin 1 αρχικά προκαλεί φωσφορυλίωση (διαμέσου μίας Janus κινάσης) μίας τυροσίνης του κυτταροπλασματικού βρόχου της πρωτεΐνης- μεταφορέα, ακολούθως η φωσφορυλιωμένη ferroportin 1 εισέρχεται στο εσωτερικό, αποφωσφορυλιώνεται και τελικώς αποδομείται στο διαμέρισμα του ενδοσώματος/λυσosώματος. Τα μόρια της ferroportin 1 που βρίσκονται στα μακροφάγα και το ήπαρ είναι επίσης στόχοι της hepcidin⁸⁶.



Εικόνα 6. Ρύθμιση του κυτταρικού μεταβολισμού του σιδήρου. Σε σιδηροπενικά κύτταρα (δεξιά), η IRP1 ή η IRP2 συνδέεται στα IREs, που βρίσκονται στις UTRs (untranslated regions) των mRNA που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη μεταφορά και αποθήκευση του σιδήρου. Η σύνδεση των IRPs σε μονήρη IREs στις 5' UTRs των mRNAs στόχων, αναστέλλει τη μετάφρασή τους, ενώ η αλληλεπίδραση της IRP με πολλαπλά 3' UTR IREs στο μετάγραφο TfR1, αυξάνει τη σταθερότητά του. Κατά συνέπεια, η μέσω TfR1 πρόσληψη σιδήρου αυξάνει ενώ η αποθήκευση σιδήρου στη φερριτίνη και η έξοδος του μέσω της ferroportin μειώνεται, αυξάνοντας έτσι τη δεξαμενή του ελεύθερου σιδήρου. Σε κύτταρα πλήρη σιδήρου (αριστερά), η σιδηροευσαίσθητη πρωτεΐνη FBXL5 αντιδρά με τις IRP1 & 2 και ενεργοποιεί το σύμπλεγμα SKP1-CUL1 E3 ligase που προάγει την αποδόμηση των IRP από τα πρωτεοσώματα. Η IRP1 υπόκειται σε ρύθμιση μέσω του συμπλόκου Fe/S που πυροδοτεί μία μετατροπή στη διαμόρφωση, που μπλοκάρει τη σύνδεση στο IRE και παρέχει δραστηριότητα ακονιτάσης στην ολοπρωτεΐνη. (Πηγή: αναφορά 57)

Υπό φυσιολογικές συγκεντρώσεις σιδήρου, η ικανότητα αίσθησης των ηπατοκυττάρων φαίνεται να εμπλέκει την τοπική παραγωγή (επαγόμενη από το σίδηρο) των πρωτεϊνών BMPs (bone morphogenic proteins), όπως η BMP6. Η BMP6 συνδέεται

στους υποδοχείς επιφανείας BMPRs I & II (BMP receptors) του ηπατοκυττάρου, μαζί με τον BMP συνυποδοχέα, hemojuvelin (HJV), δημιουργώντας ένα σήμα που μεταδίδεται ενδοκυττάρια με τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών Smad (small mothers against decapentaplegic). Οι φωσφορυλιωμένες Smad1, Smad5 και Smad8 σχηματίζουν ένα σύμπλοκο με τον κοινό μεσολαβητή Smad4, πριν μεταβούν στον πυρήνα και ενεργοποιήσουν την έκφραση της hepcidin^{87,88} (εικόνα 7A). Η διαλυτή μορφή της HJV (sHJV), της οποίας η απελευθέρωση αναστέλλεται από τις αυξημένες εξωκυττάρια συγκεντρώσεις σιδήρου, θεωρείται ότι ανταγωνίζεται για τη σύνδεση με τους υποδοχείς BMPR με το προσδεμένο στη μεμβράνη ομόλογό της μόριο, παρέχοντας έτσι μία ευαίσθητη στο σίδηρο ρύθμιση της έκφρασης της hepcidin⁸⁹. Ο σίδηρος μπορεί επίσης να επάγει την έκφραση και άλλων μεσολαβητών και ρυθμιστικών μορίων, όπως τα Smad6 & Smad7, που φαίνεται να εξασθενούν το σήμα για την ενεργοποίηση της hepcidin (εικόνα 7A).

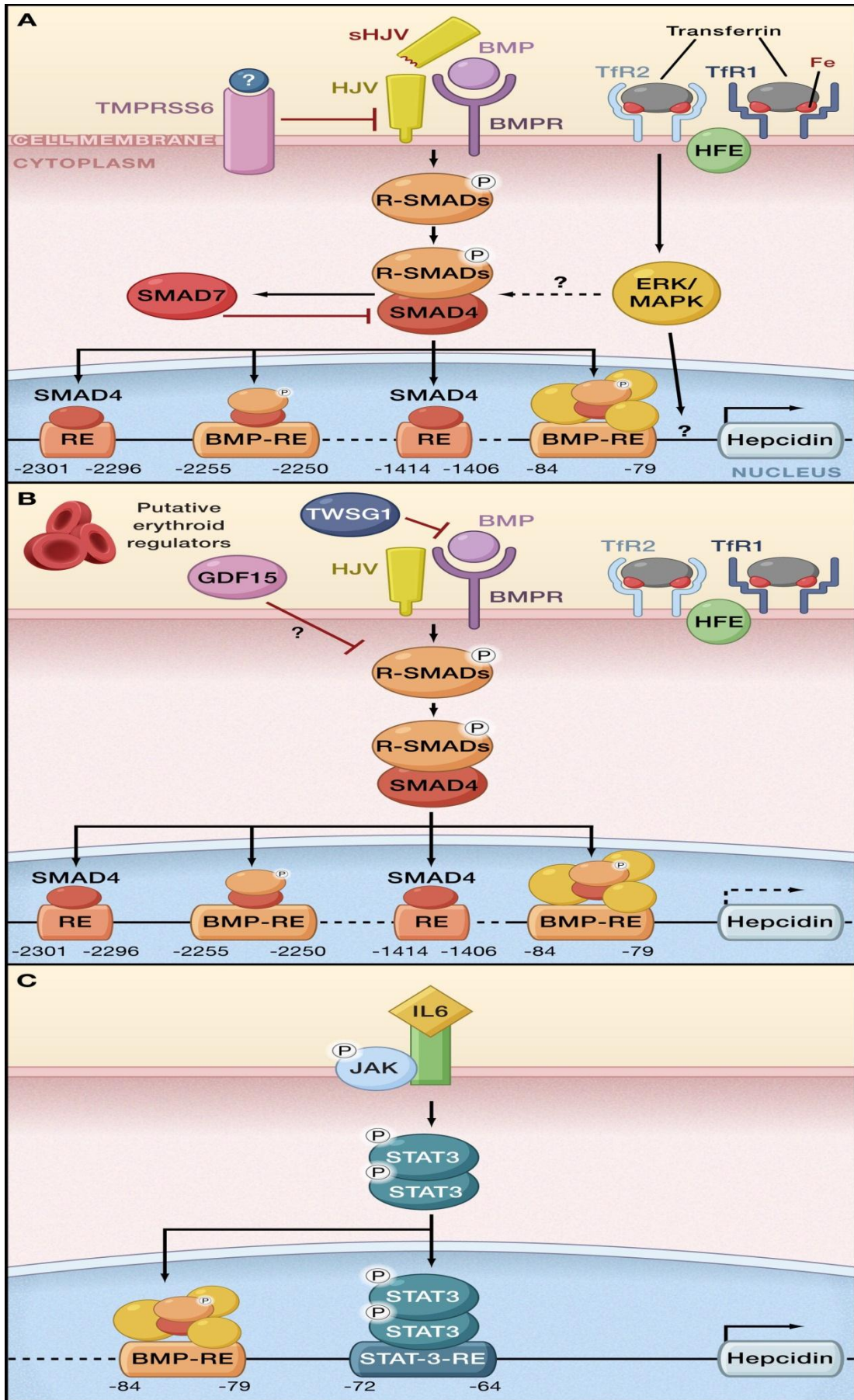
Τα ρυθμιστικά σηματοδοτικά μονοπάτια της hepcidin μπορούν επίσης να ρυθμιστούν από την HFE. Το προϊόν του γονιδίου HFE (μαζί με τη β2-μικροσφαιρίνη) σχετίζεται με τους TfR1 & TfR2, αλλά είναι πιο πιθανό ότι είναι το σύμπλοκο HFE-TfR2 που αισθάνεται τον κορεσμό τρανσφερίνης και ρυθμίζει τη μεταγραφή της hepcidin⁹⁰. Σε αυτό το μοντέλο, η τρανσφερίνη με το 2σθενή σίδηρο και η HFE συναγωνίζονται για τη σύνδεση στον TfR1. Σε υψηλές συγκεντρώσεις 2σθενούς τρανσφερίνης, η HFE φαίνεται να αποδεσμεύεται από τον TfR1 και να σχηματίζει ένα μέρος ενός συμπλέγματος ευαίσθητου στο σίδηρο, μέσω της αλληλεπίδρασής της με τον TfR2^{90,91}. Η αλληλεπίδραση των τρανσφερίνη-HFE με τον TfR2 πιθανώς μεταδίδει την υψηλή συγκέντρωση σιδήρου στο αίμα σε έναν αισθητήρα σιδήρου και σε ένα σύμπλοκο μετάδοσης του σήματος, ίσως το σύμπλοκο BMP-HJV ή κάποιο άλλο ξεχωριστό σύστημα⁹². Έτσι, η πρόσδεση της δισθενούς τρανσφερίνης στον TfR2 αναστέλλει την κάθαρση της HJV από τη furin, αναστέλλοντας έτσι την απελευθέρωση διαλυτής HJV, με αποτέλεσμα την αυξημένη ανταπόκριση (μέσω HJV) της κυτταρικής επιφάνειας στις BMPs και έτσι σε αυξημένη συγκέντρωση hepcidin⁹³ (εικόνα 7A). Δεδομένα από ηπατικό ιστό αρρένων ασθενών με ομοζυγωτικές HFE μεταλλάξεις και σημαντική υπερφόρτωση με σίδηρο δείχνουν αναμενόμενη επαγωγή της BMP6, αλλά μειωμένη φωσφορυλίωση των Smad1/5/8, σε σχέση με το ύψος του σιδήρου των ηπατοκυττάρων, και αποτυχία της ενισχυμένης έκφρασης της hepcidin. Επιπλέον, σε αυτούς τους ασθενείς παρατηρήθηκε ενισχυμένη έκφραση των Smad6/7, προτάσσοντας έτσι τα μόρια αυτά ως πιθανούς επιδεινωτές της παθογένεσης της νόσου⁹⁴.

Υπάρχει επίσης ένας αριθμός παραγόντων που μπορούν να καταστείλουν την έκφραση της hepcidin στο ήπαρ. Η matriptase-2, μία διαμεμβρανική πρωτεάση σερίνης, που κωδικοποιείται από το γονίδιο TMPRSS6, εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ και παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ομοίωση του σιδήρου. Η matriptase-2 αλληλεπιδρά με την HJV και αναστέλλει τη σύνθεση της hepcidin με το να διασπά τη μεμβρανική HJV σε τμήματα, που προφανώς δεν είναι λειτουργικά⁹⁵ (εικόνα 7A). Ομοζυγωτικές ή συζευγμένες ετεροζυγωτικές μεταλλαγές στο γονίδιο TMPRSS6 οδηγούν σε υπερέκφραση της hepcidin και συνδέονται με οικογενή ΣΠΑ, ανθεκτική στον από του στόματος σίδηρο^{96,97}.

Είναι γνωστό ότι η αυξημένη ερυθροποίηση αυξάνει την απορρόφηση του σιδήρου ανεξάρτητα από τον συνολικό σίδηρο του σώματος, και σε αυτή τη διεργασία φαίνεται να μεσολαβούν η ερυθροποιητίνη (EPO), ο growth differentiation factor 15 (GDF 15) και ο twisted gastrulation (TWSTG1)⁶⁷. Η καταστολή της έκφρασης της hepcidin από την EPO γίνεται μέσω της αναστολής α) της φωσφορυλίωσης του Stat3 (signal transducer and activator of transcription 3) που επάγεται από λιποπολυσακχαρίτες, και β) της φωσφορυλίωσης των Smad1/5/8, που επάγεται από το σίδηρο⁹⁸. Μία πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι χορήγηση EPO σε ανθρώπους προκαλεί εκσεσημασμένη και παρατεινόμενη ελάττωση της κυκλοφορούσας hepcidin⁹⁹. Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι η EPO ενισχύει την έκφραση των γονιδίων DMT1 και hephaestin στο 12δάκτυλο¹⁰⁰.

Οι GDF15 και TWSTG1 είναι μέλη της υπεροικογένειας του TGF-β και επάγονται υπό συνθήκες ερυθροποίησης υπό ένδεια σιδήρου. Ο GDF15 εκκρίνεται από τους εμπλουτισμένους με αιμοσφαιρίνη ερυθροβλάστες κατά τα τελικά στάδια της ερυθροποίησης, που έχει δειχθεί ότι καταστέλλει την έκφραση της hepcidin *in vitro*¹⁰¹, ενώ ο TWSTG1, που παράγεται κυρίως από τις πρώιμες προγονικές βαθμίδες της ερυθράς σειράς κατά τα πρώτα στάδια της ερυθροποίησης, καταστέλλει την ενίσχυση της έκφρασης της hepcidin, που επάγεται από τους BMPs¹⁰² (εικόνα 7B).

Οι παράγοντες που επάγονται από την υποξία (hypoxia-inducible factors, HIFs) είναι μεταγραφικοί παράγοντες με πολλές υπομονάδες που ελέγχονται από την

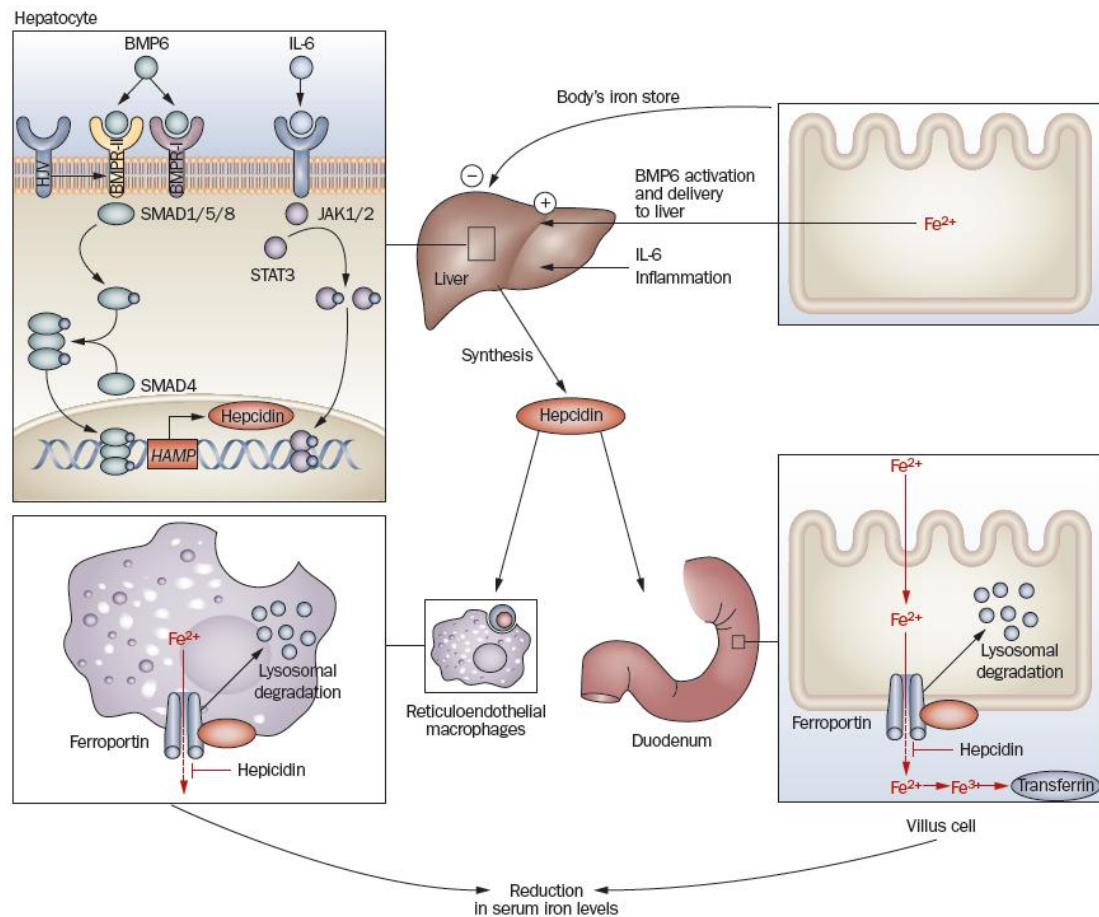


Εικόνα 7. (προηγούμενη σελίδα) Ρύθμιση της έκφρασης της hepcidin. (A) ρύθμιση της hepcidin από τη συστηματική διαθεσιμότητα σιδήρου. Για αναλυτική περιγραφή, βλέπε κείμενο. (B) ρύθμιση της hepcidin από ερυθροποιητικά σήματα. Για αναλυτική περιγραφή, βλέπε κείμενο. (C) ρύθμιση της hepcidin από φλεγμονώδη ερεθίσματα. Για περιγραφή, βλέπε παράγραφο 3.7. (Πηγή: αναφορά 57)

υδροξυλίωση μίας ασταθούς α υπομονάδας, η οποία (υδροξυλίωση) ελέγχει την αποδόμησή της. Αυτή η τροποποίηση περιλαμβάνει προπυλ-υδροξυλάσες που απαιτούν τόσο οξυγόνο όσο και σίδηρο. Έτσι, υπό συνθήκες υποξίας ή ένδειας σιδήρου, η δραστηριότητα της προπυλ-υδροξυλάσης εμποδίζεται, οδηγώντας στη συσσώρευση και μετανάστευση του HIF μέσα στον πυρήνα. Η πρόσδεση του HIF στον προαγωγέα (promoter) της hepcidin οδηγεί στη καταστολή της έκφρασης της hepcidin στα ηπατοκύτταρα, ενώ η πρόσδεσή του στον προαγωγέα του DMT1 αυξάνει την έκφραση του DMT1 στα εντεροκύτταρα^{103,104}.

Εν περιλήψει, υποτίθεται ότι, όταν οι συγκεντρώσεις της hepcidin αυξάνονται στην υπερφόρτωση με σίδηρο, η απελευθέρωση σιδήρου από τα κύτταρα των εντερικών κρυπτών (αλλά και από το ήπαρ και τα μακροφάγα) μειώνεται. Οι συγκεντρώσεις της hepcidin αυξάνονται επίσης κατά τη φλεγμονή, ανεξάρτητα από το προφίλ σιδήρου του ασθενούς. Αντίθετα, όταν οι συγκεντρώσεις της hepcidin μειώνονται, όπως στη ΣΠΑ ή την υποξία, φαίνεται ότι η έκφραση της ferroportin 1 αλλά και η απελευθέρωση σιδήρου από τα εντερικά κύτταρα, τα ηπατοκύτταρα και τα κύτταρα του ΔΕΣ αυξάνεται⁶⁷ (εικόνα 8). Γενετικές ανωμαλίες στις HFE, HJV, hepcidin και TfR2 οδηγούν σε δυσανάλογα χαμηλές συγκεντρώσεις hepcidin και υπερφόρτωση με σίδηρο (αιμοχρωμάτωση τύπου I, IIa, IIb και III, αντίστοιχα). Αντίθετα, μεταλλάξεις στο γονίδιο της ferroportin 1 ευθύνονται για την αιμοχρωμάτωση τύπου IV⁶³.

Στα προγονικά ερυθροποιητικά κύτταρα, η έκφραση των TfR1, DMT1 και φερριτίνης ρυθμίζεται αμοιβαία μέσω των IRP1 & IRP2, που δρουν πάνω στα IREs που βρίσκονται στο RNA τους. Έτσι, όταν διεγείρεται η ερυθροποίηση και απαιτείται αυξημένη προμήθεια σε σίδηρο, η έκφραση των TfR1 και DMT1 αυξάνεται, ενώ η σύνθεση της φερριτίνης αναστέλλεται⁶⁰. Τα ερυθροποιητικά κύτταρα περιέχουν επίσης μία ισομορφή, την DMT1(-)IRE, που ρυθμίζεται από το miR-Let-7d, ένα



Εικόνα 8. Συνοπτική σχηματική αναπαράσταση του ρόλου της hepcidin στη ρύθμιση της εντερικής απορρόφησης σιδήρου. Τα μονοπάτια περιγράφονται αναλυτικά στο κείμενο. (Πηγή: αναφορά 180)

μέλος της νέας ομάδας των μικρών μη-κωδικοποιών RNA μονής αλύσου περίπου 22 νουκλεοτιδίων, των λεγόμενων microRNAs. Το miR-Let-7d επιδρά στην έκφραση του DMT1(-)IRE με αντίστροφο τρόπο. Όταν η συγκέντρωση του mRNA αυξάνεται, η έκφραση του DMT1(-)IRE αναστέλλεται, και αντίστροφα. Σε σχέση με τη μορφή DMT1(+IRE), η έκφραση της μορφής DMT1(-)IRE αυξάνεται σημαντικά περισσότερο στα τελικά στάδια της διαφοροποίησης των ερυθρών¹⁰⁵. Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι η EPO ενεργοποιεί τον IRP1, οδηγώντας σε ενίσχυση της έκφρασης του TfR1 στις προγονικές ερυθροποιητικές βαθμίδες, η οποία συντηρείται καθ' όλη τη διαδικασία διαφοροποίησης¹⁰⁰. Μέχρι τώρα, έχουν αναφερθεί διάφορα περιστατικά με μεταλλάξεις του DMT1 που προκαλούν υπόχρωμη, μικροκυτταρική αναιμία, λόγω μειωμένης χρήσης του σιδήρου από τα ερυθροποιητικά κύτταρα, που όμως οδηγούν σε αυξημένες ηπατικές αποθήκες σιδήρου¹⁰⁶.

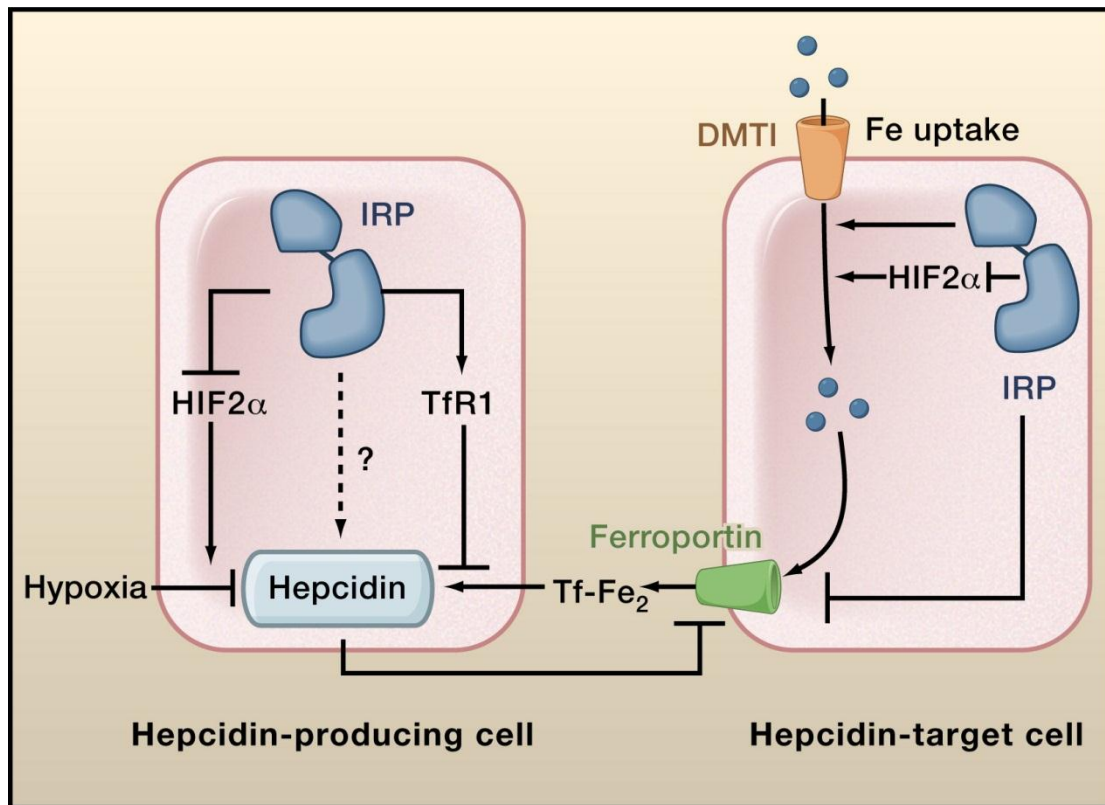
Όπως προαναφέρθηκε, τα γηραιά ερυθροκύτταρα αποδομούνται από πρωτεολυτικούς μηχανισμούς των φαγολυσοσωμάτων των μακροφάγων. Η αίμη μπαίνει στο κυτταρόπλασμα, όπου μπορεί να δράσει ως μόριο-αισθητήρας που ελέγχει τη μεταγραφή διαφόρων γονιδίων, ή να αποδομηθεί από την οξυγενάση της αίμης 1 και να αποδώσει το σίδηρό της. Ο σίδηρος αυτός θα αποθηκευθεί ακολούθως σε μόρια φερριτίνης για περαιτέρω χρήση ή θα εξαχθεί πίσω στο πλάσμα από τη ferroportin 1. Στα μακροφάγα, όπως και στα εντεροκύτταρα του 12δακτύλου, η ferroportin 1 βρίσκεται κυρίως στη βασική μεμβράνη, αλλά επίσης και σε ενδοκυττάρια σωμάτια μετά από διέγερση της σύνθεσής της από τον ενδοκυττάριο σίδηρο⁶³.

Μία προηγούμενη μελέτη που διεξήχθη σε πρωτογενείς καλλιέργειες μακροφάγων από μυελό των οστών είχε δείξει ότι η φαγοκυττάρωση των ερυθρών επάγει την έκφραση του mRNA της ferroportin1, της οξυγενάσης της αίμης 1 και της φερριτίνης, μέσω ενός μονοπατιού με τη μεσολάβηση της αίμης, ενώ ακολουθείται από τη διέγερση της μετάφρασης του mRNA της ferroportin και της φερριτίνης, από ένα εξαρτώμενο από το σίδηρο μηχανισμό¹⁰⁷. Προσφάτως, οι Marro και συν.¹⁰⁸ έδειξαν ότι η ferroportin 1 μαζί με την οξυγενάση της αίμης 1, συνελέγχονται μεταγραφικά από την αίμη. Ο δακτύλιος πρωτοπορφυρίνης της αίμης είναι αρκετός για να αυξήσει τη μεταγραφική δραστηριότητα του γονιδίου της ferroportin 1, ενώ ο σίδηρος που αποδεσμεύεται από το ήμισυ της αίμης ελέγχει τη μετάφραση της ferroportin 1, εμπλέκοντας το IRE στην 5' αμετάφραστη περιοχή. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι η αίμη ελέγχει την ανακύκλωση του σιδήρου των μακροφάγων, ώστε να διασφαλίσει τη συγχρονισμένη αποδόμησή της από την οξυγενάση της αίμης 1, την αποθήκευση και εξάλειψη της τοξικότητας του σιδήρου από τη φερριτίνη και την έξοδο του σιδήρου από τη ferroportin.

Ωστόσο, οι μηχανισμοί ελέγχου της κατανομής του σιδήρου μεταξύ του διαμερίσματος «αποθήκευσης» και του διαμερίσματος «εξαγωγής» δεν έχουν πλήρως διευκρινισθεί. Έχει προταθεί ότι το καθαρό ποσό της ferroportin 1 που βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη, το οποίο προσαρμόζεται στις ανάγκες των ερυθρών σε σίδηρο μέσω συστηματικής σηματοδότησης, προάγει την κινητοποίηση του σιδήρου από τις σχετιζόμενες με τη φερριτίνη αποθήκες¹⁰⁹. Με αυτό υπόψη, έχει δειχθεί ότι η EPO μειώνει την κατακράτηση σιδήρου στα μακροφάγα μέσω μείωσης της έκφρασης της hepcidin και του DMT1 και αύξησης της έκφρασης της ferroportin 1^{99,110}.

Από την άλλη πλευρά, πέρα από αυτές τις εγγενείς ρυθμίσεις, η ποσότητα της ferroportin 1 στη βασική μεμβράνη, ελέγχεται αυστηρά από ένα συστηματικό μηχανισμό που βασίζεται στην αλληλεπίδραση ferroportin 1-hepcidin (εικόνα 9). Όπως και στα 12δακτυλικά εντεροκύτταρα, η σύνδεση της hepcidin στη ferroportin 1 στη μεμβράνη των μακροφάγων, προκαλεί την ενσωμάτωση και αποδόμησή της, μέσω ενός μονοπατιού με τη μεσολάβηση μίας Janus kinase 2. Επιπροσθέτως, έχει περιγραφεί τελευταία ένα άλλο ανεξάρτητο μονοπάτι, με τη μεσολάβηση τμημάτων λιπιδίων, για την ενσωμάτωση και αποδόμηση της ferroportin, ως μία νέα διαδρομή για τη, μέσω hepcidin, ρύθμιση της ferroportin 1 στα μακροφάγα¹¹¹. Ωστόσο, έχει περιγραφεί ότι τα μακροφάγα αντιδρούν με μεγαλύτερη ακρίβεια σε μία πρόκληση από τη hepcidin, συγκριτικά με τα εντεροκύτταρα, και αυτή η παρατήρηση φαίνεται να είναι σε πλήρη εναρμόνιση με τον κεντρικό ρόλο των μακροφάγων στη διατήρηση της ομοιόστασης του σιδήρου στο σώμα¹¹².

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το ήπαρ είναι ένα άλλο κύριο όργανο αποθήκευσης σιδήρου. Σε υπερφόρτωση με σίδηρο, καταστέλλεται ο TfR1 στα ηπατοκύτταρα⁶⁴. Ο TfR2, που εκφράζεται ισχυρά στο ανθρώπινο ήπαρ, δεν έχει IRE και έτσι δεν ρυθμίζεται αμοιβαία, ως απάντηση στη συγκέντρωση σιδήρου στο πλάσμα. Αντίθετα, η έκφραση της πρωτεΐνης TfR2 ελέγχεται από τον κορεσμό τρανσφερρίνης και προάγεται κατά την υπερφόρτωση με σίδηρο. Σε καταστάσεις φυσιολογικού και περίσσειας σιδήρου, η έκφραση του TfR2 υπερτερεί αυτής του TfR1, υποδηλώνοντας ότι ο TfR2 παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην υπερφόρτωση του ήπατος με σίδηρο, στην αιμοχρωμάτωση^{59,63}.



Εικόνα 9. Αλληλεπίδραση μεταξύ συστηματικών και κυτταρικών σιδηρο-ρυθμιστικών συστημάτων. Αριστερά: σε κύτταρα που παράγουν hepcidin (π.χ. ηπατοκύτταρα), οι IRPs μπορούν να επηρεάσουν τη ρύθμιση του γονιδίου Hepcidin μεταβάλλοντας τα επίπεδα του TfR1 ή/και του HIF2α. Το σύστημα IRP/IRE έχει επίσης επίδραση στην έκφραση του γονιδίου Hepcidin, μεταβάλλοντας τα επίπεδα ενδοκυττάριου σιδήρου (διακεκομμένη γραμμή). Δεξιά: η έκφραση της ferroportin ρυθμίζεται τόσο από τη hepcidin, όσο και από τις IRPs. Επιπλέον, οι IRPs μπορούν να εκδηλώσουν μία απευθείας θετική δράση στην πρόσληψη σιδήρου μέσω του DMT1 ή του TfR1, ή μία έμμεση αρνητική δράση μέσω της καταστολής του HIF2α. (Πηγή: αναφορά 57)

3.5. Παθοφυσιολογία της σιδηροπενίας

Σιδηροπενία λαμβάνει χώρα όταν η απώλεια σιδήρου υπερβαίνει το ποσό σιδήρου που απορροφάται από το έντερο. Η κατάσταση αυτή του αρνητικού ισοζυγίου σιδήρου εμφανίζεται όταν δεν καταναλώνεται αρκετός σίδηρος, όταν αναστέλλεται η απορρόφηση σιδήρου, όταν αυξάνονται οι ανάγκες του οργανισμού σε σίδηρο (π.χ. κατά την κύηση ή την ήβη) ή εξαιτίας απώλειας σιδήρου λόγω αιμορραγίας/απώλειας αίματος. Το κύριο αίτιο σιδηροπενίας είναι η απώλεια αίματος από το ουρογεννητικό σύστημα στις γυναίκες ή από το γαστρεντερικό σωλήνα και στα δύο φύλα¹¹³.

Η αναιμία των ΙΦΕΝ οφείλεται κυρίως σε σιδηροπενία^{1,7,17}. Πολλοί από τους προαναφερθέντες παθογενετικούς μηχανισμούς παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη ελλείμματος σιδήρου στις ΙΦΕΝ. Οι ασθενείς με ΙΦΕΝ, κυρίως οι γυναίκες, εμφανίζουν μειωμένη ημερήσια πρόσληψη σιδήρου, κυρίως μη-αιμικού σιδήρου, κατά κύριο λόγο εξαιτίας της αποφυγής τροφών με υψηλή περιεκτικότητα σε φυτικές ίνες, πλούσιων ή εμπλουτισμένων με σίδηρο, που θα μπορούσαν ενδεχομένως να επιδεινώσουν τη συμπτωματολογία της νόσου¹⁹. Φτωχή απορρόφηση σιδήρου εξαιτίας δομικών αλλαγών στο βλεννογόνο αναμένεται μόνο στη σχετικά σπάνια μορφή της NC του ανωτέρου πεπτικού, μολονότι δυσαπορρόφηση σιδήρου έχει περιγραφεί σε πάνω από 90% των παιδιατρικών ασθενών με ΙΦΕΝ. Ένας επιπλέον παράγοντας που επηρεάζει την απορρόφηση του σιδήρου των τροφών είναι τα αυξημένα επίπεδα hepcidin (σαν αποτέλεσμα χρόνιας φλεγμονής), που οδηγούν σε μειωμένη εκροή σιδήρου από τα εντεροκύτταρα. Ωστόσο, η κύρια αιτία αρνητικού ισοζυγίου σιδήρου στις ΙΦΕΝ παραμένει η χρόνια απώλεια αίματος από τον εξελκωμένο εντερικό βλεννογόνο^{1,7,113}.

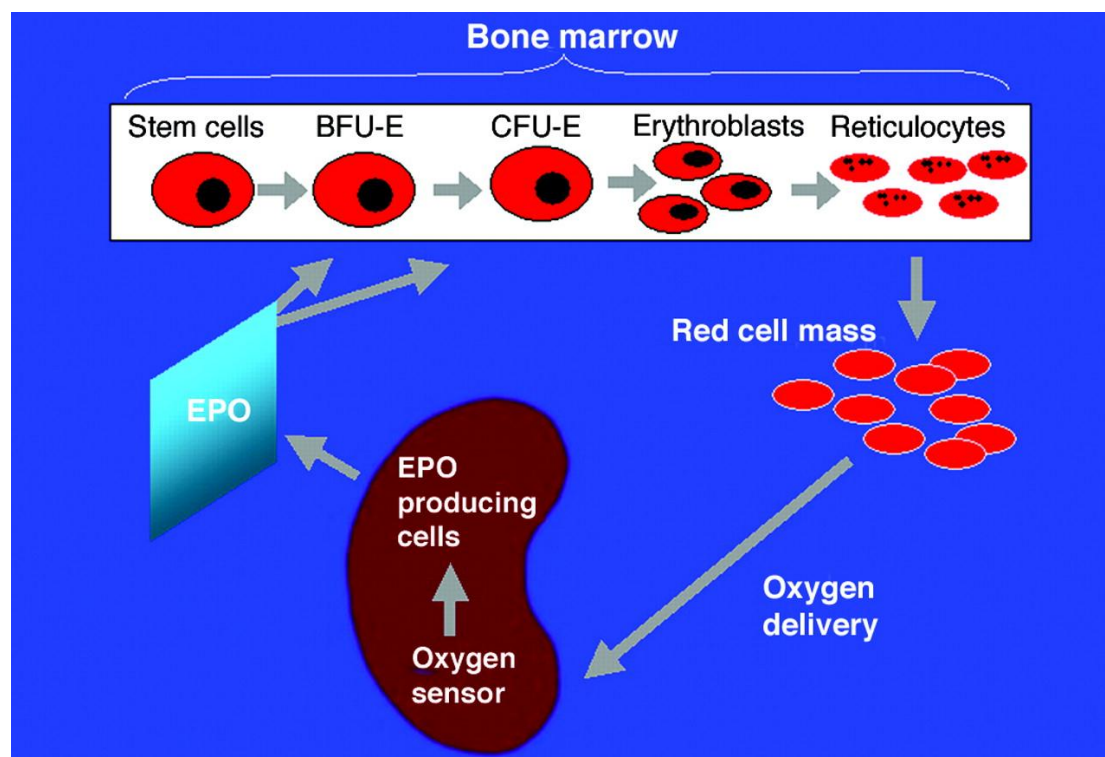
Η ένδεια εξωκυττάριου σιδήρου οδηγεί σε μειωμένη σύνθεση αποφερριτίνης και κατά συνέπεια σε πτώση των συγκεντρώσεων της φερριτίνης ορού. Η πτώση αυτή στο σίδηρο των αποθηκών είναι το πρώτο σημείο σιδηροπενίας. Στα αρχικά στάδια σιδηροπενίας, ο κορεσμός τρανσφερρίνης μπορεί να βρίσκεται εντός των φυσιολογικών ορίων και η ερυθροποίηση να γίνεται κανονικά. Ωστόσο, εάν το αρνητικό ισοζύγιο σιδήρου επιμένει, ο κορεσμός τρανσφερρίνης ελαττώνεται (ανεπάρκεια στη μεταφορά σιδήρου), και οι αποθήκες σιδήρου του οργανισμού δεν είναι πλέον επαρκείς για να διατηρήσουν μία φυσιολογική σύνθεση αιμοσφαιρίνης. Η συνέπεια είναι η ανάπτυξη υπόχρωμης, μικροκυτταρικής αναιμίας. Η πλήρης εικόνα της σιδηροπενίας αναδεικνύεται με τη μείωση της φερριτίνης πλάσματος, τη μείωση του κορεσμού τρανσφερρίνης, την αντισταθμιστική αύξηση της αποτρανσφερρίνης και την

υπερέκφραση του υποδοχέα 1 της τρανσφερρίνης και του διαλυτού ομολόγου του (sTfR). Ωστόσο, ερυθροποίηση υπό ένδεια σιδήρου μπορεί να λάβει χώρα ακόμη και όταν οι αποθήκες σιδήρου δεν έχουν εξαντληθεί τελείως ή είναι αυξημένες. Αυτό καλείται λειτουργική σιδηροπενία (functional iron deficiency) και εμφανίζεται όταν η κινητοποίηση του σιδήρου των μακροφάγων δεν επαρκεί για την κάλυψη των αναγκών σε σίδηρο του μυελού των οστών. Αυτό μπορεί να συμβεί όταν αυξάνονται οι ανάγκες για σίδηρο λόγω υψηλής ερυθροποιητικής δραστηριότητας του μυελού (π.χ. λόγω θεραπείας με EPO) ή όταν είναι διαταραγμένη η απελευθέρωση σιδήρου από τα μακροφάγα (π.χ. στην αναιμία χρόνιας νόσου)¹¹³.

Ένας διαφορετικός παθογενετικός μηχανισμός που μπορεί να συμβάλλει στην ένδεια σιδήρου για ερυθροποίηση στις ΙΦΕΝ σχετίζεται με διαταραχή στην κατανομή του σιδήρου, λόγω υψηλών συγκεντρώσεων προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών. Οι τελευταίες επάγουν την έκφραση hepcidin, η οποία με τη σειρά της αναστέλλει την απελευθέρωση σιδήρου από το διαμέρισμα αποθήκευσης (κύτταρα του συστήματος μονοκυττάρων-μακροφάγων και ηπατοκύτταρα), οδηγώντας σε υψηλή φερριτίνη πλάσματος, αλλά χαμηλό κορεσμό τρανσφερρίνης. Η σύνθεση TfR1 και sTfR1 μπορεί να ευοδωθεί ως σημείο ανεπαρκούς ερυθροποίησης, λόγω ένδειας σιδήρου¹¹³.

3.6. Ερυθροποίηση και ερυθροποιητίνη (EPO)

Η σύνθεση EPO ρυθμίζεται από ένα μηχανισμό ανάδρασης, μέσω του οποίου η υποξία λόγω αναιμίας διεγείρει την έκκριση EPO στην κυκλοφορία, η οποία με τη σειρά της διορθώνει την υποξία διεγείροντας τη δημιουργία επιπλέον ερυθρών αιμοσφαιρίων (εικόνα 10).

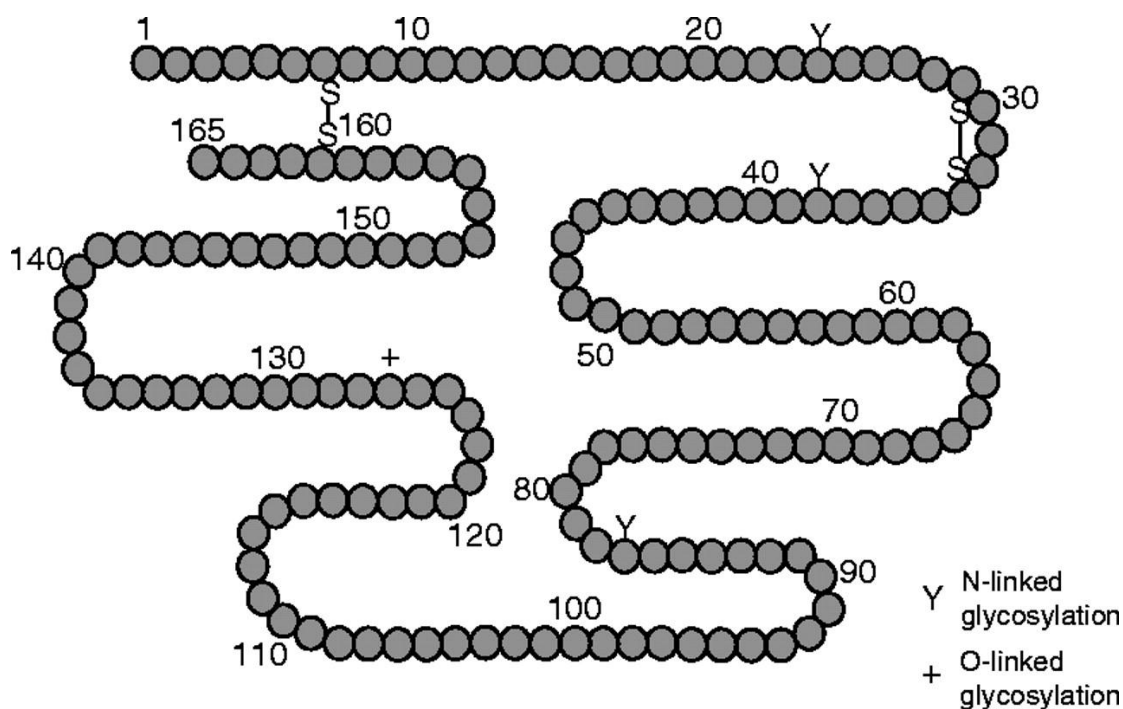


Εικόνα 10. Ο μηχανισμός ανάδρασης ρύθμισης της EPO, από την υποξία. (Πηγή: Lappin T. Oncologist 2003)

Η βασική παραγωγή ενδογενούς EPO είναι περίπου 3 U/Kg/ημέρα. Ως απάντηση στην υποξία, τα επίπεδα EPO αυξάνονται μετά από 60-90 λεπτά, φτάνουν στο μέγιστο σε 20 ώρες και μετά μειώνονται σε ένα ενδιάμεσο σταθερό επίπεδο, που είναι ανάλογο της σοβαρότητας της υποξίας¹¹⁴. Τα επίπεδα EPO επηρεάζονται επίσης από μεταβολικούς παράγοντες, υποδηλώνοντας ότι οι αυξημένες απαιτήσεις σε οξυγόνο διεγείρουν επίσης την παραγωγή EPO. Οι μηχανισμοί αίσθησης του οξυγόνου είναι λειτουργικοί τόσο στην αναιμική υποξία (ιστική υποξία με φυσιολογική αρτηριακή τάση οξυγόνου) όσο και στην υποξική υποξία (ιστική υποξία με ελαττωμένη αρτηριακή τάση οξυγόνου)¹¹⁴. Φαίνεται έτσι, ότι η ρύθμιση της παραγωγής EPO βασίζεται στην τάση οξυγόνου των ιστών. Το κύριο όργανο παραγωγής EPO είναι ο νεφρός. Το ήπαρ αναγνωρίστηκε αργότερα ως μία δευτερεύουσα πηγή EPO, ειδικά κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη¹¹³.

3.6.1. Ρύθμιση του γονιδίου της EPO

Το γονίδιο της EPO βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7, κωδικοποιεί ένα πολυπεπτιδίο με 193 αμινοξέα, που διασπάται κατά την έκκριση για να απελευθερώσει την πρωτεΐνη EPO με 165 αμινοξέα στην κυκλοφορία¹¹⁵ (εικόνα 11). Η έκκριση EPO εξαρτάται κυρίως από τα επίπεδα του mRNA, που είναι το αποτέλεσμα της αυξημένης μεταγραφής, αλλά επίσης και της υψηλής σταθερότητας του mRNA. Τα αντιδρώντα στην υποξία στοιχεία δε βρίσκονται μόνο στην αλληλουχία ενίσχυσης της EPO, αλλά και σε στενή γειτνίαση με πολλά άλλα γονίδια, που ελέγχονται από το οξυγόνο. Αυτό υποδηλώνει την ύπαρξη ενός κοινού μηχανισμού αίσθησης του οξυγόνου, τόσο στα παράγοντα EPO κύτταρα του νεφρού και του ήπατος, όσο και σε πολλά άλλα κύτταρα, όπου ρυθμίζει μία ποικιλία διαδικασιών¹¹⁴. Σε απάντηση στην υποξία, η μεταγραφή EPO αυξάνεται μέσω της εμπλοκής ενός ενισχυτικού στοιχείου, που βρίσκεται στο 3' άκρο του γονιδίου της EPO. Στον πυρήνα της διαδικασίας αυτής είναι ο επαγόμενος από την υποξία μεταγραφικός παράγοντας (HIF, hypoxia-inducible factor)¹¹⁶. Ο HIF αποτελείται από ένα ετεροδιμερές, με μία α -υπομονάδα, ρυθμιζόμενη από το οξυγόνο, και μία β -υπομονάδα, δομική¹¹⁷.



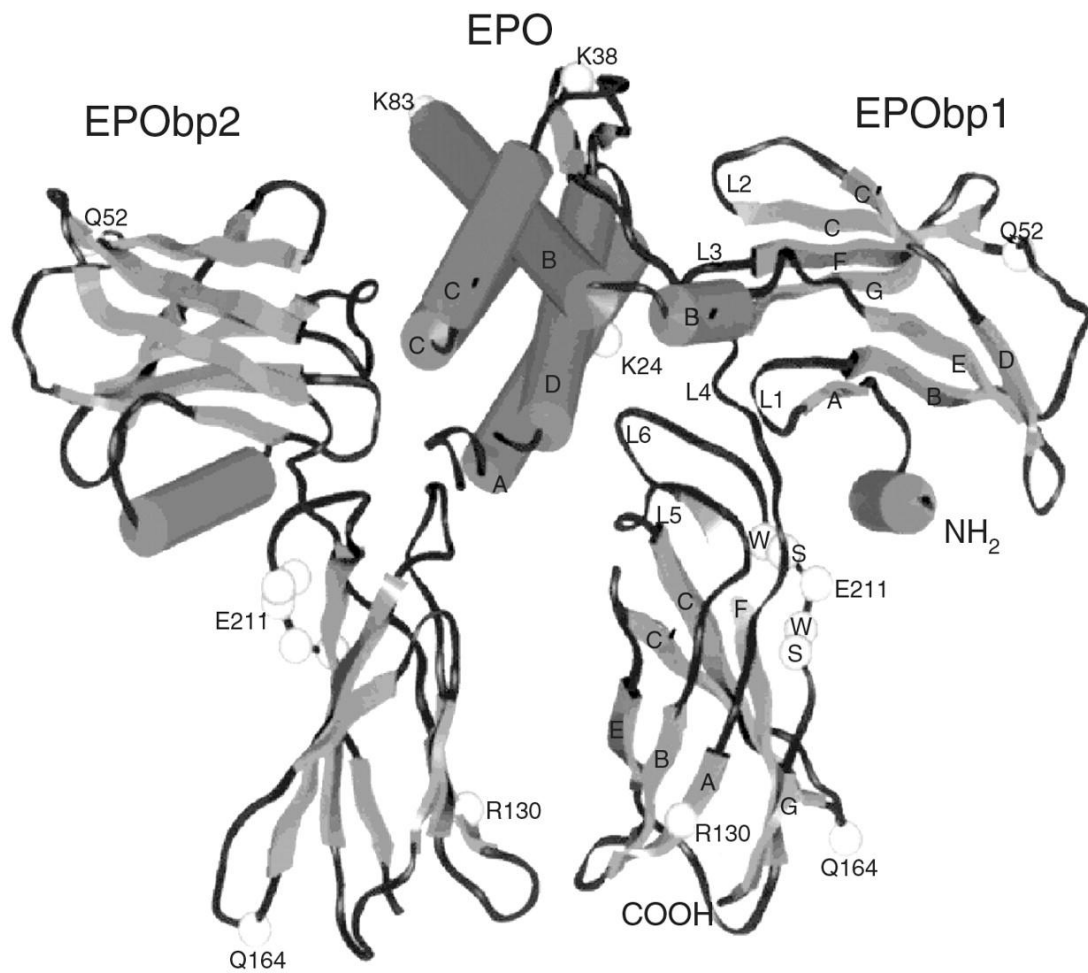
Εικόνα 11. Η δομή της ερυθροποιητίνης. (Πηγή: Farrell F, et al. Oncologist 2004)

Ο HIF-1^α σχηματίζει ένα σύμπλοκο μεταγραφικού παράγοντα, συνδεδεμένος σε ένα ενισχυτικό στοιχείο της EPO. Ο HIF-1^α επάγεται ταχέως από την υποξία και το CoCl₂, αλλά και από την deferoxamine, υποδηλώνοντας ότι η αίσθηση του οξυγόνου

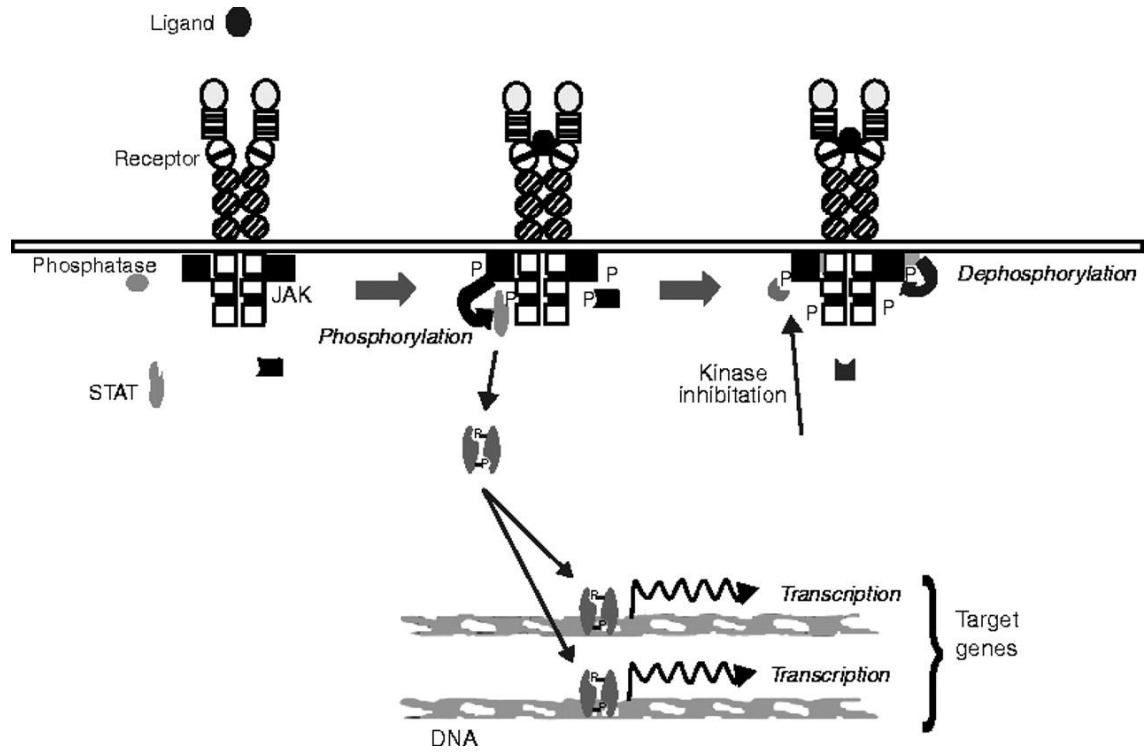
περιλαμβάνει μία πρωτεΐνη που περιέχει σίδηρο. Με την παρέλευση της υποξίας, ο HIF-1^α αποδομείται ταχέως στα πρωτεώματα, μετά τη σύνδεσή του με την πρωτεΐνη VHL (von Hippel-Landau). Η σύνδεση του HIF-1^α στη VHL στηρίζεται στην υδροξυλίωση 2 ειδικών προλινών (prolines), η οποία (υδροξυλίωση) βασίζεται σε μία υδροξυλάση που περιέχει μη-αιμικό σίδηρο. Στην υποξία, ο HIF-1^α δεν υδροξυλιώνεται, δε συνδέεται στην VHL και έτσι εξακολουθεί να διασφαλίζει τη συνεχή παραγωγή EPO. Σε παρουσία οξυγόνου, ο HIF-1^α υδροξυλιώνεται ταχέως, συνδέεται στην πρωτεΐνη VHL και οδηγείται προς αποδόμηση στο πρωτεόσωμα. Επιπλέον, η εξαρτώμενη από το οξυγόνο υδροξυλίωση του Hif-1^α σε μία ασπαραγίνη, από μία άλλη υδροξυλάση (FIH, Factor-inhibiting HIF-1), αναστέλλει τη σύνδεση σε μία άλλη πρωτεΐνη μέσα στο HIF-1^α μεταγραφικό σύμπλοκο, εμποδίζοντάς τη έτσι να παίζει τον ενισχυτικό της ρόλο στη μεταγραφή του γονιδίου της EPO. Αρνητικοί ρυθμιστές του EPO γονιδίου είναι ο GATA-2 και ο NF-κB. Ο GATA-2 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που συνδέεται στον προαγωγέα του EPO γονιδίου, στην 5' συνοδευτική περιοχή. Η σύνδεση του GATA-2 στο DNA μειώνεται σε κατάσταση υποξίας. Ο NF-κB αναστέλλει επίσης τον προαγωγέα του EPO γονιδίου. Η καταστολή του γονιδίου από τον NF-κB μπορεί να εξηγηθεί από τον ανταγωνισμό μεταξύ του NF-κB και άλλων μεταγραφικών παραγόντων για τους συν-παράγοντες p300/CBP, που εμπλέκονται στην επαγόμενη από την υποξία έκφραση του γονιδίου της EPO¹¹⁷.

3.6.2. Ο υποδοχέας ερυθροποιητίνης (EPO-R)

Ο EPO-R ανήκει στην υπεροικογένεια υποδοχέων cytokine class I¹¹⁶ (εικόνα 12). Η σηματοδότηση της EPO περιλαμβάνει πολλές πρωτεΐνες, που περιλαμβάνουν τη JaK2, που συνοδεύει τον EPO-R κοντά στη μεμβράνη, κινάσες που εμπλέκονται στα μονοπάτια PI3K, AKT και Ras, και τον Stat-5 (signal transducer and activator of transcription), που επηρεάζει την έκφραση πολλών γονιδίων που ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση και ενεργοποιεί την έκφραση διαφόρων αντι-αποπτωτικών γονιδίων στα κύτταρα της ερυθράς σειράς (εικόνα 13). Η σύνδεση της EPO σε κύτταρα ευαίσθητα σε αυτήν καταλήγει σε αυξημένη σύνθεση DNA και RNA, πρόσληψη γλυκόζης, μεταγραφή του γονιδίου της σφαιρίνης, έκφραση υποδοχέων τρανσφερίνης και παραγωγή αιμοσφαιρίνης. Το CFU-e είναι το πιο ευαίσθητο στην EPO κύτταρο, ενώ το BFU-e δεν είναι. Η EPO φαίνεται να είναι κυρίως ένας παράγοντας επιβίωσης μάλλον, παρά παράγοντας πολλαπλασιασμού, που εμποδίζει την απόπτωση των CFU-e μέσω βασεόφιλων ερυθροβλαστών¹¹⁶.



Εικόνα 12. Δομή του συμπλόκου EPO/EPO-R. (Πηγή: Farrell F, et al. Oncologist 2004)



Εικόνα 13. Το μονοπάτι ενεργοποίησης του υποδοχέα της EPO. (Πηγή: Farrell F, et al. Oncologist 2004)

3.7. Η επίδραση της φλεγμονής στην ομοιόσταση του σιδήρου και την ερυθροποίηση

Η αναιμία είναι μία συχνή επιπλοκή των χρόνιων φλεγμονωδών νοσημάτων (π.χ. καρκίνος, ρευματοειδής αρθρίτις, ΙΦΕΝ), όπως επίσης και της σήψης και της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας. Η αναιμία αυτή φαίνεται να είναι το αποτέλεσμα της διέγερσης του ανοσολογικού συστήματος από την υποκείμενη διεργασία και συγκεκριμένες φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, συμπεριλαμβανομένου του tumor necrosis factor alpha (TNF α), της ιντερφερόνης γ (IFN γ) και των ιντερλευκινών (IL) 1,6,8 και 10^{14,63,118}. Μέχρι σήμερα, έχουν ταυτοποιηθεί 3 κύριοι παθοφυσιολογικοί παράγοντες, υποκείμενοι της AXN. Όλοι μοιράζονται το κοινό χαρακτηριστικό ότι επάγονται μετά από διέγερση του εγγενούς ανοσολογικού μηχανισμού¹¹⁹ (εικόνα 14).

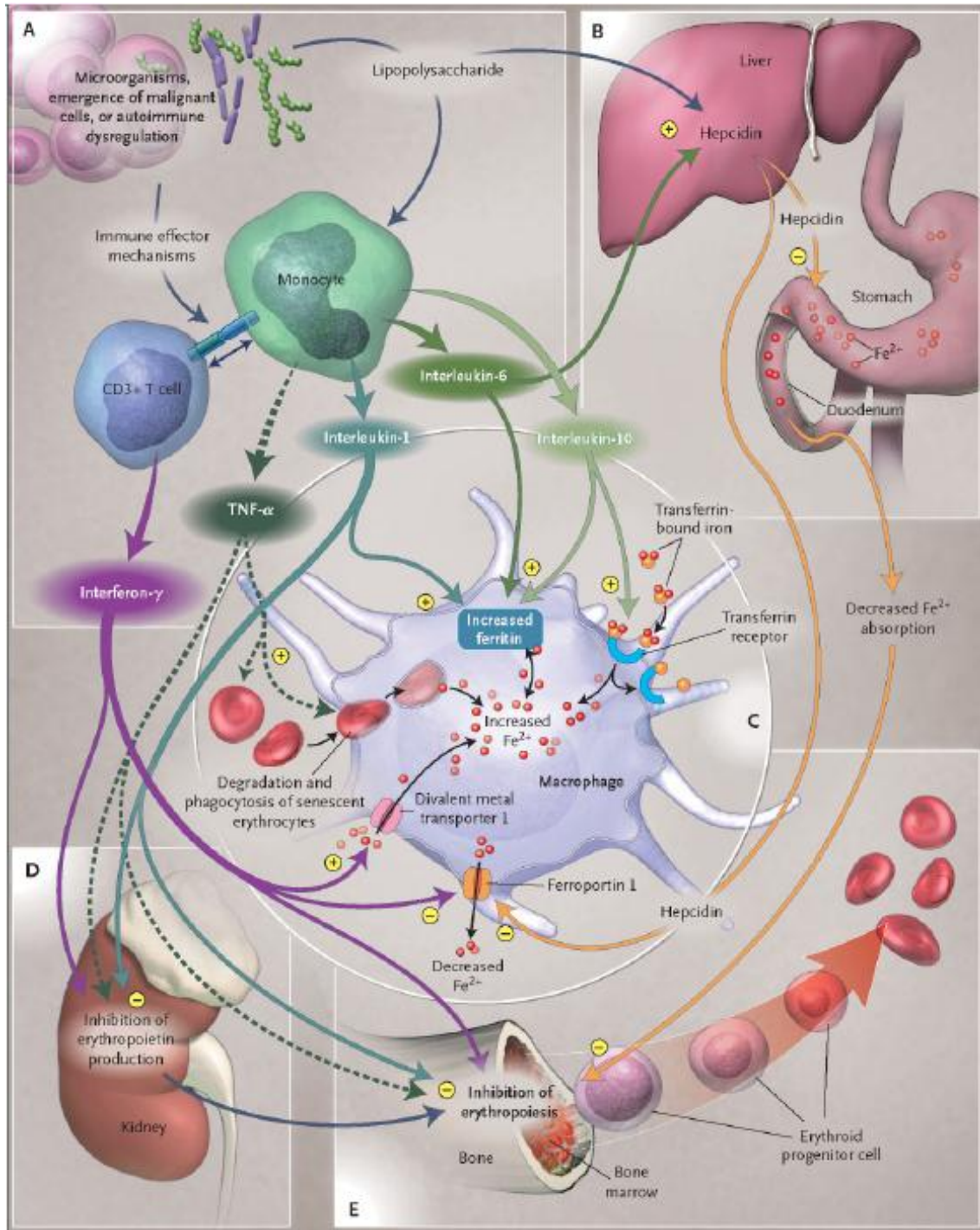
Πρώτον, η φλεγμονή οδηγεί σε κατακράτηση του σιδήρου εντός των κυττάρων του ΔΕΣ, έχοντας σαν αποτέλεσμα περιορισμένη διαθεσιμότητα σιδήρου για τα προγονικά ερυθροποιητικά κύτταρα.

Δεύτερον, οι κυτταροκίνες και οι πρωτεΐνες οξείας φάσης επηρεάζουν αρνητικά τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των προγονικών ερυθροποιητικών κυττάρων. Αυτό μπορεί να εκδηλωθεί ως προ-αποπτωτική δράση της IFN- γ , της INF- α , του TNF- α και της IL-1 στις προγονικές βαθμίδες BFU-e (erythroid burst forming units) και CFU-e (erythroid colony forming units)^{120,121}. Επιπρόσθετα, στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των προγονικών ερυθροποιητικών κυττάρων φαίνεται να συμβάλουν η μειωμένη διαθεσιμότητα σιδήρου για ερυθροποίηση, η μέσω κυτταροκινών αναστολή έκφρασης των υποδοχέων EPO στα προγονικά κύτταρα, η μειωμένη παραγωγή και δραστηριότητα της EPO, η ελαττωμένη έκφραση άλλων προ-αιμοποιητικών παραγόντων (όπως ο stem cell factor) και απευθείας τοξικές δράσεις ριζών επαγόμενων από κυτταροκίνες, όπως το οξείδιο του αζώτου (NO) ή ανιόντα υπεροξειδίου¹²⁰⁻¹²³.

Στην αναστολή της ερυθροποίησης εμπλέκονται ισχυρά πολλαπλοί μηχανισμοί απόπτωσης, εξηγώντας έτσι το χαμηλό ουδό της αναποτελεσματικής ερυθροποίησης¹²⁴. Η ένδεια EPO ή η διέγερση υποδοχέων θανάτου (death receptors) έχουν σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των κασπασών 3,8 και 10, η οποία οδηγεί στην απόσχιση των μεταγραφικών παραγόντων GATA-1 και TAL-1, προάγοντας έτσι την απόπτωση. Ωστόσο, η ενεργοποίηση των κασπασών παίζει επίσης σημαντικό ρόλο και στη φυσιολογική διαδικασία ωρίμανσης της ερυθράς σειράς. Οι υποδοχείς κυτταρικού θανάτου και οι συνδέτες τους ανήκουν στις υπεροικογένειες υποδοχέα TNF και TNF,

αντίστοιχα. Το σύστημα FasL (Fas/Fas-ligand) εμπλέκεται σε ένα ρυθμιστικό ανατροφοδοτικό μηχανισμό που ασκείται από τους ώριμους ερυθροβλάστες έναντι των ανώριμων ερυθροβλαστών. Τα σχηματίζοντα αποικίες κύτταρα της ερυθράς σειράς εκφράζουν χαμηλά επίπεδα Fas. Ωστόσο, ο Fas επάγεται στους πρώιμους ερυθροβλάστες και αυτή η υψηλή έκφραση μέχρι την τελική διαφοροποίηση, ενώ η έκφραση του FasL επάγεται επιλεκτικά στους αργότερα διαφοροποιούμενους ερυθροβλάστες. Έτσι, ο κυτταρικός θάνατος μέσω FasL είναι αποτελεσματικός μόνο σε λιγότερο ώριμους ερυθροβλάστες, όπου υφίσταται ανταγωνισμό από υψηλές δόσεις EPO. Όντως, η EPO μεσολαβεί στην διεύρυνση της ερυθράς σειράς κατά τη διάρκεια ερυθροποιητικού στρες, καταστέλλοντας την συνέκφραση των Fas/FasL. Η διάσχιση των GATA-1 και TAL-1 φαίνεται να ευθύνεται για τη μέσω Fas απόπτωση (κατά την απουσία EPO) και την αναστολή της ωρίμανσης (κατά την παρουσία EPO). Ένας άλλος επίσης αναστολέας της ερυθροποίησης είναι ο TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand). Οι υποδοχείς TRAIL εκφράζονται πυκνότερα στους ανώριμους ερυθροβλάστες, συγκριτικά με τους ώριμους, ενώ ο TRAIL εκφράζεται στους ώριμους ερυθροβλάστες, ένα μοτίβο παρόμοιο με το σύστημα Fas/FasL. Ο TRAIL μειώνει επιλεκτικά τον αριθμό των ενδιάμεσων ερυθροβλαστών με glycophorin A, αφήνοντας ανέπαφους τους πρώιμους ή τους ώριμους ερυθροβλάστες. Ο παράγοντας TWEAK, ένα άλλο μέλος της υπεροικογένειας TNF, είναι επίσης ικανός να αναστείλει την ανάπτυξη και διαφοροποίηση της ερυθράς σειράς, μέσω ενεργοποίησης κασπασών^{124,125}.

Εκτός από την IFN- γ και τον TNF- α , ο TGF- β 1 είναι επίσης ένας ισχυρότατος αναστολέας της ερυθροποίησης. Ωστόσο, ο μηχανισμός δράσης του είναι διαφορετικός από των άλλων κυτταροκινών. Δεν έχει σχεδόν καθόλου επίδραση στην απόπτωση, ενώ επιταχύνει και αυξάνει σημαντικά τη διαφοροποίηση των ερυθροβλαστών, ώστε να παράγουν φυσιολογικά εμπύρηννα ερυθρά, ακόμα και υπό την απουσία μακροφάγων. Ο TGF- β 1 αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μειώνοντας τον κύκλο των πρώιμων ερυθροβλαστών και επιταχύνοντας την ωρίμανσή τους, προς ορθοχρωματικούς νορμοβλάστες, που δεν είναι στον κύκλο. Ως εκ τούτου, ο TGF- β 1 είναι ένας παράδοξος αναστολέας της ερυθροποίησης που δρα μπλοκάροντας τον πολλαπλασιασμό και επιταχύνοντας τη διαφοροποίηση των ερυθρών προγονικών βαθμίδων¹²⁶.



Εικόνα 14. Παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί της αναιμίας χρόνιας νόσου. Για αναλυτική περιγραφή, βλέπε κείμενο. (Πηγή: αναφορά 14)

Μία άλλη κυτταροκίνη που αναστέλλει την ερυθροποίηση είναι ο SDF-1 (stromal derived factor-1). Τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών παράγουν SDF-1, και τα αιμοποιητικά κύτταρα εκφράζουν τον υποδοχέα του, CXCR4. Χαμηλές συγκεντρώσεις SDF-1 επάγουν την ανάπτυξη των αιμοποιητικών

κυττάρων, όμως υψηλά επίπεδα ελαττώνουν την ανάπτυξη των ερυθρών προγονικών βαθμίδων, μέσω αύξησης της σύνθεσης του Fas-συνδέτη και συνακόλουθη απόπτωση των ερυθροβλαστών, μέσω του μονοπατιού Fas-συνδέτη/Fas¹²⁷. Οι παράγοντες που ρυθμίζουν αυτή την διπλή επίδραση, δεν είναι ακόμη γνωστοί.

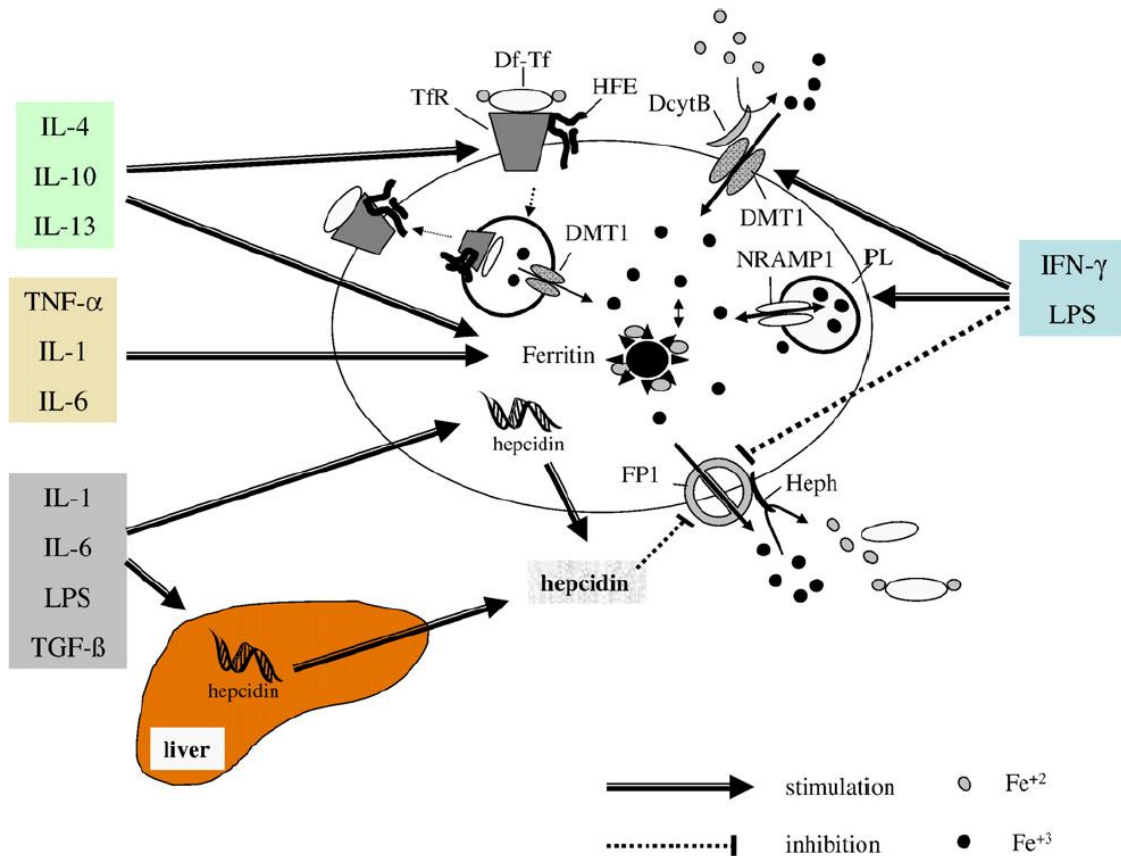
Οι πρωτεΐνες οξείας φάσης, όπως η α1-αντιθρυψίνη και η α2-μακροσφαιρίνη, προσδέονται ισχυρά στους υποδοχείς τρανσφερρίνης και αναστέλλουν την μέσω αυτών των υποδοχέων πρόσληψη σιδήρου από τα προγονικά ερυθροποιητικά κύτταρα, μπλοκάροντας έτσι την ανάπτυξη και διαφοροποίησή τους^{128,129}. Αντιπολλαπλασιαστική δράση έναντι της ερυθροποίησης έχει περιγραφεί και για τη φερριτίνη¹³⁰, που αναφέρεται στον περιορισμό της διαθεσιμότητας σιδήρου για τα προγονικά κύτταρα. Επιπλέον, οι ασθενείς με AXN μπορεί να αναπτύξουν ανεπάρκειες βιταμινών, όπως κοβαλαμίνη ή φολικό οξύ, καταστάσεις που βλάπτουν περαιτέρω τον πολλαπλασιασμό των αιμοποιητικών κυττάρων¹³¹.

Τρίτον, στην ανάπτυξη AXN συμβάλει και η ελαττωμένη παραγωγή και βιολογική δράση της ενδογενούς EPO. Τα επίπεδα EPO στην AXN έχουν βρεθεί να είναι ανεπαρκή για το βαθμό αναιμίας σε πολλές περιπτώσεις^{132,133}. Επιπρόσθετα, η βιολογική απάντηση στην υποξία είναι ελαττωματική σε ασθενείς με AXN, πράγμα που δε θα πρέπει να αποδοθεί σε μεταβολές της ομοιόστασης του σιδήρου, αλλά μάλλον στις αρνητικές επιδράσεις των κυτταροκινών στην παραγωγή και δράση της EPO¹³⁴. Η IL-1 και ο TNF-α επάγουν το σχηματισμό τοξικών ριζών, καταστρέφοντας έτσι τα κύτταρα που παράγουν EPO και αναστέλλοντας τη σύνθεσή της¹³⁵. Αυτό παρατηρήθηκε και με την χορήγηση LPS σε ποντίκια, που οδήγησε σε ελαττωμένη έκφραση του mRNA της EPO στους νεφρούς¹³⁵. Η ανταπόκριση των προγονικών ερυθροποιητικών κυττάρων στην EPO σχετίζεται με την ποσότητα κυτταροκινών στην κυκλοφορία, καθώς υπό την παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων IFN-γ ή TNF-α, απαιτούνται πολύ μεγαλύτερες ποσότητες EPO για την αποκατάσταση του σχηματισμού αποικιών CFU-e¹³⁶. Μετά τη σύνδεση στον υποδοχέα της, η EPO διεγείρει μέλη της οικογένειας των STAT (signal transducer and activator of transcription) και κατόπιν ενεργοποιεί τη φωσφορυλίωση mitogen και tyrosine κινασών, διαδικασίες που επηρεάζονται και ρυθμίζονται από φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και άλλους ρυθμιστές αρνητικής επανατροφοδότησης (negative feedback) που επάγονται από αυτές^{135,137}. Επιπλέον, η περιορισμένη διαθεσιμότητα σιδήρου επηρεάζει αρνητικά και τη βιολογική δραστηριότητα της EPO¹³⁸.

Πιο επιγραμματικά, στην AXN, φαίνεται να εμπλέκονται διάφοροι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί (αντίστοιχες κυτταροκίνες)^{14,63} (εικόνα 15):

1. Ελαττωμένη διάρκεια ζωής των ερυθροκυττάρων εξαιτίας δυσερυθροποίησης, αυξημένου ρυθμού καταστροφής και αυξημένης φαγοκυττάρωσης (TNFα).
2. Ανεπαρκής ανταπόκριση της παραγωγής EPO για τον αντίστοιχο βαθμό αναιμίας σε πολλούς, αλλά όχι όλους τους ασθενείς (IL-1 & TNFα)¹³³.
3. Ελαττωμένη ευαισθησία των κυττάρων της ερυθράς σειράς στην EPO (IFNγ, IL-1, TNFα, hepcidin)¹³⁹.
4. Αναστολή της ωρίμανσης και διαφοροποίησης των κυττάρων της ερυθράς σειράς (IFNγ, IL-1, TNFα, α1-αντιθρυσίνη).
5. Παθολογική ομοίωση του σιδήρου εξαιτίας αυξημένης έκφρασης του DMT1 (IFNγ) και του TfR (IL-10) στα μακροφάγα, μειωμένης έκφρασης της ferroportin 1 (αυξημένες συγκεντρώσεις hepcidin λόγω IFNγ και IL-6) στα εντεροκύτταρα (αναστολή απορρόφησης σιδήρου) και μακροφάγα (αναστολή επανακυκλοφορίας του σιδήρου), και αυξημένου ρυθμού σύνθεσης της φερριτίνης (TNFα, IL-1, IL-6, IL-10) (αυξημένη αποθήκευση σιδήρου).

Οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως η IL-6, επάγουν τη μεταγραφή της hepcidin μέσω ενεργοποίησης της κινάσης Janus (Jak), που φωσφορυλιώνει τη Stat3 και την ενεργοποιεί¹⁴⁰. Η μετακίνηση της Stat3 στον πυρήνα και η σύνδεσή της με το SRE [signal transducer and activator of transcription (Stat) Responsive element], που βρίσκεται στον εγγύς προαγωγέα του γονιδίου της hepcidin, έχει σαν αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή hepcidin (εικόνα 7C, σελ.140). Το SRE φαίνεται να ελέγχεται από το παρακείμενο BMP-RE (BMP-responsive element) μέσω ενεργοποίησης Smad, που απαιτείται για την πλήρη δραστηριότητα του προαγωγέα. Ένα άπω σημείο BMP-RE θεωρείται ότι αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο Smad-Stat, το οποίο φέρνει τις εγγύς και άπω περιοχές του προαγωγέα της hepcidin σε φυσική επαφή¹⁴¹. Έτσι, φαίνεται ότι η σηματοδότηση μέσω Smad παίζει κεντρικό ρόλο στη βαθμονόμηση της κατάλληλης απάντησης στη φλεγμονή. Έχει περαιτέρω προταθεί ότι η ενεργοποίηση της Stat3 *per se*, χωρίς φλεγμονή, μπορεί να ελέγξει τις συγκεντρώσεις της hepcidin¹⁴².



Εικόνα 15. Συνοπτική σχηματική αναπαράσταση των επιδράσεων της φλεγμονής στην ερυθροποίηση και την ομοιόσταση του σιδήρου. (Πηγή: αναφορά 119)

Έχει βρεθεί επίσης, ότι η έκφραση της hepcidin επάγεται και από τη σηματοδότηση μονοπατιών στρες, μέσω απάντησης ξετυλιγμένης πρωτεΐνης του κυτταρικού ενδοπλασματικού δικτύου (cellular endoplasmic reticulum unfolded protein response). Η απάντηση αυτή εμπλέκεται στην οξείας φάσης απάντηση του ήπατος σε λιποπολυσακχαρίτες, IL-6 και IL-1 β , υποδηλώνοντας ότι η έκφραση του γονιδίου της hepcidin μπορεί να ρυθμίζεται και από μία επιπλέον βαθμίδα ενδογενούς ελέγχου κατά τη διάρκεια της φλεγμονής^{143,144}. Όλα αυτά οδηγούν σε χαμηλή συγκέντρωση σιδήρου στον ορό και χαμηλό κορεσμό τρανσφερρίνης, παρά τη φυσιολογική ή υψηλή φερριτίνη ορού, μέσω παράκαμψης του σιδήρου στο ΔΕΣ (λειτουργική σιδηροπενία), καθώς επίσης και σε ερυθροποίηση με περιορισμένο σίδηρο και ήπια προς μέτρια αναιμία.

Ωστόσο, η παθοφυσιολογία της αναιμίας που σχετίζεται με οξεία φλεγμονή είναι διαφορετική. Σε αυτή την περίπτωση, στις φλεγμονώδεις αντιδράσεις μεσολαβούν κυρίως η IL-6 και η IL-8, με παροδική συνεισφορά του TNF α και της IL-1, ενώ οι συγκεντρώσεις στο πλάσμα της IFN γ είναι μη ανιχνεύσιμες ή εντός των φυσιολογικών ορίων¹⁴⁵⁻¹⁴⁷. Ως εκ τούτου, στις περισσότερες τέτοιες καταστάσεις, οι δύο κύριοι

μηχανισμοί που οδηγούν σε αναιμία είναι η απώλεια αίματος και η μειωμένη ερυθροποίηση λόγω ελαττωμένης διαθεσιμότητας σιδήρου, τη στιγμή που οι συγκεντρώσεις EPO είναι φυσιολογικές ή σχεδόν φυσιολογικές¹⁴⁸.

Στην περίπτωση εμμένουσας μειωμένης απορρόφησης σιδήρου ή/και χρόνιας απώλειας αίματος, η AXN μπορεί να εξελιχθεί σε AXN με αληθή σιδηροπενία (AXN+Σ). Είναι αξιοσημείωτο, ότι οι ασθενείς με AXN+Σ έχουν σημαντικά χαμηλότερες συγκεντρώσεις hepcidin, συγκριτικά με εκείνους με AXN, και έχουν τη δυνατότητα της απορρόφησης από το έντερο κάποιου ποσού σιδήρου από τη διαίτα και της κινητοποίησης του σιδήρου από τα μακροφάγα. Έτσι, οι συγκεντρώσεις της κυκλοφορούσας hepcidin στην AXN+Σ φαίνεται να ανταποκρίνονται καλύτερα στις απαιτήσεις για σίδηρο της ερυθροποίησης, απ' ό,τι μόνο στη φλεγμονή¹⁴⁹.

Θα πρέπει να λαμβάνεται πάντα υπόψη ότι ο σίδηρος δεν απαιτείται μόνο για την ερυθροποίηση και τον οξειδωτικό μεταβολισμό. Οι αντιδράσεις κυτταρικής ανοσίας εξαρτώνται επίσης από την παρουσία σιδήρου και έχουν περιγραφεί συγκεκριμένες βλάβες στην κυτταρική ανοσία, ακόμη και σε ήπια ΣΠΑ, που περιλαμβάνουν την διαταραγμένη ωρίμανση και λειτουργία των λεμφοκυττάρων και των κυττάρων φυσικών φονέων (natural killer cells), καθώς και την καταστολή της αντίδρασης των ουδετεροφίλων^{150,151}. Για αυτό το λόγο, τα επεισόδια συστηματικής φλεγμονώδους απάντησης διαρκούν περισσότερο σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς, με λειτουργική σιδηροπενία, με επί μακρόν νοσηλεία σε ΜΕΘ και αυξημένη νοσηρότητα^{152,153}.

Εν τέλει, η σιδηροπενία ή η λειτουργική ΣΠΑ μπορούν να οδηγήσουν όχι μόνο σε ελαττωμένη ερυθροποίηση και χρόνια κόπωση, αλλά και σε ακατάλληλη ανοσολογική ανταπόκριση. Από την άλλη πλευρά, είναι ξεκάθαρο ότι η υπερφόρτωση με σίδηρο (ή η χορήγηση σιδήρου σε ασθενείς χωρίς έλλειμμα) μπορεί να οδηγήσει σε επιδείνωση τόσο λοιμωδών όσο και χρόνιων φλεγμονωδών νοσημάτων. Γι' αυτό το λόγο, η υποκατάσταση με σίδηρο σε ασθενείς με ενεργές λοιμώξεις ή εμμένουσα βακτηριαιμία, θα πρέπει να αποφεύγεται⁶³.

Η αναιμία στις
Ιδιοπαθείς
Φλεγμονώδεις Εντερικές
Νόσους

Μέρος 2ο



Εισαγωγή

Για τον αποτελεσματικό χειρισμό ασθενών με ΙΦΕΝ και αναιμία, είναι πολύ σημαντικό για τον θεράποντα ιατρό να διαγνώσει τον τύπο της αναιμίας και να καθορίσει το βαθμό της σιδηροπενίας και το βαθμό φλεγμονής σε κάθε ασθενή, έτσι ώστε να αποφασίσει σε εξατομικευμένη βάση για τη θεραπεία. Στις μέρες μας, στη φαρέτρα μας υπάρχει πληθώρα εδραιωμένων αλλά και νέας γενιάς δεικτών, μερικοί εκ των οποίων παρέχονται από τους αιματολογικούς αναλυτές νέας τεχνολογίας. Υπάρχουν ολοένα και περισσότερα δεδομένα σχετικά με τη δυνατότητα τέτοιων δεικτών να διαφοροποιούν τη διάγνωση της ΣΠΑ από τη διάγνωση της φλεγμονής, με στόχο την αποτελεσματική αλλά και συγκρατημένου κόστους διάγνωση του τύπου της αναιμίας στις ΙΦΕΝ. Ακολουθεί μία βασισμένη σε στοιχεία (evidence based) εκτενής ανάλυση της διαγνωστικής ικανότητας συμβατικών και νέας γενιάς δεικτών στη διάγνωση της αναιμίας των ΙΦΕΝ. *[Η ακόλουθη ανάλυση δημοσιεύθηκε με μικρές παραλλαγές ως: Oustamanolakis P, Koutroubakis IE, Kouroumalis EA. Diagnosing anemia in inflammatory bowel disease: Beyond the established markers. Journal of Crohn's and Colitis (2011), doi:10.1016/j.crohns.2011.03.010]*

4.1. Δείκτες σχετιζόμενοι με το προφίλ σιδήρου (iron status)

4.1.1. Σίδηρος ορού

Το ποσό του σιδήρου στο ανθρώπινο σώμα είναι φυσιολογικά 3-4 gr, που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 40-50 mg/kg. Περίπου το 60% του σιδήρου βρίσκεται υπό τη μορφή αιμοσφαιρίνης στα κυκλοφορούντα ερυθροκύτταρα και άλλα 6-7 mg/Kg υπό τη μορφή μυοσφαιρίνης και άλλων ενζύμων. Ο σίδηρος που μεταφέρεται, προσδεμένος στην πρωτεΐνη-μεταφορέα τρανσφερρίνη, αντιπροσωπεύει μόνο ένα μικρό μέρος (<0,2%) του συνολικού σιδήρου του σώματος. Ο συνδεδεμένος στην τρανσφερρίνη σίδηρος, είναι ο σίδηρος που τροφοδοτεί του ιστούς. Ο υπόλοιπος σίδηρος (15-30% του συνολικού σιδήρου) βρίσκεται σε αποθηκευτική μορφή, κυρίως στο κυτταρόπλασμα υπό μορφή φερριτίνης αλλά και στα λυσοσώματα, ως αιμοσιδηρίνη⁶⁸.

Οι συγκεντρώσεις σιδήρου στον ορό αντανακλούν την ισορροπία ροής του σιδήρου μέσα και έξω από το διαμέρισμα του πλάσματος. Ο σίδηρος στο πλάσμα μεταβάλλεται πολύ γρήγορα και τα επίπεδα σιδήρου στο πλάσμα υπόκεινται σε μεγάλες και ταχείες αλλαγές. Οι αποθήκες σιδήρου εμφανίζουν εκτεταμένες διακυμάνσεις, που εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες όπως ο κερκάδιος ρυθμός, η ανανέωση του

σιδήρου στα διάφορα διαμερίσματα και η απορρόφηση. Η ανανέωση του σιδήρου στον ορό λαμβάνει χώρα πολλές φορές ημερησίως^{154,155}. Η μέτρηση της συγκέντρωσης σιδήρου στον ορό υπόκειται σε πολλές μεταβλητές που μπορεί να προκαλέσουν σημαντικά σφάλματα στην ακρίβεια, όπως ανεπαρκώς επεξεργασθέντα γυάλινα υλικά, επαφή αντιδραστηρίων με μικρές ποσότητες σιδήρου, θολερότητα και παγίδευση του σιδήρου στις πρωτεΐνες του πλάσματος κατά την κατακρήμνισή τους¹⁵⁶. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται σε μερικές τεχνικές μπορεί να μην είναι τα πλέον ειδικά για το σίδηρο. Η παρουσία ελεύθερης αιμοσφαιρίνης σε συγκεντρώσεις πολύ μικρές για να ανιχνευθούν οπτικά, μπορεί να δώσει ιδιαίτερος υψηλές συγκεντρώσεις σιδήρου με τη μέθοδο της ατομικής απορρόφησης, εκτός εάν χρησιμοποιηθεί ορός τελείως κεκαθαμένος από πρωτεΐνη. Επιπλέον, πολλοί άλλοι παράγοντες όπως η έμμηνος ρύση στις γυναίκες^{157,158}, οξείες ή χρόνιες φλεγμονώδεις διεργασίες (όπως οι ΙΦΕΝ)^{159,160}, κακοήθειες¹⁶¹, χημειοθεραπεία ή το έμφραγμα του μυοκαρδίου^{162,163}, μπορεί να επηρεάσουν τις τιμές σιδήρου. Συμπερασματικά, η συγκέντρωση σιδήρου του ορού είναι ένας μάλλον μη αξιόπιστος δείκτης για την αξιολόγηση της ΣΠΑ σε ασθενείς με ΙΦΕΝ.

4.1.2. Φερριτίνη

Η φερριτίνη είναι μία ολιγομερής πρωτεΐνη που σχηματίζει ένα κοίλο πρωτεϊνικό κάλυμμα, μέσα στο οποίο μπορούν να αποθηκευθούν σημαντικές ποσότητες σιδήρου (έως και 4500 άτομα/μόριο), υπό μη-τοξική, διαλυτή και βιοδιαθέσιμη μορφή. Υπάρχει σε όλα τα ανθρώπινα κύτταρα, όπου χρησιμεύει ως αποθήκη σιδήρου για τις κυτταρικές ανάγκες. Τα κύρια μέρη αποθήκευσης φερριτίνης είναι το ήπαρ, ο σπλήνας και οι σκελετικοί μύες. Η προέλευση της φερριτίνης στον ορό δεν έχει διευκρινισθεί πλήρως, αν και μελέτες σε ζώα υποδεικνύουν ότι προέρχεται κυρίως από το ήπαρ⁶⁸.

Η μέτρηση της φερριτίνης αποτελεί μία χρήσιμη έμμεση εκτίμηση των αποθηκών σιδήρου του οργανισμού. Μικρές ποσότητες φερριτίνης που εισέρχονται στην κυκλοφορία μπορούν να μετρηθούν με ανοσολογικές τεχνικές. Σε υγιή άτομα, τα επίπεδα φερριτίνης ορού σχετίζονται με τις αποθήκες σιδήρου του οργανισμού. Η μέγιστη δυνατή συγκέντρωση γλυκοζυλιωμένης φερριτίνης ορού που προέρχεται από ενεργό σύνθεση φερριτίνης είναι περίπου 4000 μg/L. Υψηλότερες συγκεντρώσεις θεωρείται ότι οφείλονται σε αποδέσμευση ενδοκυττάριας φερριτίνης από κατεστραμμένα κύτταρα¹⁶⁴.

Αυξημένες συγκεντρώσεις φερριτίνης συνήθως αντιστοιχούν σε αυξημένες αποθήκες σιδήρου, όμως και κάποιες διαταραχές μπορούν επίσης να αυξήσουν τα επίπεδα φερριτίνης στον ορό, ανεξάρτητα από το σίδηρο του σώματος. Η φερριτίνη ορού είναι μία πρωτεΐνη οξείας φάσεως, η συγκέντρωσή της οποίας μπορεί να αυξηθεί από διάφορες καταστάσεις, όπως εμπύρετο, οξείες λοιμώξεις, ρευματοειδής αρθρίτις και άλλες χρόνιες φλεγμονώδεις διαταραχές, όπως οι ΙΦΕΝ¹⁶⁴. Οξεία και χρόνια ηπατική βλάβη, όπως και βλάβες σε άλλους ιστούς, μπορούν να αυξήσουν τη φερριτίνη ορού, ως μέρος μίας φλεγμονώδους διεργασίας ή μέσω αποδέσμευσης φερριτίνης από τους ιστούς (μη γλυκοζυλιωμένης), λόγω καταστροφής παρεγχυματικών κυττάρων. Μειωμένη κάθαρση της κυκλοφορούσας φερριτίνης, για παράδειγμα λόγω ηπατικής δυσπραγίας, μπορεί επίσης να οδηγήσει σε αύξηση της συγκέντρωσης φερριτίνης ορού. Κακοήθεις παθήσεις και χημειοθεραπεία αυξάνουν επίσης τη φερριτίνη στον ορό¹⁶⁴. Καθένας από τους παράγοντες αυτούς μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα αυξημένα επίπεδα φερριτίνης, τα οποία μπορούν να καλύψουν τη σιδηροπενία και να επιπλέξουν την αναγνώριση υπερφόρτωσης με σίδηρο. Από την άλλη πλευρά, καταστάσεις που μειώνουν τα επίπεδα φερριτίνης ορού, εκτός από τη σιδηροπενία, είναι ο υποθυρεοειδισμός και η ανεπάρκεια βιταμίνης C¹⁶⁴.

Κάθε 1 μg/L φερριτίνης ορού αντιστοιχεί σε 8-10 mg αποθηκών σιδήρου¹⁶⁵. Οι Guyatt και συν. σε μία ανάλυση 55 μελετών αναφέρουν ότι η μέση περιοχή των καμπυλών ROC (receiver-operator characteristic) για τη φερριτίνη ήταν 0.95, ενώ για τον MCV μόνο 0.76, στη διάγνωση της σιδηροπενίας¹⁶⁶. Επίπεδα φερριτίνης ≤ 12 μg/L έχουν υψηλή ειδικότητα (98%) αλλά χαμηλή ευαισθησία (25%) για τη διάγνωση σιδηροπενίας¹⁶⁷. Η ευαισθησία μπορεί να αυξηθεί στο 92%, εάν το όριο αποκοπής γίνει 30 μg/L. Οι Kis και συν.¹⁶⁸ σε ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε οστεομυελική βιοψία, βρήκαν ότι φερριτίνη ≤ 100 μg/L είχε 64.9% ευαισθησία και 96.1% ειδικότητα στη διάγνωση της σιδηροπενίας. Το όριο των 100 μg/L φερριτίνης βρέθηκε επίσης ότι μπορούσε να διαχωρίσει αναιμικούς ασθενείς με υψηλό κίνδυνο προχωρημένης νεοπλασίας, από μη αναιμικούς ασθενείς χαμηλού κινδύνου¹⁶⁹. Βάσει των ανωτέρω δεδομένων, ένα απλό κλινικό όριο αποκοπής μπορεί να καθορίσει την αντιμετώπιση αναιμικών ασθενών: φερριτίνη ορού < 15 μg/L επιβεβαιώνει σιδηροπενία ενώ φερριτίνη ορού > 100 μg/L συνήθως αποκλείει ΣΠΑ. Ενδιάμεσες τιμές χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης¹⁶⁶. Μολονότι τα επίπεδα φερριτίνης αυξάνονται με την ηλικία, και αυτή είναι μία πρωτεΐνη οξείας φάσεως που επηρεάζεται από τη χρόνια φλεγμονή, τη λοίμωξη, την κακοήθεια και τη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, η ευαισθησία και

ειδικότητά της λίγο αλλάζουν, εάν χρησιμοποιείται το όριο των 100 $\mu\text{g/L}$ ^{166,168}. Άλλοι έχουν προτείνει ότι το επίπεδο των 70 $\mu\text{g/L}$ είναι ασφαλές όριο για τον αποκλεισμό της σιδηροπενίας^{170,171}. Οι Guagnozzi και συν.¹⁷² σε μία μελέτη με 76 ασθενείς με ΙΦΕΝ, βρήκαν ότι η ευαισθησία και ειδικότητα της φερριτίνης, με όριο αποκοπής τα 15 ng/ml , ήταν χαμηλές (89% και 64.5%, αντίστοιχα) για τη διάγνωση της ΣΠΑ. Ανάλυση ROC έχει δείξει ότι η διαγνωστική ακρίβεια της φερριτίνης μπορεί να βελτιωθεί με χρήση υψηλότερων ορίων αποκοπής. Σε ασθενείς με ΙΦΕΝ και αναιμία, όριο αποκοπής της φερριτίνης 28 ng/ml έδειξε ευαισθησία 93.8% και ειδικότητα 90%, συμπεραίνοντας ότι η φερριτίνη μπορεί να προταθεί ως ένας ακριβής, απλός και χρήσιμος δείκτης για την αναγνώριση της ΣΠΑ.

Με βάση τις επίσημες οδηγίες διάγνωσης και αντιμετώπισης της ΣΠΑ και της αναιμίας στις ΙΦΕΝ¹³, η φερριτίνη ορού περιλαμβάνεται στις παραμέτρους προληπτικού ελέγχου για αναιμία, με τη σύσταση να μετράται κάθε 6 με 12 μήνες, σε ασθενείς σε ύφεση ή με ήπια νόσο, ή τουλάχιστον κάθε 3 μήνες σε εξωτερικούς ασθενείς με ενεργό νόσο. Η φερριτίνη έχει προστεθεί σε άλλες παραμέτρους (γενική αίματος και CRP) ως ελάχιστοι δείκτες διάγνωσης αναιμίας, φλεγμονώδους έξαρσης ή ΣΠΑ σε πρώιμο στάδιο, επειδή η σιδηροπενία είναι μία πολύ συχνή διατροφική ανεπάρκεια, με έντονη επίδραση στην αναιμία¹⁷³. Η φερριτίνη, μαζί με τον κορεσμό τρανσφερρίνης και τη CRP, είναι ο ελάχιστος έλεγχος για τους ασθενείς με ΙΦΕΝ και αναιμία. Ο συνδυασμός επιπέδων φερριτίνης ορού με τα επίπεδα του διαλυτού υποδοχέα τρανσφερρίνης (sTfR), μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση σιδηροπενίας (υψηλός sTfR, χαμηλή φερριτίνη), φλεγμονής (φυσιολογικός sTfR και φερριτίνη) ή μικτών καταστάσεων (αυξημένος sTfR, φυσιολογική φερριτίνη). Επιπλέον, φερριτίνη $<30 \mu\text{g/L}$ (σε συνδυασμό με κορεσμό τρανσφερρίνης $<16\%$) είναι ένας εδραιωμένος δείκτης σιδηροπενίας σε ασθενείς με φλεγμονή. Σε παρουσία φλεγμονής, το κατώτερο όριο φερριτίνης ορού που αντιστοιχεί σε φυσιολογικές αποθήκες σιδήρου είναι τα 100 $\mu\text{g/L}$, έτσι τα διαγνωστικά κριτήρια για την AXN είναι φερριτίνη ορού $>100 \mu\text{g/L}$ και κορεσμός τρανσφερρίνης $<16\%$. Εάν τα επίπεδα φερριτίνης είναι ανάμεσα σε 30 και 100 $\mu\text{g/L}$, είναι πιθανός ένας συνδυασμός αληθούς ΣΠΑ και AXN. Τέλος, η φερριτίνη ορού μπορεί να χρησιμοποιηθεί υπό τη μορφή του λόγου STfR/log ferritin, σαν ένα χρήσιμο εργαλείο αποκλεισμού ΣΠΑ, όταν είναι <1 ¹⁴.

4.1.3. Τρανσφερρίνη (TRF) & Συνολική σιδηροδεσμευτική ικανότητα (TIBC, Total Iron Binding Capacity)

Η TRF μεσολαβεί για την ανταλλαγή σιδήρου μεταξύ των ιστών του σώματος, προσλαμβάνοντας σίδηρο από ιστούς δότες, όπως το έντερο και τα μακροφάγα, και αποδίδοντας σίδηρο σε κύτταρα δέκτες, όπως οι ερυθροβλάστες. Υπό φυσιολογικές συνθήκες σιδήρου, η TRF ορού είναι κορεσμένη κατά το 1/3 περίπου της συνολικής σιδηροδεσμευτικής της χωρητικότητας, έτσι ώστε να έχουμε ένα μείγμα αποτρανσφερρίνης, δύο μορφών με ένα άτομο σιδήρου και μίας μορφής με δύο άτομα σιδήρου. Η TRF συντίθεται κυρίως στα ηπατοκύτταρα και σε μικρές ποσότητες στον εγκέφαλο, τους λεμφαδένες, τους όρχεις και τους μαστικούς αδένες, ενώ ο χρόνος ημίσειας ζωής της είναι περίπου 8 ημέρες⁶⁸.

Η TRF ορού είναι ένας δείκτης σιδηροπενίας, αλλά όχι τόσο χρήσιμος όσο η φερριτίνη. Οι συγκεντρώσεις TRF αυξάνονται με τη μείωση των αποθηκών σιδήρου και μειώνονται με την υπερφόρτωση με σίδηρο. Ωστόσο, το επίπεδο TRF δεν είναι ένας σταθερά αξιόπιστος δείκτης, καθώς επηρεάζεται από παράγοντες άλλους από τις μεταβολές στο ισοζύγιο σιδήρου. Η φλεγμονή, η λοίμωξη, η κακοήθεια, η ηπατοπάθεια, το νεφρωσικό σύνδρομο και η υποθρεψία μπορούν να μειώσουν τη συγκέντρωση TRF στον ορό, ενώ η κύηση και τα από του στόματος αντισυλληπτικά την αυξάνουν¹⁶⁴.

Η TIBC αντιστοιχεί στο μέγιστο ποσό σιδήρου που απαιτείται για τον πλήρη κορεσμό της TRF πλάσματος ή ορού. Η συσχέτιση μεταξύ TIBC και TRF θεωρείται γενικά καλή, αλλά παράγοντες μετατροπής μεταξύ των δύο δεικτών, που ανευρίσκονται στη βιβλιογραφία εμφανίζουν μεγάλες διαφορές. Αν και η TIBC είναι φθηνότερη, υπάρχουν μερικά πλεονεκτήματα της TRF. Εξαιτίας της σύνδεσης του σιδήρου σε άλλες πρωτεΐνες του πλάσματος (κυρίως αλβουμίνη), η μέθοδος TIBC γενικά υπερεκτιμά τη σιδηροδεσμευτική ικανότητα, ενώ δεν υπάρχουν και ευρείες τιμές αναφοράς. Αντίθετα, για την TRF είναι διαθέσιμες διεθνώς αποδεκτές τιμές αναφοράς. Υπό το πρίσμα αυτό, συνιστάται περισσότερο ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης TRF, παρά η μέτρηση της TIBC. Ωστόσο, σε πληθυσμούς που χαρακτηρίζονται από εκσεσημασμένη γενετική διακύμανση της TRF (παραλλαγές TF/BC & TF/CD), μπορεί να προτιμηθεί η μέτρηση της TIBC¹⁷⁴.

Αν και η μέτρηση της φερριτίνης ορού είναι η εξέταση εκλογής στη σιδηροπενία, πολλά εργαστήρια συνεχίζουν να προσφέρουν μετρήσεις σιδήρου και TIBC/TRF. Σε μία πρόσφατη μελέτη, οι Hawkins και συν. συγκρίνοντας τη

διαγνωστική χρησιμότητα του σιδήρου, της TRF και του κορεσμού τρανσφερρίνης (Tsat) στη διάγνωση της σιδηροπενίας, ανάμεσα σε εσωτερικούς και εξωτερικούς ασθενείς, βρήκαν ότι η TRF ή η TIBC υπερτερούσαν των μετρήσεων σιδήρου και κορεσμού¹⁷⁵. Οι Shek και συν.¹⁷⁶, σε μία πιο οικονομοτεχνική προσέγγιση της βιοχημικής διάγνωσης της σιδηροπενίας, προτείνουν ότι ο σίδηρος ορού και η TIBC θα πρέπει να γίνονται πρώτα, και ότι η φερριτίνη ορού δε χρειάζεται όταν ο Tsat είναι <16% και η TIBC >70 mmol/L ή όταν ο Tsat είναι ≥22% και η TIBC ≤70 mmol/L. Μία μελέτη από τη Γερμανία¹⁷⁷ που διερεύνησε τη διαγνωστική αξιοπιστία της αυξημένης συγκέντρωσης TRF για τη διάγνωση σιδηροπενίας, έδειξε ευαισθησία 36% και ειδικότητα 97%, ενώ η θετική προγνωστική αξία ήταν 79% και η αρνητική προγνωστική αξία 83%. Τέλος, μία πρόσφατη μελέτη σε 50 ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα, έδειξε περιορισμένη αξία της TIBC στη διάγνωση της σιδηροπενίας¹⁷⁸.

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι ο δείκτης TRF/TIBC είναι ανώτερος του σιδήρου ή του Tsat, αλλά όχι καλύτερος από τη φερριτίνη στη διάγνωση της σιδηροπενίας. Σε κάθε περίπτωση, η TRF/TIBC θα πρέπει να χρησιμοποιείται με επιφύλαξη και μόνο σε συνδυασμό με άλλες δοκιμασίες σιδήρου, για να επιτευχθεί η υψηλότερη διαγνωστική ακρίβεια. Σε ασθενείς με ΙΦΕΝ, έχει προταθεί να συμπεριλαμβάνεται η TRF, μεταξύ άλλων παραμέτρων, στην πιο αναλυτική διερεύνηση της αναιμίας, όταν ο βασικός έλεγχος (φερριτίνη, Tsat, CRP) δε μπορεί να αναδείξει την αιτία της αναιμίας¹³. Επιπροσθέτως, τα επίπεδα TRF μπορούν, σε συνδυασμό με άλλους δείκτες (ερυθροποιητίνη, STfR), να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη περιπτώσεων μη ανταπόκρισης σε μονοθεραπεία με ενδοφλέβιο σίδηρο, και που θα μπορούσαν να ωφεληθούν από τη συνδυασμένη θεραπεία με παράγοντες που διεγείρουν την ερυθροποίηση¹⁷⁹.

4.1.4. Κορεσμός τρανσφερρίνης (transferrin saturation, Tsat)

Ο Tsat είναι ένας δείκτης που εκφράζεται ως ποσοστό % και είναι το πηλίκο της συγκέντρωσης σιδήρου (μmol/L)/TRF (mg/dl) στον ορό ή στο πλάσμα X 70.9 (σε δείγμα αίματος νηστείας)¹⁸⁰:

$$\text{Tsat (\%)} = \frac{\text{Fe} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}} \right)}{\text{TRF} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dl}} \right)} \times 70.9$$

Ο Tsat είναι μία μέτρηση του περιεχομένου σε σίδηρο της κυκλοφορούσας TRF. Φυσιολογικά, σε 100 ml ορού υπάρχει αρκετή TRF ώστε να δεσμεύσει 250 έως 450 μg

(4.4 έως 8.0 μmol) σιδήρου. Επειδή η φυσιολογική συγκέντρωση σιδήρου είναι περίπου 1.8 $\mu\text{mol/dl}$ (100 $\mu\text{g/dl}$), η TRF μπορεί να κορεσθεί με σίδηρο κατά το 1/3. Η TRF φυσιολογικά είναι κορεσμένη με σίδηρο κατά 20 με 50%. Μία φυσιολογική τιμή Tsat συχνά συνοδεύει μία χαμηλή συγκέντρωση σιδήρου, στην AXN. Ωστόσο, οι εξαιρέσεις είναι τόσο συχνές, που μειώνουν δραματικά τη διαγνωστική αξία του Tsat¹⁵⁶.

Τιμή Tsat<16% υποδηλώνει ανεπαρκή παροχή σιδήρου για ερυθροποίηση. Ελαττωμένος Tsat έχει σχετικά υψηλή ευαισθησία (90%) αλλά σχετικά χαμηλή ειδικότητα (40-50%) στην αναγνώριση της σιδηροπενίας¹⁸¹. Ο υπολογισμός του Tsat παρέχει μόνο μία έμμεση ένδειξη της έκτασης της χρήσης σιδήρου στο μυελό των οστών και δεν παρέχει καμία πληροφορία για την κατάσταση των αποθηκών σιδήρου. Καθώς ο Tsat υπόκειται σε συγκεκριμένες κικαδίες διακυμάνσεις, η μέτρησή του θα πρέπει πάντοτε να γίνεται την ίδια ώρα της ημέρας και να επαναλαμβάνεται πολλές φορές¹⁸⁰. Ο Tsat εμφανίζει επίσης μία αντιδραστικότητα οξείας φάσεως καθώς η TRF μπορεί να αυξηθεί σε φλεγμονή, πράγμα που θα ελάττωνε τον Tsat, εάν ο σίδηρος της κυκλοφορίας διατηρούνταν σταθερός. Μειωμένη σύνθεση TRF σε καταστάσεις υποθρεψίας και χρόνιας νόσου έχει σαν αποτέλεσμα αυξημένο Tsat¹⁸¹.

Σε τρεις μελέτες¹⁸²⁻¹⁸⁴ που εξέτασαν τη χρήση του Tsat σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια, με τιμές αποκοπής ανάμεσα σε 19 και 21%, η ευαισθησία στη διάγνωση σιδηροπενίας ήταν 59-88% και η ειδικότητα 63-78%, υποδηλώνοντας έτσι ότι μόνο λίγοι ασθενείς με αληθή σιδηροπενία έχουν Tsat>20%¹⁸¹. Στις κατευθυντήριες οδηγίες για τη διάγνωση της αναιμίας στις ΙΦΕΝ, ο Tsat συμπεριλαμβάνεται στο βασικό έλεγχο, μαζί με τη φερριτίνη και τη CRP. Χρησιμοποιείται, σε συνδυασμό με τη φερριτίνη, ως το κατώτερο όριο αποκοπής (Tsat<16%) στα διαγνωστικά κριτήρια για τη ΣΠΑ (όταν η φερριτίνη είναι <30 $\mu\text{g/L}$) ή για την AXN (όταν η φερριτίνη είναι >100 $\mu\text{g/L}$). Ένα επίπεδο Tsat μεταξύ 16-50% υποδηλώνει επαρκείς αποθήκες σιδήρου, ενώ τιμή >50% είναι συμβατή δυνητικά με υπερφόρτωση σιδήρου¹³.

4.1.5. Διαλυτοί υποδοχείς τρανσφερρίνης (soluble transferrin receptors, sTfR)

Ο σίδηρος του ορού, υπό μορφή TRF με δύο άτομα σιδήρου, διανέμεται στα κύτταρα μέσω του κύκλου της TRF προς το κύτταρο, ο οποίος περιλαμβάνει τον υποδοχέα τρανσφερρίνης (TfR1), ένα ομοδιμερές που ενώνεται με δισουλφιδικούς δεσμούς και αποτελείται από δύο όμοιες γλυκοζυλιωμένες υπομονάδες. Κάθε υπομονάδα μπορεί να δεχθεί ένα μόριο TRF με δύο άτομα σιδήρου. Το πλήθος των διαλυτών υποδοχέων τρανσφερρίνης (sTfR) αντανακλά τις κυτταρικές ανάγκες για

σίδηρο, και ποικίλει τόσο λειτουργικά ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, όσο και ανάλογα με τη μορφολογική εξέλιξη του κυττάρου. Ενώ οι πρώιμοι νορμοβλάστες έχουν περίπου 300000 υποδοχείς TRF, την περίοδο αιχμής της σύνθεσης αίμης, στους ενδιάμεσους νορμοβλάστες, ο αριθμός αυτός αυξάνεται στις 800000/κύτταρο. Ο διαλυτός υποδοχέας φαίνεται ότι είναι μία «κολοβή» μορφή του κυτταρικού υποδοχέα και είναι προσδεμένος στην TRF⁶⁸.

Στη ΣΠΑ ο αριθμός των TfR αυξάνεται σημαντικά. Τμήμα του TfR απορρίπτεται στο πλάσμα, όπου η συγκέντρωσή του μπορεί να μετρηθεί ανοσολογικά και χρησιμοποιείται ως δείκτης σιδηροπενίας. Ο δείκτης αυτός μοιάζει ιδιαίτερα χρήσιμος για τη διάγνωση σιδηροπενίας σε ασθενείς με λοίμωξη, φλεγμονή ή κακοήθεια, στους οποίους η φερριτίνη ορού δεν είναι καλός δείκτης ΣΠΑ¹⁶⁴. Η συγκέντρωση των sTfR στον ορό είναι δείκτης της παροχής σιδήρου για ερυθροποίηση. Οι sTfR αντανακλούν την ερυθροποίηση και αντιστρόφως το ποσό του σιδήρου που είναι διαθέσιμο για ερυθροποίηση^{180,185-187}.

Αντίθετα με τη φερριτίνη και την TRF, η χρόνια φλεγμονή και η ηπατική βλάβη δεν έχουν καμία επίδραση στους sTfR, γεγονός που τους κάνει πολύ πιο αξιόπιστη παράμετρο από τη φερριτίνη για τη διάγνωση σιδηροπενίας σε ασθενείς με ΙΦΕΝ^{180,181}. Ωστόσο, οι Fernandez-Rodriguez και συν.¹⁸⁸ βρήκαν ότι οι sTfR είναι λιγότερο ακριβείς από τη φερριτίνη, σε τέτοιες συνθήκες. Ανακοίνωσαν για τους sTfR ευαισθησία 70% και ειδικότητα 59%, με όριο αποκοπής 2,6 mg/L. Οι Tessitore και συν.¹⁸³ ανακοίνωσαν ευαισθησία 81% και ειδικότητα 71%, με όριο αποκοπής 1,5 mg/L. Ο λόγος sTfR/log ferritin έχει επίσης προταθεί ως ικανός να διαχωρίσει ακριβέστερα την ΣΠΑ από την AXN ή να εκτιμήσει το προφίλ σιδήρου σε ασθενείς με αναιμία μικτού τύπου¹⁸⁷. Σε μία άλλη μελέτη¹⁸⁹ με 176 ασθενείς (51,1% με AXN και 48,8% με ΣΠΑ), τόσο η ευαισθησία, όσο και η ειδικότητα των sTfR στη ΣΠΑ ήταν 100%, ενώ στην AXN ήταν 66,6% και 100%, αντίστοιχα. Η θετική και αρνητική προγνωστική αξία στην περίπτωση της ΣΠΑ ήταν 100%, ενώ στην AXN ήταν 100% και 74.1% αντίστοιχα, συμπεραίνοντας ότι οι sTfR είναι ένας αξιόπιστος δείκτης ΣΠΑ και χρήσιμος στο διαχωρισμό ΣΠΑ από AXN. Τα ευρήματα αυτά είναι σε συμφωνία με μία άλλη πρόσφατη μελέτη¹⁹⁰, όπου βρέθηκε ότι τα επίπεδα sTfR μπορούν να διαχωρίσουν τη ΣΠΑ, την AXN και την AXN+ΣΠΑ, παρέχοντας έτσι μία μη επεμβατική εναλλακτική λύση στο σίδηρο του μυελού των οστών. Η υψηλή διαγνωστική δύναμη των sTfR και του λόγου sTfR/log ferritin στο διαχωρισμό ΣΠΑ από AXN και μικτή αναιμία έχει προταθεί από διάφορες μελέτες, σε διαφορετικές ομάδες ασθενών^{14,191}.

Αυξημένες συγκεντρώσεις sTfR παρατηρούνται σε άλλες διαταραχές της ερυθροποίησης, όπως η αιμολυτική αναιμία, η θαλασσαιμία και η πολυκυτταραιμία, ενώ μειώνονται στην απλαστική αναιμία και άλλες καταστάσεις υποπλαστικής (hypoproliferative) ερυθροποίησης, όπως η αναιμία της νεφρικής νόσου¹⁸⁰. Τα μέσα επίπεδα sTfR στον ορό υγιών ατόμων είναι 5 ± 1 mg/L, όμως οι διάφορες τεχνικές μέτρησης δίνουν διαφορετικές τιμές, εξαιτίας της έλλειψης ενός διεθνούς προτύπου¹⁸⁶. Ο πιο σημαντικός παράγοντας καθορισμού των επιπέδων sTfR φαίνεται να είναι η ερυθροποιητική δραστηριότητα του μυελού, η οποία μπορεί να δημιουργήσει διακυμάνσεις από 8 φορές κάτω έως και 20 φορές πάνω από τις μέσες φυσιολογικές τιμές. Η μέτρηση των sTfR είναι πολύ χρήσιμη στη διερεύνηση της παθοφυσιολογίας της αναιμίας, ποσοτικοποιώντας τον απόλυτο ρυθμό της ερυθροποίησης και την επάρκεια της πολλαπλασιαστικής ικανότητας του μυελού για κάθε δεδομένο βαθμό αναιμίας, και στην παρακολούθηση της ερυθροποιητικής απάντησης σε διάφορες μορφές θεραπείας, ιδιαίτερα επιτρέποντας την πρώιμη πρόβλεψη της ανταπόκρισης, όταν οι μεταβολές στην αιμοσφαιρίνη δεν είναι ακόμη εμφανείς¹⁸⁶. Συμπερασματικά, οι sTfR αποτελούν μία πολύτιμη ποσοτική μέθοδο εκτίμησης της ερυθροποιητικής ικανότητας του μυελού και έναν δείκτη της ιστικής σιδηροπενίας, με τον περιορισμό ότι η μέθοδος δεν είναι ευρέως διαθέσιμη και προτυποποιημένη, γεγονός που εμποδίζει την ευρεία κλινική εφαρμογή της.

4.2. Δείκτες ρυθμιστών μεταβολισμού του σιδήρου

4.2.1. *Hepcidin*

Η βιβλιογραφία σχετικά με το ρόλο της hepcidin στους μηχανισμούς αναιμίας στις ΙΦΕΝ είναι μάλλον περιορισμένη και όχι ξεκάθαρη (πίνακας 1). Σε μία μελέτη με 19 ασθενείς με NC βρέθηκε ότι υπήρχε θετική συσχέτιση των επιπέδων hepcidin στα ούρα με τα επίπεδα IL-6 και CRP¹⁹². Αντίθετα, σε μία άλλη μελέτη από το HB¹⁹³, με 61 ασθενείς και 25 υγιείς μάρτυρες, βρέθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων hepcidin ορού- αν και συσχετιζόνταν θετικά με την IL-6- σε ασθενείς με ΙΦΕΝ, με ή χωρίς αναιμία, συγκριτικά με τους υγιείς μάρτυρες. Στη μελέτη αυτή υπήρχε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στη φερριτίνη και τη hepcidin σε ασθενείς με ΙΦΕΝ, ενώ δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση ανάμεσα στον sTfR και τη hepcidin. Σε μία μεγαλύτερη μελέτη¹⁹⁴ με 100 ασθενείς με ΙΦΕΝ (30 με ΣΠΑ) και 102 υγιείς μάρτυρες, τα μέσα επίπεδα hepcidin ορού ήταν σημαντικά υψηλότερα σε ασθενείς με ΕΚ & NC, σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες ($P < 0.0001$). Οι ασθενείς με ΙΦΕΝ και ΣΠΑ είχαν χαμηλότερα επίπεδα hepcidin, συγκριτικά με εκείνους χωρίς ΣΠΑ, αν και η διαφορά δεν ήταν στατιστικώς σημαντική ($P = 0.09$). Η hepcidin είχε σημαντική αρνητική συσχέτιση με τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης και θετική συσχέτιση με τη φερριτίνη και τη CRP. Μετά από προσαρμογή και με άλλες παραμέτρους, οι παράμετροι που σχετίζονταν με τη hepcidin ορού στο τελικό μοντέλο ήταν η φερριτίνη ορού ($P = 0.0008$) και η ενεργότητα της νόσου στην ΕΚ ($P = 0.004$). Η ευαισθησία της χαμηλής hepcidin για τη διάγνωση αναιμίας ήταν 71% και η ειδικότητα 43%. Παρομοίως, η ευαισθησία της χαμηλής hepcidin για τη διάγνωση της ΣΠΑ ήταν 81% και η ειδικότητα 45%.

Πρέπει να αναφερθεί ότι επί του παρόντος δεν υπάρχει μέθοδος αναφοράς για τη μέτρηση της hepcidin. Σε μία πρόσφατη πολυκεντρική μελέτη¹⁹⁵, τα επίπεδα hepcidin που προέκυψαν από διάφορες μεθόδους ποικίλλουν σημαντικά, όμως η αναλυτική διακύμανση είναι γενικά χαμηλή και παρόμοια για όλες τις μεθόδους.

4.2.2. *Prohepcidin*

Η prohepcidin είναι μία πρόιμη μορφή της hepcidin, μεγέθους 60 αμινοξέων. Τα επίπεδα prohepcidin στον ορό έχουν αμφιλεγόμενη κλινική σημασία, καθώς έχει βρεθεί ότι παρουσιάζουν μεγάλη διακύμανση σε φυσιολογικές καταστάσεις¹⁹⁶ και δε συσχετίζονται με τις αναμενόμενες αντιδράσεις της hepcidin στα φυσιολογικά σχετικά ερεθίσματα¹⁹⁷.

| Author (reference) | Study design | Disease (N) HC (N) | Results |
|-------------------------------------|-------------------------------|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Semrin et al. ⁶⁹ | Urine hepcidin measurement | CD (19) | Increased levels in active disease positively correlated with IL-6 and CRP |
| Arnold et al. ⁷⁰ | Serum hepcidin measurement | UC (51) CD (10) HC (25) | Decreased levels positively correlated with IL-6 |
| Oustamanolakis et al. ⁷¹ | Serum hepcidin measurement | UC (49) CD (51) HC (102) | Increased levels positively correlated with ferritin and disease activity (for UC) |
| Kaya et al. ⁷⁶ | Serum prohepcidin measurement | Pediatric IBD (15) | Increased levels positively correlated CRP |
| Nagy et al ⁷⁷ | Serum prohepcidin measurement | UC (72) CD (30) HC (28) | No significant different compared with controls |
| Oustamanolakis et al ⁷¹ | Serum prohepcidin measurement | UC (49) CD (51) HC (102) | Decreased levels not correlated with ferritin or disease activity |

CD, Crohn's disease; UC, ulcerative colitis; HC, healthy controls; CRP, C reactive protein; and IL-6, interleukin-6.

Πίνακας 1. Μελέτες αξιολόγησης της hepcidin & prohepcidin στις ΙΦΕΝ. (Οι αριθμοί αναφορών αναφέρονται στη βιβλιογραφία της πρωτότυπης δημοσίευσης)

Η βιβλιογραφία σχετικά με το ρόλο της prohepcidin στην αναιμία των ασθενών με ΙΦΕΝ είναι πολύ περιορισμένη (πίνακας 1). Οι Kaya και συν. σε μία μικρή μελέτη με 15 παιδιατρικούς ασθενείς με ΙΦΕΝ, αναφέρουν ότι η prohepcidin ορού ήταν σημαντικά αυξημένη και συσχετιζόταν θετικά με τη CRP¹⁹⁸. Σε μία άλλη μεγαλύτερη μελέτη από την Ουγγαρία¹⁹⁹, με 102 ασθενείς με ΙΦΕΝ και 38 υγιείς μάρτυρες (ΥΜ), τα επίπεδα prohepcidin στον ορό δεν είχαν σημαντικές διαφορές, συγκριτικά με εκείνα των ΥΜ. Στους ασθενείς, παρατηρήθηκαν μόνο αδύναμες συσχετίσεις ανάμεσα στα επίπεδα prohepcidin και άλλες διαγνωστικές παραμέτρους: στη ΝC, η prohepcidin συσχετιζόταν θετικά με τα επίπεδα TRF, TIBC, Tsat, με το δείκτη ενεργότητας και την αλβουμίνη ορού, στην ΕΚ τα επίπεδα prohepcidin συσχετιζόταν με εκείνα της TRF και του Tsat, συμπεραίνοντας ότι η μέτρηση των επιπέδων prohepcidin ορού δεν είναι μία ικανοποιητική ή προγνωστική προσέγγιση της αναιμίας των ΙΦΕΝ. Οι Sasu και συν.²⁰⁰ ανακοίνωσαν ότι η prohepcidin δε συσχετιζόταν με τη hepcidin ή την AXN και φαίνεται να είναι ασταθής στον ορό. Στη μελέτη της ομάδας μας¹⁹⁴, τα μέσα επίπεδα prohepcidin ήταν σημαντικά χαμηλότερα σε ασθενείς με ΙΦΕΝ, συγκριτικά με ΥΜ (P=0.03), αλλά όταν εξαιρούνταν οι ασθενείς με ενεργό νόσο, η διαφορά δεν ήταν στατιστικώς σημαντική (P=0.06). Οι ασθενείς με ΙΦΕΝ και ΣΠΑ είχαν χαμηλότερα επίπεδα prohepcidin, συγκριτικά με εκείνους χωρίς ΣΠΑ, αν και η διαφορά δεν ήταν στατιστικώς σημαντική (P=0.17). Τα επίπεδα prohepcidin στον ορό είχαν σημαντική θετική συσχέτιση με τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης και αρνητική συσχέτιση με τα επίπεδα φερριτίνης. Επίσης, βρέθηκε σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ επιπέδων hepcidin και prohepcidin στον ορό ασθενών με ΙΦΕΝ. Μετά από προσαρμογή με άλλες παραμέτρους, τα επίπεδα prohepcidin δε σχετιζόταν με άλλες παραμέτρους.

Φαίνεται ότι τόσο η hepcidin όσο και η prohepcidin συμμετέχουν ενεργά και σημαντικά στην ανάπτυξη αναιμίας στις ΙΦΕΝ, αλλά τα επίπεδά τους από μόνα τους είναι μάλλον ανεπαρκή για χρήση στο διαχωρισμό ΣΠΑ και AXN.

4.3. Δείκτες ερυθροκυττάρων

4.3.1. Εύρος κατανομής των ερυθροκυττάρων (*Red cell Distribution Width, RDW*)

Το RDW υπολογίζεται από ανάλυση του εύρους παλμού (pulse height analysis) στους αιματολογικούς αναλυτές και είναι το εύρος της καμπύλης κατανομής του μεγέθους των ερυθρών αιμοσφαιρίων, εκφρασμένο σε fL στο επίπεδο του 20% του μεγίστου. Το RDW μπορεί επίσης να εκφρασθεί ως CV% (coefficient of variation) των μετρήσεων του όγκου των ερυθρών. Είναι μία ποσοτική μέτρηση της διακύμανσης στο μέγεθος των ερυθρών και είναι ισοδύναμη με την ανισοκυττάρωση που φαίνεται σε μία μικροσκοπική εξέταση δείγματος περιφερικού αίματος²⁰¹. Η προταθείσα ταξινόμηση της αναιμίας βασιζόμενη στο MCV και στο RDW είναι γνωστή επί μακρόν²⁰². Επιπλέον στη μικροκυτταρική, νορμοκυτταρική και μακροκυτταρική αναιμία, η ταξινόμηση αυτή διαχωρίζει περαιτέρω τον πληθυσμό των ερυθρών σε ομοιογενή (με φυσιολογικό RDW) και ανομοιογενή (με αυξημένο RDW). Ο πρώτος περιλαμβάνει την υποπολλαπλασιαστική (hypoproliferative) αναιμία, την απλασία και την ετεροζυγωτία της θαλασσαιμίας, ενώ ο δεύτερος περιλαμβάνει τη διατροφική αναιμία, όπως ανεπάρκεια σιδήρου, B₁₂ και φυλικού οξέος καθώς και τη σιδηροβλαστική αναιμία²⁰³. Ωστόσο, έχει περιγραφεί αύξηση στο RDW σε ασθενείς με αναιμία λόγω χρόνιας λοίμωξης και σε τουλάχιστον του μισούς ετεροζυγώτες θαλασσαιμίας, καθώς επίσης παρατηρούνται φυσιολογικές τιμές RDW στο 15-20% των περιπτώσεων ΣΠΑ²⁰³. Όταν μικροκυττάρωση και μακροκυττάρωση υπάρχουν ταυτόχρονα στο ίδιο δείγμα, οι δύο διαταραχές μπορεί να αλληλοεξουδετερωθούν και να εμφανίσουν φυσιολογικό MCV, ωστόσο, το υψηλό RDW που θα προκύψει θα αναδείξει τη διαταραχή²⁰¹. Υπάρχει μεγάλη διακύμανση στις τιμές του RDW εντός μίας δεδομένης νόσου και αυτό μειώνει τη χρησιμότητά του στη διαφορική διάγνωση, αλλά η σπουδαιότητά του ως γενικός δείκτης διαταραχής, διατηρείται²⁰⁴. Επιπλέον, υπάρχουν σημαντικές αποκλίσεις στις μεθόδους μέτρησης (CV% ή άμεση μέτρηση) και στις τιμές αναφοράς που χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό του RDW²⁰³.

Η βιβλιογραφία σχετικά με την εφαρμογή του RDW στο πεδίο των ΙΦΕΝ είναι μάλλον περιορισμένη. Οι Cakal και συν.²⁰⁵ το 2009 βρήκαν ότι το RDW ήταν σημαντικά αυξημένο σε ασθενείς με ενεργό ΙΦΕΝ, συγκριτικά με εκείνους με ανενεργό νόσο και YM (P<0.05). Σε μία άλλη αναδρομική ανασκόπηση²⁰⁶ 284 ασθενών με ΙΦΕΝ, υπήρχε σημαντική διαφορά στη μέση τιμή RDW ανάμεσα σε NC και EK (14.9 έναντι 14.3, P=0.027), προτείνοντας το RDW ως ένα δείκτη διαχωρισμού μεταξύ NC και EK.

Σε μία μεγάλη μελέτη²⁰⁷ με 100 ασθενείς με ΙΦΕΝ και 102 ΥΜ, το RDW ήταν σημαντικά αυξημένο στους ασθενείς, σε σχέση με τους ΥΜ, ενώ υπήρχε και θετική συσχέτιση με τους sTfR και αρνητική με τον Tsat. Επιπλέον, όταν συγκρίνονταν ασθενείς με ΣΠΑ, με ασθενείς χωρίς ΣΠΑ (δηλ. με αναιμία άλλου τύπου ή απουσία αναιμίας), το RDW ήταν σημαντικά διαφορετικό ανάμεσα στις δύο ομάδες. Η υψηλή τιμή RDW (>14) ήταν ανάμεσα στους καλύτερους δείκτες για τη διάγνωση της ΣΠΑ, με ευαισθησία 93% και ειδικότητα 81%. Αναφορικά με την ενεργότητα της νόσου, το RDW δεν εμφάνιζε σημαντική συσχέτιση με κλινικούς δείκτες ενεργότητας της νόσου ή με τα επίπεδα CRP.

4.3.2. Ποσοστό υπόχρωμων ερυθροκυττάρων

Το επί τοις εκατό ποσοστό των υπόχρωμων ερυθροκυττάρων ορίζεται ως τα κύτταρα με ενδοκυττάρια αιμοσφαιρίνη <28 gr/dl²⁰⁸. Σε υγιή πληθυσμό, το ποσοστό αυτό δεν ξεπερνά το 2.5% και τιμές υψηλότερες είναι ενδεικτικές ερυθροποίησης υπό ανεπάρκεια σιδήρου²⁰⁹. Το ποσοστό των υπόχρωμων ερυθροκυττάρων είναι η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης σε μεμονωμένα κύτταρα μάλλον, παρά ένας μέσος όρος, όπως είναι η μέση αιμοσφαιρίνη των ερυθρών (MCH, mean cell hemoglobin) ή η μέση συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης των ερυθρών (MCHC, mean cell hemoglobin concentration). Είναι ένας ευαίσθητος δείκτης επειδή μικρές μεταβολές στον αριθμό των ερυθρών με ανεπαρκή αιμοσφαιρίνη μπορούν να ανιχνευθούν προ της εμφάνισης αλλαγών στην MCHC²⁰¹. Μερικοί αιματολογικοί αναλυτές μπορούν να μετρήσουν την παράμετρο αυτή, όμως έχει υπάρξει η αμφισβήτηση ότι καθώς τα ώριμα ερυθρά έχουν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής, το ποσοστό των υπόχρωμων ερυθρών ενσωματώνει δεδομένα από ιδιαίτερα μακρά περίοδο και έτσι μπορεί να είναι λιγότερο ευαίσθητος δείκτης από την αιμοσφαιρίνη των δικτυοερυθροκυττάρων (ΔΕΚ), στη διάγνωση της λειτουργικής ΣΠΑ ή στην παρακολούθηση της θεραπείας της αναιμίας²⁰¹. Άλλες μελέτες υποστηρίζουν ότι το ποσοστό αυτό είναι αρκετά ευαίσθητος δείκτης για τη διάγνωση της λειτουργικής ΣΠΑ²¹⁰. Επιπλέον, η χρησιμότητα της μεθόδου περιορίζεται από το γεγονός ότι το ποσοστό των υπόχρωμων ερυθρών εξαρτάται από το συνολικό αριθμό ερυθροκυττάρων, ο οποίος μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με το χρόνο διατήρησης του δείγματος. Επί του παρόντος, δεν υπάρχουν μελέτες που να διερευνούν το ρόλο του δείκτη αυτού στις ΙΦΕΝ.

4.3.3. Ψευδαργυρική πρωτοπορφυρίνη των ερυθροκυττάρων (*Erythrocyte Zinc ProtoPorphyrin, EZPP*)

Στη ΣΠΑ και τη δηλητηρίαση με μόλυβδο, το ένζυμο ferrochelatase καταλύει την ενσωμάτωση ψευδαργύρου (Zinc, Zn), αντί σιδήρου, στην πρωτοπορφυρίνη IX (τον ενδιάμεσο πρόγονο της αίμης), οδηγώντας στο σχηματισμό ψευδαργυρικής πρωτοπορφυρίνης (EZPP). Καθώς τα επίπεδα EZPP αντανakλούν τα επίπεδα σιδήρου στο μυελό κατά την ερυθροποίηση, τιμές EZPP >40 $\mu\text{mol/mol}$ αιμοσφαιρίνης έχει δειχθεί ότι αντικατοπτρίζουν καλά τη σοβαρότητα της ΣΠΑ, έχοντας τη δυνατότητα να ξεχωρίσουν την υποκλινική ΣΠΑ χωρίς συμπτώματα (EZPP: 40-60 $\mu\text{mol/mol}$ αιμοσφαιρίνης) από τη ΣΠΑ με κλινικά συμπτώματα (EZPP>80 $\mu\text{mol/mol}$ αιμοσφαιρίνης)¹⁸⁰. Η EZPP είναι χρήσιμη και στη διάγνωση της AXN²¹¹. Ωστόσο, καθώς η ένδεια ψευδαργύρου δεν είναι ασυνήθης στις φλεγμονώδεις παθήσεις²¹², η ερμηνεία των επιπέδων EZPP στις ΙΦΕΝ, θα πρέπει να γίνεται με προσοχή και επιφύλαξη.

4.4. Δείκτες δικτυοερυθροκυττάρων (ΔΕΚ)

4.4.1. Μέσος όγκος ΔΕΚ (*Mean Reticulocyte Volume, MRV*)

Η βιβλιογραφία σχετικά με την κλινική εφαρμογή του MRV είναι πολύ περιορισμένη. Υπάρχουν στοιχεία ότι ο MRV αυξάνεται μετά τη θεραπεία υποκατάστασης με σίδηρο, σε ασθενείς με ΣΠΑ και ελαττώνεται με την ανάπτυξη ερυθροποίησης υπό ένδεια σιδήρου. Επίσης, ο MRV μειώνεται και τα ΔΕΚ είναι μικρότερα από τα ώριμα ερυθρά, μετά από θεραπεία με βιταμίνη B₁₂ ή φυλικό οξύ²⁰¹. Ωστόσο, υπάρχουν περιορισμοί στη χρήση του MRV καθώς δεν υπάρχει προτυποποίηση, που σημαίνει ότι αριθμητικά αποτελέσματα από διαφορετικούς κατασκευαστές δεν είναι συγκρίσιμα και δεν υπάρχει διαθέσιμο υλικό ποιοτικού ελέγχου.

4.4.2. Συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης των δικτυοερυθροκυττάρων (*Hemoglobin concentration of reticulocytes, CHr*)

Κατά τη δεκαετία του 1990, μερικοί αιματολογικοί αναλυτές νέας τεχνολογίας έκαναν εφικτό τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης αιμοσφαιρίνης των ΔΕΚ (CHr). Η CHr μετράται σε βαμμένα ΔΕΚ με τη μέθοδο διασποράς διπλής γωνίας του φωτός (two angle light scatter). Η μέση τιμή αναφοράς σε υγιή πληθυσμό είναι 30.8 pg, με την ίδια τιμή για άνδρες και γυναίκες, και το κατώτερο φυσιολογικό όριο τα 28 pg²⁰¹. Η CHr αποτελεί μία έμμεση μέτρηση του διαθέσιμου λειτουργικού σιδήρου για παραγωγή νέων ερυθρών κατά τις προηγούμενες 3-4 ημέρες και επίσης αποτελεί και μία πρόιμη μέτρηση της ανταπόκρισης στη σιδηροθεραπεία, καθώς αυξάνεται εντός 2-4 ημερών από την έναρξη χορήγησης ενδοφλέβιου σιδήρου²⁰¹. Είναι ένας πρόιμος δείκτης ερυθροποίησης υπό ένδεια σιδήρου, σε ασθενείς που λαμβάνουν θεραπεία με ερυθροποιητίνη. Αυτοί οι ασθενείς μπορεί να έχουν λειτουργική ΣΠΑ και ανταποκρίνονται σε σιδηροθεραπεία, ακόμη και με πολύ υψηλές τιμές φερριτίνης ορού. Μελέτες που εξετάζουν τη χρήση της CHr για το χειρισμό σιδηροθεραπείας σε τέτοιους πληθυσμούς ασθενών, έδειξαν ότι μία τιμή <28 pg προβλέπει τη λειτουργική ΣΠΑ με περισσότερη ακρίβεια, συγκριτικά με τη φερριτίνη και τον Tsat, καθώς επίσης ότι ελαττώνει την άσκοπη έκθεση των ασθενών αυτών στον ενδοφλέβιο σίδηρο²⁰¹.

Αν και δεν υπάρχουν μελέτες αξιολόγησης της CHr σε ασθενείς με ΙΦΕΝ και λαμβάνοντας υπόψη τη διαγνωστική δυσκολία εξαιτίας της μικτής αναιμίας (ΣΠΑ & AXN) σε τέτοιους ασθενείς, φαίνεται ότι η CHr θα μπορούσε να αποτελέσει έναν

αξιόπιστο δείκτη για τη μέτρηση της ανταπόκρισης σε θεραπεία υποκατάστασης με σίδηρο, με ή χωρίς ερυθροποιητίνη. Απαιτούνται μεγάλες μελέτες για την επιβεβαίωση της υπόθεσης αυτής σε τέτοιους ασθενείς.

4.4.3. Κλάσμα ανώριμων δικτυοερυθροκυττάρων (*Immature Reticulocyte Fraction, IRF*)

Το IRF αντιστοιχεί σε ένα λιγότερο ώριμο υποπληθυσμό των ΔΕΚ, ο οποίος περιέχει περισσότερο RNA, και είναι ένας πρώιμος και ευαίσθητος δείκτης ερυθροποίησης²¹³. Τα ανώριμα ΔΕΚ απελευθερώνονται στην περιφερική κυκλοφορία κατά τις περιόδους έντονης διέγερσης της ερυθροποίησης, όπως αιμορραγία, συγκεκριμένες αναιμίες ή ως απάντηση σε θεραπεία διέγερσης της παραγωγής του μυελού²⁰¹. Το IRF αυξάνεται πριν την αύξηση των ΔΕΚ και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση της αναγέννησης του μυελού ή των stem cells, μετά από μεταμόσχευση ή χημειοθεραπεία. Το IRF είναι χρήσιμο στο διαχωρισμό αναιμιών με αυξημένη ερυθροποίηση στο μυελό (υψηλά ΔΕΚ, υψηλό IRF) από αναιμίες λόγω μειωμένης δραστηριότητας του μυελού (χαμηλά ΔΕΚ, χαμηλό IRF) καθώς και από καταστάσεις όπως οξείες λοιμώξεις και μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (χαμηλά/φυσιολογικά ΔΕΚ, υψηλό IRF). Η καλύτερη κλινική εφαρμογή του IRF, ειδικά στην κατάταξη των αναιμιών βάσει της απάντησης του μυελού, βρίσκεται χρησιμοποιώντας έναν δισδιάστατο πίνακα του IRF έναντι του απόλυτου αριθμού των ΔΕΚ²⁰³.

Μία πρόσφατη μελέτη αξιολόγησης του IRF σε ασθενείς με ΙΦΕΝ²⁰⁷, έδειξε σημαντικά αυξημένο IRF σε ασθενείς συγκριτικά με YM ($P < 0.0001$), αν και στις δύο ομάδες ήταν εντός των φυσιολογικών ορίων, βάσει του εύρους του κατασκευαστή (0.2-0.4). Δε βρέθηκε διαφορά μεταξύ ΕΚ και ΝΚ. Δεν υπήρχε σημαντική συσχέτιση μεταξύ IRF και φερριτίνης, Tsat ή sTfR. Επιπλέον, δε βρέθηκαν διαφορές στο IRF μεταξύ ασθενών με ΣΠΑ και ασθενών χωρίς ΣΠΑ. Ανιχνεύθηκε μία τάση συσχέτισης μεταξύ IRF και επιπέδων CRP, αν και δεν ήταν στατιστικώς σημαντική ($r=0.18$, $p=0.06$). το υψηλότερο IRF σε ασθενείς συγκριτικά με YM μπορεί να αποδοθεί στη συνεχή απώλεια αίματος στους ασθενείς με ΙΦΕΝ, συχνά υποκλινική, σαν αποτέλεσμα της χρόνιας φλεγμονής στο έντερο, οδηγώντας έτσι σε αυξημένη ανάγκη ερυθροποίησης στο μυελό, ακόμη και υπό συνθήκες χαμηλής διαθεσιμότητας σιδήρου, εξαιτίας της διαταραγμένης απορρόφησης σιδήρου.

Περιορισμοί του IRF είναι η μη προτυποποίηση, η εξάρτηση των τιμών αναφοράς από τη μέθοδο, καθώς και το γεγονός ότι η ευαισθησία είναι χαμηλότερη σε αναλυτές που δε βασίζονται στην τεχνική του φθορισμού (non-fluorescence-based analyzers)²⁰³. Αυτό καθιστά το IRF έναν δείκτη μάλλον περιορισμένης χρησιμότητας στην αξιολόγηση της αναιμίας των ΙΦΕΝ.

4.4.4. Red blood cell Size Factor (RSF)

Ο RSF είναι ένας δείκτης νέας γενιάς και είναι το αποτέλεσμα της τετραγωνικής ρίζας του γινομένου [MCV X MRV]:

$$RSF (fL) = \sqrt{MCV \times MRV}$$

Φαίνεται ότι ο RSF είναι ένας κατάλληλος δείκτης για τη μελέτη της ερυθροποιητικής δραστηριότητας του μυελού, καθώς παρουσιάζει υψηλό επίπεδο συμφωνίας με τη CHr, όμως η βιβλιογραφία είναι πολύ περιορισμένη. Υπάρχουν δεδομένα σημαντικής συσχέτισης με τη CHr και άριστης διαγνωστικής απόδοσης του RSF, συγκριτικά με τη CHr, στη διάγνωση του τύπου της αναιμίας²¹⁴. Φαίνεται ότι το βέλτιστο όριο αποκοπής είναι τα 87.7 fL, που δίνουν ευαισθησία 99.4%, ειδικότητα 90.6% και AUC (area under the curve) 0.983, για την ανίχνευση ανεπαρκούς ερυθροποίησης, και καλύτερη αποτελεσματικότητα από τη CHr (88.1%, 91%, 0.966, αντίστοιχα). Έχει επίσης παρατηρηθεί σημαντική συσχέτιση ($r=0.8184$) μεταξύ RSF και του ισοδύναμου αιμοσφαιρίνης των ΔΕΚ (reticulocyte hemoglobin equivalent, Ret He), όσον αφορά τη διάγνωση της ανεπαρκούς ερυθροποίησης: με όριο αποκοπής του RSF τα 91.1 fL, η AUC ήταν 0.963, η ευαισθησία 91.7% και η ειδικότητα 88.5%²¹⁵.

Σε μία πρόσφατη μελέτη²⁰⁷ 100 ασθενών με ΙΦΕΝ, ο RSF εμφάνιζε σημαντική θετική συσχέτιση με τον Tsat και αρνητική με τους sTfR. Ήταν επίσης σημαντικά χαμηλότερος σε ασθενείς με ΣΠΑ, συγκριτικά με ασθενείς με αναιμία άλλου τύπου ή χωρίς αναιμία. Οι χαμηλές τιμές RSF ήταν μεταξύ των καλύτερων δεικτών διάγνωσης σιδηροπενίας, με ευαισθησία 83% και ειδικότητα 82%. Αντίθετα, αναφορικά με την ενεργότητα της νόσου, ο RSF δε διέφερε σημαντικά ανάμεσα σε ενεργό και μη-ενεργό νόσο και δεν υπήρχε σημαντική συσχέτιση με τα επίπεδα CRP. Βάσει των δεδομένων αυτών, φαίνεται ότι ο RSF είναι ένας ευαίσθητος δείκτης πραγματικού χρόνου (real time) για την πρόιμη ανίχνευση διαταραχών των ερυθροποιητικών μηχανισμών στη λειτουργική ΣΠΑ, ασθενών με ΙΦΕΝ.

4.4.5. Εύρος κατανομής δικτυοερυθροκυττάρων (*Reticulocyte Distribution Width, RDWR*)

Το RDWR είναι ένας νέας γενιάς δείκτης των ΔΕΚ, που υπολογίζεται αυτόματα σε αιματολογικούς αναλυτές νέας τεχνολογίας. Μπορεί να αποδοθεί είτε ως RDWR-CV (Coefficient of variation), είτε ως RDWR-SD (Standard deviation). Το RDWR-SD είναι το γινόμενο της τυπικής απόκλισης του όγκου των ΔΕΚ με τον συντελεστή όγκου (volume factor) και εκφράζεται σε femptoliters (fL). Το RDWR-CV είναι ο λόγος του RDWR-SD/MRV, πολλαπλασιασμένος επί 100, και εκφράζεται ως ποσοστό επί τοις εκατό:

$$\text{RDWR-CV (\%)} = \frac{\text{RDWR-SD}}{\text{MRV}} \times 100$$

Και οι δύο δείκτες εξάγονται από το ιστόγραμμα των ΔΕΚ. Το RDWR αποτελεί μία ένδειξη της διασποράς μεγέθους εντός του πληθυσμού των ΔΕΚ²¹⁶.

Μία πρόσφατη μελέτη²⁰⁷ αξιολόγησε τους δύο αυτούς δείκτες στη διάγνωση της αναιμίας των ΙΦΕΝ. Οι δύο δείκτες βρέθηκαν σημαντικά αυξημένοι σε ασθενείς με NC και ΕΚ, σε σχέση με ΥΜ ($p < 0.0001$). Υπήρχε σημαντική συσχέτιση του RDWR-CV, αρνητική με τον Tsat και θετική με τους sTfR. Επιπλέον, το RDWR-CV ήταν σημαντικά υψηλότερο σε ασθενείς με ΣΠΑ, συγκριτικά με ασθενείς με αναιμία άλλου τύπου ή χωρίς αναιμία. Η ευαισθησία των υψηλών τιμών RDWR-CV για τη διάγνωση ΣΠΑ ήταν 60% και η ειδικότητα 51%. Βρέθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ ενεργού και μη-ενεργού νόσου, τόσο για το RDWR-CV όσο και για το RDWR-SD ($p < 0.05$). Επιπλέον, υπήρχε σημαντική συσχέτιση των δύο δεικτών με τη CRP. Ως εκ τούτου, φαίνεται ότι το RDWR-CV είναι ένας ευαίσθητος δείκτης διασποράς του πληθυσμού των ΔΕΚ, αντιστοιχώντας σε μία παρακολούθηση πραγματικού χρόνου της παραγωγής ΔΕΚ, πέρα από το εδραιωμένο ποσοστό των ΔΕΚ, το οποίο αντικατοπτρίζει μία μοναδική χρονική στιγμή της ζωής των ΔΕΚ. Κατά κάποιο τρόπο, το ποσοστό των ΔΕΚ και το RDWR είναι για τα ΔΕΚ ό,τι το RBC και το RDW για τα ερυθρά. Επιπροσθέτως, είναι εντυπωσιακή η συσχέτιση των δύο δεικτών με την ενεργότητα της νόσου και τη CRP, ένα εύρημα που φαίνεται πολλά υποσχόμενο, στη βάση ότι αυτοί οι δείκτες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με άλλους, για το διαχωρισμό της υποομάδας των ασθενών με αμιγώς ΣΠΑ.

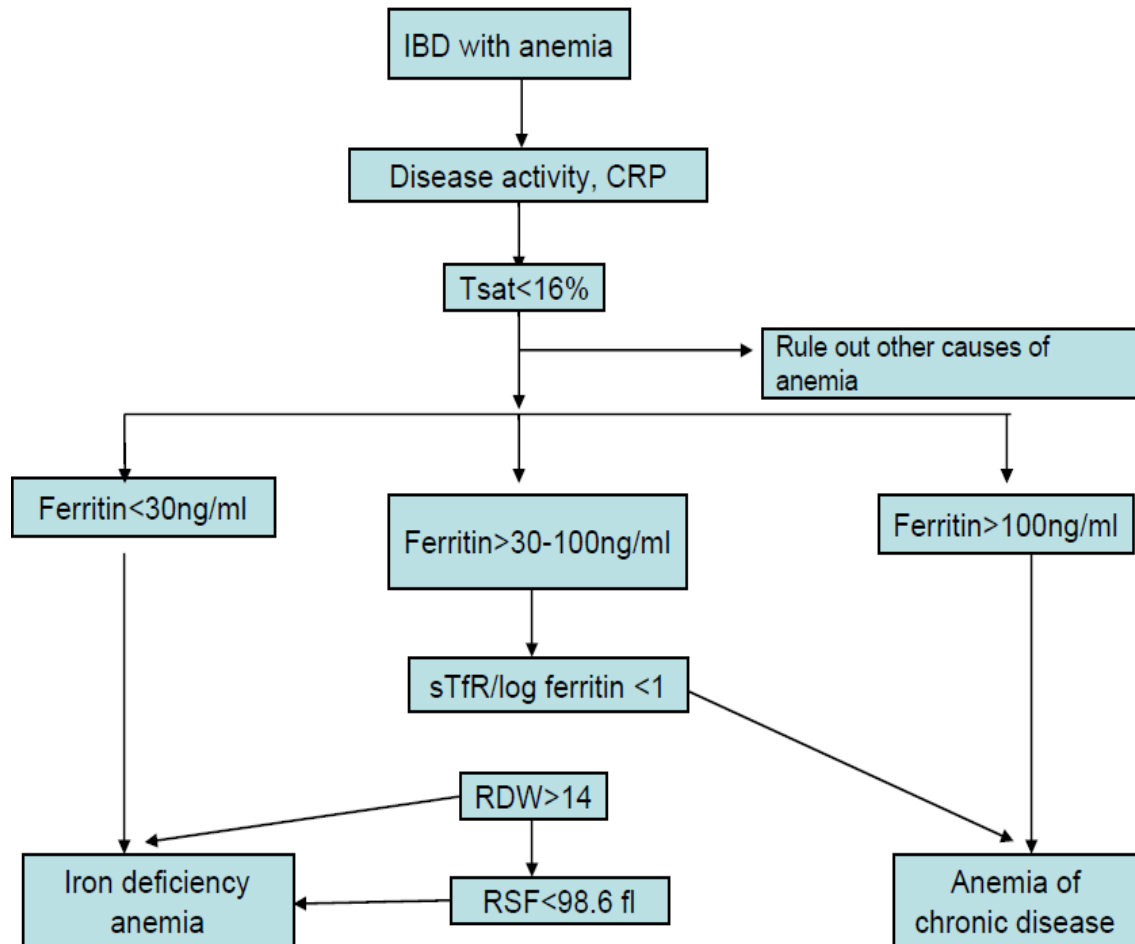
Επίλογος

Βάσει της ανωτέρω ανάλυσης, φαίνεται ότι ο πίνακας με τους διαθέσιμους δείκτες διαφοροποίησης της ΣΠΑ από την AXN σε ασθενείς με ΙΦΕΝ, διαμορφώνεται ως εξής (πίνακας 2):

| Parameter | Iron deficiency anemia | Anemia of chronic disease | Mixed anemia |
|--------------|------------------------|---------------------------|----------------------|
| Ferritin | Reduced | Increased or normal | Normal or increased |
| Transferrin | Increased | Reduced or normal | Reduced |
| Tsat | Reduced | Reduced | Reduced |
| sTfR | Increased | Normal or reduced | Normal or increased |
| sTfR-F index | Increased | Reduced | Increased |
| Hepcidin | Reduced | Increased | Increased or reduced |
| MCV | Reduced | Reduced or normal | Reduced or normal |
| CRP | Normal | Increased | Increased |
| RDW | Increased | Normal or increased | Normal or increased |
| CHr | Reduced | Reduced | Reduced |
| RSF | Reduced | Normal or reduced | Normal or reduced |
| RDWR | Increased | Normal or increased | Normal or increased |

Πίνακας 2. Δείκτες διαφοροποίησης ΣΠΑ-AXN στις ΙΦΕΝ.

Ο προτεινόμενος αλγόριθμος διαφορικής διάγνωσης μεταξύ ΣΠΑ και AXN στις ΙΦΕΝ, διαμορφώνεται ως εξής (εικόνα 1):



Εικόνα 1. Αλγόριθμος διαφορικής διάγνωσης ΣΠΑ από AXN, στις ΙΦΕΝ.

Η αναιμία στις
Ιδιοπαθείς
Φλεγμονώδεις Εντερικές
Νόσους

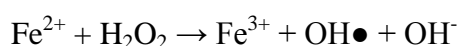
Μέρος 2ο



5.1. Ενδείξεις έναρξης θεραπείας της αναιμίας στις ΙΦΕΝ

Βάσει των κατευθυντήριων οδηγιών διάγνωσης και αντιμετώπισης της αναιμίας στις ΙΦΕΝ¹³, θα πρέπει να χορηγείται θεραπεία σε όλους τους ασθενείς με αιμοσφαιρίνη κατώτερη του φυσιολογικού. Η απόφαση για έναρξη θεραπείας εξαρτάται από τα συμπτώματα, την αιτιολογία, τη βαρύτητα της αναιμίας, το ρυθμό εγκατάστασης, τη συνοσηρότητα και τις πιθανές ανεπιθύμητες ενέργειες. Η πολύ ευρεία διακύμανση των κλινικών σεναρίων (από οριακή αιμοσφαιρίνη χωρίς σιδηροπενία έως εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα αιμοσφαιρίνης, αιμορραγία ή αιμολυτική αναιμία) απαιτεί ενέργειες που στηρίζονται στο κλινικό σενάριο και τα συμπτώματα του ασθενή. Η έναρξη θεραπείας στηρίζεται στη συμπτωματολογία (όπως κόπωση, κεφαλαλγία, δύσπνοια, ταχυκαρδία), αλλά επίσης και στην ενεργότητα της νόσου, την απώλεια αίματος και τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης. Είναι σημαντικό να λαμβάνεται υπόψη ότι η αναιμία επηρεάζει την ποιότητα ζωής^{8,9}, ακόμα και επί απουσίας ειδικών συμπτωμάτων, και ότι η θεραπεία της οδηγεί σε βελτίωση της ποιότητας ζωής²⁷.

Θεραπεία υποκατάστασης με σίδηρο θα πρέπει να ξεκινάει επί παρουσίας ΣΠΑ. Σε περίπτωση σιδηροπενίας άνευ αναιμίας, θα πρέπει να ακολουθούνται διαφορετικές προσεγγίσεις και να συζητούνται με τον ασθενή. Σε ασθενείς με υψηλή πιθανότητα εμφάνισης ΣΠΑ, θα πρέπει να μειώνονται τα μεσοδιαστήματα παρακολούθησης¹³. Διάφορες τυχαίοποιημένες μελέτες έχουν μελετήσει την επίδραση της σιδηροθεραπείας σε ασθενείς με ΣΠΑ, λόγω ΙΦΕΝ^{27,217,218}. Ο από του στόματος σίδηρος είναι μία επιλογή. Ωστόσο, στις ΙΦΕΝ ο μη απορροφούμενος δισθενής σίδηρος ενέχει τον κίνδυνο επιδείνωσης των συμπτωμάτων και επίταξης της εντερικής φλεγμονής, μέσω της αντίδρασης Fenton, η οποία απελευθερώνει ενεργές ρίζες οξυγόνου (reactive oxygen species)^{218,219}:



Από την άλλη πλευρά, η ενδοφλέβια (ΕΦ) σιδηροθεραπεία μπορεί να θεωρηθεί ιδιαίτερα επεμβατική, ειδικά όταν χρησιμοποιείται δεξτρανικός σίδηρος (iron dextran) με τον κίνδυνο αναφυλακτικών αντιδράσεων.

Η χρήση ερυθροποιητικών παραγόντων είναι αποτελεσματική στη θεραπεία της ΑΧΝ και μπορεί να βελτιώσει την ποιότητα ζωής. Θα πρέπει να συζητείται όταν η αιμοσφαιρίνη είναι <10 g/dL ή επί μη ανταπόκρισης σε ΕΦ σιδηροθεραπεία μετά από 4

εβδομάδες¹³. Οι ερυθροποιητικοί παράγοντες (όπως οι epoetin alfa, apoetin beta, darbepoetin alfa) είναι αποτελεσματικοί στη θεραπεία της AXN, όταν η αιμοσφαιρίνη είναι <10 g/dL^{18,27,42}. Η πραγματική ανάγκη για ερυθροποιητικούς παράγοντες σε αυτό το σενάριο είναι μικρή, δεδομένου ότι ο ΕΦ σίδηρος ως μονοθεραπεία εμφανίζει ποσοστό ανταπόκρισης 70-80%^{27,220}.

Οι ενδείξεις για αναπλήρωση αίματος μετά από οξεία ή χρόνια αιμορραγία από το πεπτικό σύστημα ποικίλουν, βασιζόμενες στην κλινική κατάσταση (ρυθμός απώλειας αίματος, αιμοδυναμική κατάσταση, αιμοσφαιρίνη, ηλικία, συνοσηρότητα). Η αντιμετώπιση θα πρέπει να κατευθύνεται προς τη διάγνωση και διακοπή της εντερικής αιμορραγίας. Η μετάγγιση αίματος δεν είναι υποκατάστατο της θεραπείας της ΣΠΑ με ΕΦ σίδηρο, πιθανώς σε συνδυασμό με ερυθροποιητικούς παράγοντες. Ακόμα και αν η μετάγγιση αίματος κριθεί απαραίτητη, απαιτείται και πάλι θεραπεία υποκατάστασης με σίδηρο¹³. Επιπλέον, η ανάγκη μετάγγισης θα πρέπει να ζυγίζεται με προσοχή, καθώς οι περισσότεροι ασθενείς υποφέρουν από χρόνια απώλεια αίματος και οι επανειλημμένες μεταγγίσεις αίματος δεν αποτελούν ενδεδειγμένη θεραπεία της χρόνιας απώλειας αίματος¹³.

5.2. Στόχοι της θεραπείας της αναιμίας

Οι στόχοι της θεραπείας της αναιμίας στις ΙΦΕΝ είναι η αύξηση της αιμοσφαιρίνης, της φερριτίνης ορού και του T_{sat} πάνω από τα κατώτερα φυσιολογικά όρια. Επίσης, η πρόληψη της περαιτέρω πτώσης της αιμοσφαιρίνης, η αποφυγή μεταγγίσεων αίματος, η ανακούφιση από τα συμπτώματα που οφείλονται στην αναιμία και η εν γένει βελτίωση της ποιότητας ζωής¹³. Η αναιμία αποτελεί σύνηθες αίτιο νοσηλείας στο νοσοκομείο και είναι επίσης συχνό αίτιο παράτασης της νοσηλείας. Ακόμη, η αναιμία είναι από τις συχνότερες καταστάσεις που συμμετέχουν στη θνητότητα που σχετίζεται με τις ΙΦΕΝ²²¹. Χρήζει έτσι, ιδιαίτερης προσοχής και ειδικής αντιμετώπισης.

Η ερυθροποιητική ανταπόκριση στην υποκατάσταση με σίδηρο θεωρείται επαρκής όταν η συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης αυξάνεται κατά τουλάχιστον 2 g/dL ή φτάνει τα φυσιολογικά επίπεδα εντός 4 εβδομάδων από την έναρξη της θεραπείας¹³. Τα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα έχουν μέση διάρκεια ζωής περίπου 120 ημέρες. Αυτό σημαίνει ότι περίπου 200 δισεκατομμύρια νέα ερυθρά παράγονται ημερησίως, που περιέχουν συνολικά 6 gr αιμοσφαιρίνης, δηλαδή παράγονται 2-3 εκατομμύρια ερυθρά κάθε δευτερόλεπτο. Σε αναιμικές καταστάσεις, όπου μειώνεται η παροχή οξυγόνου, η παραγωγή ερυθρών μπορεί να αυξηθεί έως και 20 φορές πάνω από το φυσιολογικό, γεγονός που υπογραμμίζει την έντονα δυναμική φύση της ερυθροποίησης. Η εργαστηριακή μεθοδολογία και το ισοζύγιο των υγρών προκαλούν ημερήσιες μεταβολές έως και 1 g/dL. Η αύξηση των 2 g/dL μπορεί να επιτευχθεί με ΕΦ σιδηροθεραπεία εντός 2-4 εβδομάδων^{27,217}. Εάν η θεραπευτική ανταπόκριση είναι ελλιπής, η θεραπεία θα πρέπει να εντατικοποιείται (αλλαγή από από του στόματος σίδηρο σε ΕΦ), να αλλάζει (προσθήκη ερυθροποιητικών παραγόντων) ή θα πρέπει η αιτία της αναιμίας να επαναξιολογείται¹³.

Για την αξιολόγηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία, θα πρέπει να μετράται η αιμοσφαιρίνη εντός 4 εβδομάδων σε ασυμπτωματικούς ασθενείς ή νωρίτερα σε συμπτωματικούς ασθενείς, με σκοπό την κατάλληλη προσαρμογή της θεραπείας. Κατά την παρακολούθηση της υποκατάστασης με από του στόματος σίδηρο, επίπεδα φερριτίνης >100 μg/L είναι ενδεικτικά επαρκών αποθηκών σιδήρου. Η φερριτίνη ορού δεν είναι κατάλληλη για την παρακολούθηση υποκατάστασης με ΕΦ σίδηρο, ενώ τιμή T_{sat}>50% υποδεικνύει υπερφόρτωση με σίδηρο¹³. Η μέτρηση του T_{sat} υπερεκτιμά ψευδώς τη θεραπευτική ανταπόκριση στη σιδηροθεραπεία επειδή η αύξηση του T_{sat}

είναι μόνο προσωρινή, όσο διαρκεί η χορήγηση σιδήρου (από το στόμα ή ΕΦ). Κατά τη χορήγηση ΕΦ σιδήρου, τα επίπεδα της φερριτίνης στον ορό είναι ψευδώς υψηλά²²². Σε αυτή την περίπτωση ο Tsat>50% είναι ο καλύτερος δείκτης υπερφόρτωσης με σίδηρο.

5.3. Θεραπεία της σιδηροπενικής αναιμίας

5.3.1. Θεραπεία υποκατάστασης με χορήγηση σιδήρου από το στόμα

Η από του στόματος λήψη συμπλόκων 2σθενούς ή 3σθενούς σιδήρου είναι δυνατή σε ασθενείς με ΙΦΕΝ εάν δεν υπάρχουν απόλυτες ενδείξεις ΕΦ θεραπείας. Τα από του στόματος σκευάσματα είναι διαθέσιμα υπό μορφή 2σθενών αλάτων (π.χ. θειικός σίδηρος), 3σθενών συμπλόκων πολυμαλτόζης ή πολυπεπτιδίων σιδήρου αίμης¹⁸⁰. Αν και η χορήγηση αλάτων σιδήρου από το στόμα είναι φθηνή, είναι λιγότερο αποτελεσματική από την παρεντερική χορήγηση. Η εκτιμώμενη ποσότητα σιδήρου για ένα άρρενα ασθενή βάρους 70 κιλών, με επίπεδο αιμοσφαιρίνης 8 g/dL και επίπεδο φερριτίνης 15 µg/dL, υπολογίζεται από την εξίσωση Ganzoni²²³ ότι είναι 1500 mg:

$$\begin{aligned} \text{Έλλειμμα σιδήρου (mg)} &= B\Sigma \text{ (Kg)} \times [\text{Hgb στόχος} - \text{Hgb πραγματική}] \text{ (g/L)} \times 0.24 \\ &+ \text{αποθήκες σιδήρου (500 mg)} \end{aligned}$$

Βάσει μίας μέσης ημερήσιας απορρόφησης σιδήρου 10 mg, μίας υποτιθέμενης καλής συμμόρφωσης στη θεραπεία και μη ύπαρξης απώλειας αίματος, η υποκατάσταση με από του στόματος σίδηρο θα διαρκέσει περίπου 5 μήνες. Δεδομένου ότι το 12δάκτυλο μπορεί να απορροφήσει το ανώτερο 10-20 mg σιδήρου ημερησίως, η χρήση υψηλών δόσεων είναι αμφισβητήσιμη²²⁴. Καθώς επιτυχής θεραπεία έχει επιτευχθεί με χαμηλές δόσεις των 15 mg ημερησίως²²⁴⁻²²⁶, και από τη στιγμή που δεν υπάρχουν συγκριτικές μελέτες που να προκρίνουν τη χορήγηση υψηλών δόσεων σιδήρου στις ΙΦΕΝ, συνιστώνται οι χαμηλές δόσεις (π.χ. 50-100 mg), ειδικά καθώς έχουν λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες.

Κατά τη θεραπεία της αναιμίας των ΙΦΕΝ με από του στόματος σίδηρο, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τρία κύρια σημεία: η ιδιαίτερα χαμηλή απορρόφηση σε τέτοιους ασθενείς, λόγω των αυξημένων επιπέδων hepcidin¹⁹², η έλλειψη συμμόρφωσης στη θεραπεία και η ανάγκη μεγάλης ποσότητας σιδήρου για την υποκατάσταση. Με στόχο μία επαρκή αύξηση της αιμοσφαιρίνης, είναι δύσκολο έως και ακατόρθωτο, ειδικά σε ασθενείς με ΙΦΕΝ, να αναπληρώσει κανείς τις αποθήκες σιδήρου του οργανισμού²¹⁷.

Καθώς περισσότερο από το 90% του σιδήρου που προσλαμβάνεται δεν απορροφάται²²⁷, τα σκευάσματα σιδήρου από το στόμα οδηγούν συχνά σε γαστρεντερικές διαταραχές, όπως ναυτία, φούσκωμα, διάρροια, γαστρικές διαβρώσεις

και εντερική σιδήρωση^{228,229}. Επιπλέον, μελέτες τόσο σε ζωικά μοντέλα^{192,230-232} όσο και σε ανθρώπους²¹⁸ έχουν δείξει ότι η δημιουργία ενεργών ριζών οξυγόνου από τον μη απορροφούμενο σίδηρο μπορεί δυνητικά να οδηγήσει σε έξαρση της νόσου²³³. Υπάρχουν επίσης αναφορές, τουλάχιστον σε ζωικά μοντέλα, μίας αύξησης της δυσπλασίας και του καρκινώματος, πράγμα που δε συμβαίνει με την ΕΦ χορήγηση σιδήρου^{232,234,235}. Επίσης, φαίνεται ότι με τη λήψη σιδήρου από το στόμα αναστέλλεται η απορρόφηση ψευδαργύρου, οι ανάγκες του οποίου είναι αυξημένες σε ασθενείς με ΙΦΕΝ²³⁶.

5.3.2. Θεραπεία υποκατάστασης με χορήγηση σιδήρου ενδομυϊκά (ΕΜ)

Η ΕΜ χορήγηση σιδήρου είναι επώδυνη και μπορεί να οδηγήσει σε εντοπισμένη δερματική σιδήρωση²³⁷. Έχουν αναφερθεί διάφορες περιπτώσεις γλουτιαίου σαρκώματος στο σημείο της ένεσης^{238,239}, αν και δεν έχει επιβεβαιωθεί κίνδυνος καρκινογένεσης²⁴⁰. Επιπλέον, έχουν αναφερθεί πολλές περιπτώσεις σοβαρών ή/και θανατηφόρων αναφυλακτικών αντιδράσεων, που σχετίζονται με την ΕΜ χορήγηση δεξτρανικού σιδήρου. Υπάρχουν επίσης επιφυλάξεις σχετικά με τη μη απορρόφηση όταν μεγάλες ποσότητες σιδήρου χορηγούνται ΕΜ, καθώς και σχετικά με το μεταβλητό ρυθμό απορρόφησης²⁴¹. Καθώς δεν υπάρχουν ενδείξεις ότι ο ΕΜ σίδηρος είναι λιγότερο τοξικός ή περισσότερο αποτελεσματικός από τον ΕΦ ή από του στόματος, η ΕΜ χορήγηση σιδήρου δε συνιστάται²⁴².

5.3.3. Θεραπεία υποκατάστασης με χορήγηση σιδήρου ενδοφλεβίως (ΕΦ)

Όλοι οι ΕΦ παράγοντες σιδήρου είναι κολλοειδή με σφαιρικά νανοσωματίδια σιδήρου-υδατάνθρακα. Κάθε σωματίδιο αποτελείται από έναν πυρήνα 3σθενούς σιδήρου-οξυυδροξειδίου (iron-oxyhydroxide core) και ένα κέλυφος υδατάνθρακα που σταθεροποιεί τον πυρήνα²⁴³. Οι διαφορές στο μέγεθος του πυρήνα και στις χημικές ιδιότητες του κελύφους καθορίζουν τις φαρμακολογικές και βιολογικές διαφορές ανάμεσα στα διάφορα σύμπλοκα σιδήρου, συμπεριλαμβανομένης της κάθαρσης μετά τη χορήγηση, την αποδέσμευση σιδήρου *in vitro*, τη βιοδραστικότητα *in vivo*, και τη μέγιστη ανεκτή δόση και ρυθμό χορήγησης^{244,245}. Τα σύμπλοκα γενικά ταξινομούνται ως ασταθή ή σταθερά (κινητική παράμετρος) και ως ασθενή ή ισχυρά (θερμοδυναμική παράμετρος), με όλες τις ενδιάμεσες καταστάσεις (πίνακας 1). Επί του παρόντος έξι (6) διαφορετικά προϊόντα χρησιμοποιούνται στην κλινική πρακτική²⁴⁶⁻²⁴⁸: ο γλυκονικός σίδηρος, ο σουκροζικός σίδηρος, ο δεξτρανικός σίδηρος, ο καρβοξυμαλτοζικός σίδηρος, ο ισομαλτοζικός σίδηρος και το ferumoxytol (πίνακας 2).

| Type | Kinetic property | Thermodynamic property | Molecular weight (M_w) (kD) | Degradation parameter ($k \cdot 10^3$) at $\theta = 0.5$ (min^{-1}) | Examples |
|------|------------------|------------------------|---------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| I | robust | strong | >100 | 15–50 | ferric carboxymaltose; iron dextran; iron dextrin |
| II | semi-robust | moderately strong | 30–100 | 50–100 | iron sucrose |
| III | labile | weak | <50 | >100 | iron gluconate; iron citrate; iron sorbitol |
| IV | mixed | mixed | <50 (variable) | | iron dextrin/sorbitol/citric acid complex; iron sucrose/gluconic acid complex |

Πίνακας 1. Ταξινόμηση των διαφόρων τύπων συμπλόκων σιδήρου-υδατάνθρακα. (Πηγή: Funk F, et al. *Arzneimittelforschung* 2010;60(6a):345-353)

5.3.3.1. Γλυκονικός σίδηρος (ΓΣ)

Ο ΓΣ έχει έναν πυρήνα ισχυρά συνδεδεμένο σε γλυκονικό οξύ και ασθενώς σχετιζόμενο με σουκρόζη (MB: 38 kDa) και είναι ένα σύμπλοκο τύπου III (ασταθές και ασθενές) με κινητική ταχείας αποδόμησης και απευθείας απελευθέρωσης στις πρωτεΐνες του πλάσματος (αποτρανσφερρίνη, αποφερριτίνη και άλλες)²⁴³. Η πιθανότητα οξέων ανεπιθύμητων αντιδράσεων σχετιζόμενων με την χαλαρή αποδέσμευση σιδήρου μετά την ΕΦ έγχυση, που προκαλούνται από τον υπερκορεσμό της δεσμευτικής ικανότητας της τρανσφερρίνης, είναι υψηλότερη με το ΓΣ, συγκριτικά με τα άλλα σκευάσματα. Ο χαλαρός σίδηρος μη προσδεμένος στην τρανσφερρίνη, μπορεί να πυροδοτήσει οξεία βλάβη των ενδοθηλιακών κυττάρων και ένα προσωρινό σύνδρομο διαρροής των τριχοειδών (capillary leak syndrome). Τα κλινικά συμπτώματα οξείας τοξικότητας περιλαμβάνουν ναυτία, υπόταση, ταχυκαρδία, θωρακικό άλγος, δύσπνοια λόγω πνευμονικού οιδήματος και αμφίπλευρο οίδημα χεριών και ποδιών, και δε θα πρέπει να εκλαμβάνεται ως αναφυλαξία²⁴⁵. Προς αποφυγή τέτοιων φαινομένων, η μέγιστη συνιστώμενη δόση είναι 125 mg, ενώ χορήγηση ολικής δόσης δε συνιστάται. Η χρήση ΓΣ για ΣΠΑ σε ασθενείς σε αιμοκάθαρση έχει βρεθεί να είναι αποτελεσματική και ασφαλής^{244,245}.

5.3.3.2. Σουκροζικός σίδηρος (ΣΣ)

Ο ΣΣ έχει έναν πυρήνα ισχυρά προσδεμένο σε σουκρόζη (MB: 43 kDa) και εμφανίζει μέτρια σταθερότητα με ενδιάμεση κινητική αποδόμησης και μερική πρόσληψη του απελευθερούμενου σιδήρου από τις πρωτεΐνες του πλάσματος, όπως η τρανσφερρίνη, αλλά και από το ΔΕΣ (τύπος II: ημι-σταθερό και μετρίως ισχυρό)²⁴³. Ο χρόνος ημίσειας ζωής του είναι σχετικά μικρός (5-6 ώρες) και το ποσό του σιδήρου που

| Formulation | Iron dextran [90-92] | Ferric gluconate [93] | Iron sucrose [94] | Ferric carboxymaltose [95] | Ferumoxytol [96] |
|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| Indication | Treatment of ID when oral iron preparations cannot be used, or where there is a clinical need to deliver iron rapidly to iron stores | Treatment of IDA in paediatric patients and in age ≥ 6 years undergoing chronic HD who are receiving supplemental epoetin therapy | Treatment of ID where there is a clinical need to deliver iron rapidly to iron stores, in patients who cannot tolerate oral iron therapy or who are non-compliant, and in active IBD where oral iron preparations are ineffective | Treatment of ID when oral iron preparations are ineffective or cannot be used | Treatment of IDA in adult patients with CKD |
| Dosing ^a | | | | | |
| Test dose required | Yes | No | Yes ^b /No | No | No |
| Max infusion iron dose | Up to 20 mg/kg body weight | 62.5-125 mg | 100-500 mg | 1000 mg | 510 mg |
| Min i. v. infusion time | 360 min | 60 min | 15-240 min | 15 min | N/A |
| Max injectable single iron dose | 100 mg | 125 mg | 100 mg | 200 mg | 510 mg (17 ml) |
| Max i. v. single dose injection time | 2 min | 10 min | 5 min | Bolus push | 17 sec (1 ml/s) |
| Chemical properties/structure/stability ^c | | | | | |
| Type of complex ^d | Type I | Type IV | Type II | Type I | Type I |
| Molecular weight (Da) | > 100,000 | 38,000 | 34,000-60,000 | -150,000 | -750,000 ^e |
| Complex stability | High | Low | Moderate | High | High |
| Oversaturation of iron transport system ^f | No | Yes | Yes | No | No |
| pH | Neutral | Neutral | High | Neutral | 6-8 |
| Safety profile | | | | | |
| Risk of dextran-induced anaphylaxis | Yes | No (dextran free) | No (dextran free) | No (dextran free) | No data |
| Relative risk of SAEs ^g | High | Low | Low | Low | Low |
| Liver necrosis | No | Yes ^f | No | No | No |
| Acute toxicity ^g | Low | High | Medium | Low | Low |

^a Prescribing information of marketed products [90-96]; ^b Only in Europe; ^c According to Crichton *et al.* 2008 [45]; ^d Geisser *et al.* 1992 [129]; ^e Not comparable with other values as measured to a different standard; ^f Dose dependent; ^g Gasche *et al.* 2007 [80].

Πίνακας 2. Χαρακτηριστικά των συμπλόκων σιδήρου. Δεν απεικονίζεται ο ισομαλτοζικός σίδηρος. (Πηγή: Qunibi WY. *Arzneimittelforschung* 2010;60(6a):399-412)

μεταφέρεται από την τρανσφερρίνη, υπολογιζόμενο με βάση το μοντέλο Michaelis-Menten για μία σταθερή δόση που περιέχει 100 mg σιδήρου, είναι περίπου 30 mg 3σθενούς σιδήρου/24ωρο²⁴⁹. Μετά από μία ΕΦ έγχυση 100 mg ΣΣ σε αναιμικούς ασθενείς, το 95% χρησιμοποιείται εντός 2-4 εβδομάδων. Εξαιτίας του προφίλ ασφάλειας του ΣΣ, στις περισσότερες χώρες απαιτείται δοκιμαστική δόση. Απλές δόσεις

100-200 mg ως ΕΦ ένεση²⁵⁰ ή μέχρι 500 mg σε έγχυση 3.5 ωρών, φαίνονται να είναι ασφαλείς²¹⁷. Η μέγιστη συνιστώμενη δόση είναι 600 mg/εβδομάδα (δόσεις των 200 mg ΣΣ, όχι περισσότερες από 3 φορές την εβδομάδα) αλλά το ποσό αυτό υπερβαίνει τις φυσιολογικές ανάγκες του ερυθροβλάστη που πολλαπλασιάζεται. Σε περίπτωση υψηλής ταχύτητας έγχυσης (>4 mg 3σθ. Σιδήρου/λεπτό) ή υψηλής ολικής δόσης σιδήρου (>7 mg 3σθ. Σιδήρου/κιλό, με μέγιστο τα 500 mg), ο μη-προσδεμένος στην τρανσφερρίνη σίδηρος μπορεί να προκαλέσει σύνδρομο τοξικότητας, όπως του ΓΣ. Λεπτά έως ώρες μετά την έγχυση μπορεί να εμφανισθούν διάρροια, επιγαστραλγία ή διάχυτα άλγη. Έχουν περιγραφεί περιπτώσεις φλεβίτιδας, αλλά πιθανώς οφείλονταν σε μακρά διάρκεια χορήγησης (παρά υψηλές δόσεις), στη διατήρηση φλεβικής γραμμής ή στη χρήση υπερβολικά αραιής διάλυσης (η συγκέντρωση σιδήρου πρέπει να είναι τουλάχιστον 1 mg/ml). Γενικά, ο ΣΣ θεωρείται αρκετά ασφαλής μορφή ΕΦ σιδήρου, ενώ συνιστάται η χορήγηση δοκιμαστικής δόσης πριν την έγχυση²⁵¹.

Σε μία αναδρομική μελέτη παρατήρησης σε ασθενείς με ΙΦΕΝ με πτωχή ανταπόκριση ή δυσανεξία στον από του στόματος σίδηρο, η χορήγηση ΣΣ (200 mg μία ή δύο φορές εβδομαδιαίως) οδήγησε σε πλήρη ανταπόκριση στο 60% των ασθενών εντός 8 εβδομάδων και στο 90% των ασθενών εντός 12 εβδομάδων²⁵². Ωστόσο, σε μία τυχαιοποιημένη, ελεγχόμενη, πολυκεντρική μελέτη σε 46 ασθενείς με αναιμία και Tsat<20% ή/και φερριτίνη ορού <20 μg/L, δε βρέθηκαν διαφορές στην αύξηση της αιμοσφαιρίνης εντός 6 εβδομάδων ανάμεσα σε ασθενείς που έλαβαν ΣΣ και ασθενείς που έλαβαν θεικό σίδηρο από το στόμα, αλλά είχε σαν αποτέλεσμα την αναπλήρωση των αποθηκών σιδήρου (φερριτίνη=200 ng/ml, μετά 6 εβδ.) και επιπλέον ο ΣΣ είχε καλύτερο προφίλ γαστρεντερικής ανοχής από τον θεικό σίδηρο²¹⁷. Σε μία πρόσφατη μελέτη²⁵³, 91 ασθενείς με ΙΦΕΝ και αναιμία τυχαιοποιήθηκαν και έλαβαν θεικό σίδηρο (n=46) ή ΣΣ (n=45), για 20 εβδομάδες. Περισσότεροι ασθενείς στην ομάδα του ΣΣ ολοκλήρωσαν τη μελέτη (93% έναντι 78%, P=0.001), αύξησαν την αιμοσφαιρίνη >2 g/dL (66% έναντι 47%, P=0.07), ομαλοποίησαν την τιμή της φερριτίνης (74% έναντι 48%, P=0.013) και ανέταξαν την αναιμία (84% έναντι 59%, P=0.007), συγκριτικά με τους ασθενείς που έλαβαν θεικό σίδηρο. Επιπλέον, η θεραπεία με ΣΣ οδήγησε σε ταχύτερη και αποτελεσματικότερη αναπλήρωση των αποθηκών σιδήρου (P=0.002). Σε μία προοπτική, πολυκεντρική μελέτη²⁵⁴ με 100 ασθενείς με ΙΦΕΝ και ΣΠΑ, χορηγήθηκε θεικός σίδηρος όταν η αιμοσφαιρίνη ήταν >10 g/dL (n=78) ή ΕΦ ΣΣ, όταν η αιμοσφαιρίνη ήταν <10 g/dL (n=22). Επαναφορά της αιμοσφαιρίνης στα φυσιολογικά επίπεδα επιτεύχθηκε στο 89% των ασθενών με από του στόματος σίδηρο και στο 77%

των ασθενών με ΕΦ σίδηρο. 4 ασθενείς διέκοψαν τον θειικό σίδηρο λόγω παρενεργειών, ενώ τον ΣΣ, κανέναν. Έτσι, ο ΣΣ ήταν αποτελεσματική και ασφαλής θεραπεία σε πιο σοβαρές περιπτώσεις αναιμίας ή σε ασθενείς με δυσανεξία στον από του στόματος σίδηρο. Πάντως, έχει περιγραφεί ότι η σιδηροπενία και ΣΠΑ σε ασθενείς με ΙΦΕΝ μπορεί να υποτροπιάσει πολύ γρήγορα μετά το τέλος της σιδηροθεραπείας, οπότε και θα πρέπει η θεραπεία να στοχεύει σε αυξημένες αποθήκες σιδήρου (όπως αυτές μετρώνται με τη φερριτίνη), μέσω χορήγησης υψηλότερης αρχικής δόσης σιδήρου, πράγμα που συσχετίζεται με καλύτερα θεραπευτικά αποτελέσματα²⁵. Συνιστάται επίσης η χορήγηση θεραπείας συντήρησης σε μία υποομάδα του πληθυσμού των ασθενών.

5.3.3.3. Δεξτρανικός σίδηρος (ΔΣ)

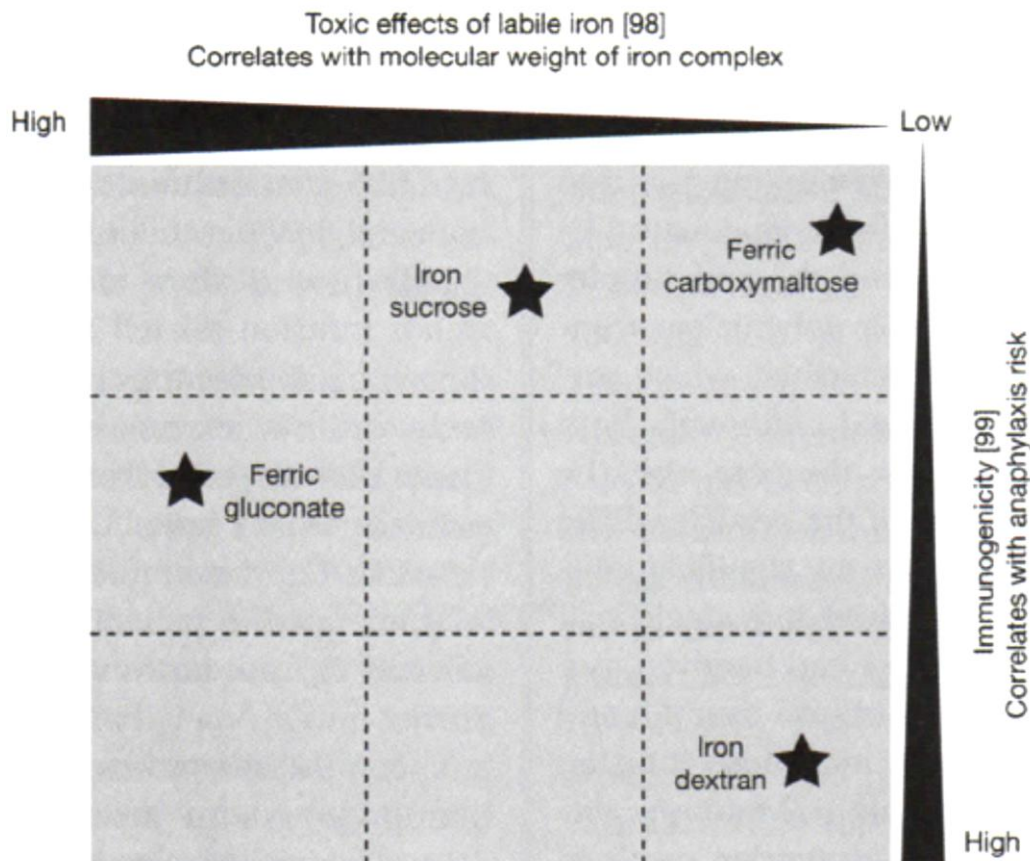
Ο ΔΣ είναι ένα σταθερό προϊόν ΕΦ σιδήρου με MB 73 kDa (Low molecular weight iron dextran)[XMBΔΣ] ή 156 kDa (High molecular weight iron dextran)[YMBΔΣ]. Αυτό το σύμπλοκο τύπου I (σταθερό και ισχυρό) χαρακτηρίζεται από υψηλή δομική ομοιογένεια και αργή και ανταγωνιστική διανομή σιδήρου στις πρωτεΐνες δέσμευσης²⁴³. Τα σύμπλοκα φαγοκυτταρώνονται ενεργά από τα μακροφάγα του ΔΕΣ, πριν αυτά απελευθερωθούν και γίνουν διαθέσιμα για σύνθεση αιμοσφαιρίνης. Αν και ο χρόνος ημίσειας ζωής του XMBΔΣ στο πλάσμα είναι 30 ώρες (3 ημέρες για τον YMBΔΣ), η όλη διαδικασία αποδέσμευσης σιδήρου από το σύμπλοκο στο ΔΕΣ, αποθήκευσης στη φερριτίνη και διανομής στο μυελό ή άλλους ιστούς, υπό μορφή σιδήρου προσδεμένου στην τρανσφερρίνη, μπορεί να διαρκέσει αρκετούς μήνες²⁵⁵. Ο ΔΣ μπορεί να χορηγηθεί ΕΜ ή ΕΦ (ένεση ή έγχυση), αλλά απαιτείται πάντοτε χορήγηση δοκιμαστικής δόσης πριν την πρώτη χορήγηση. Η σταθερότητα του συμπλόκου δεξτράνης επιτρέπει τη χορήγηση υψηλής μονήρους δόσης, εντός διαστήματος 4-6 ωρών (έγχυση «ολικής δόσης»). Αντίθετα, η ΕΜ δε συνιστάται, καθώς η απορρόφηση δεν είναι σταθερή²⁴². Ωστόσο, ο ΔΣ μπορεί να προκαλέσει αναφυλακτικές αντιδράσεις, ειδικά ο YMBΔΣ, ο οποίος θεωρείται μη ασφαλής ΕΦ παράγοντας. Ο ακριβής μηχανισμός αναφυλαξίας από τη δεξτράνη φαίνεται να σχετίζεται με τη μέσω-αντισωμάτων απελευθέρωση μεσολαβητών από τα μαστοκύτταρα²⁵¹. Τέτοιες αντιδράσεις πιθανώς οφείλονται σε προσχηματισμένα αντισώματα έναντι των συστατικών της δεξτράνης, που σχηματίζονται λόγω προηγηθείσας έκθεσης σε αντιγόνα προσομοιάζοντα βακτηριακή μεμβράνη, στο γαστρεντερικό σωλήνα²⁵⁶. Θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι οι ανοσολογικού τύπου ανεπιθύμητες ενέργειες μπορεί να είναι πιο συχνές σε ασθενείς με ΙΦΕΝ, στους οποίους

οι ανοσολογικές φαρμακευτικές αντιδράσεις είναι συχνότερες απ' ό τι σε αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς²⁴². Στην Ευρώπη έχει εγκριθεί η χορήγηση 200 mg ΧΜΒΔΣ, σε διάστημα >30 λεπτά, με μέγιστη δόση 20 mg/Kg ΒΣ.

5.3.3.4. Καρβοξυμαλτοζικός σίδηρος (ΚΣ)

Ο ΚΣ είναι επίσης σταθερό σύμπλοκο με ΜΒ 150 kDa, παρόμοιο με τον ΔΣ, όσον αφορά τη σταθερότητα και τη δομή (τύπου I, σταθερό και ισχυρό)²⁴³. Τα φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά του είναι παρόμοια αλλά όχι ίδια με του ΔΣ. Ο όγκος κατανομής πλησιάζει σχεδόν αυτόν του πλάσματος και ο χρόνος ημίσειας ζωής είναι 16 ώρες. Φαίνεται ότι ο ΚΣ διασπάται πιο γρήγορα από τον ΔΣ, επειδή η α-αμυλάση δεν επηρεάζει τον τελευταίο, ή δρα με πολύ αργό ρυθμό²⁴⁶. Μία μελέτη με χρήση τομογραφίας εκπομπής ποζιτρονίων (PET) έδειξε ότι ο σίδηρος από τον ΚΣ συγκεντρώνεται στο ήπαρ, σπλήνα και μυελό των οστών εντός μερικών λεπτών. Επιπλέον, ο ΚΣ μπορεί να ανταλλάξει ταχέως σίδηρο με την τρανσφερρίνη²⁵⁷. Ως εκ τούτου, η χρήση του σιδήρου από τα ερυθρά αυξήθηκε ραγδαία μεταξύ των ημερών 6 και 9, ενώ αργότερα η χρήση του αυξήθηκε με μικρότερο ρυθμό. Ασθενείς με ΣΠΑ εμφάνισαν ενσωμάτωση σιδήρου >90% μετά από 24 ώρες, συγκριτικά με 60-80% σε ασθενείς με νεφρική αναιμία²⁵⁷. Ο ΚΣ είναι σχεδιασμένος έτσι ώστε να μιμείται τη φερριτίνη, παρέχοντας υψηλή παροχή σιδήρου, χωρίς τα αρνητικά χαρακτηριστικά του ΔΣ (αναφυλαξία) ή του ΣΣ (υψηλό pH, υψηλή ωσμωτικότητα, περιορισμοί δόσης και μεγάλη διάρκεια χορήγησης) (εικόνα 1). Μέχρι 100-200 mg ΚΣ μπορούν να χορηγηθούν με ΕΦ ένεση ενώ μέχρι και 1000 mg (ή 15 mg/Kg) μπορούν να χορηγηθούν με ΕΦ έγχυση, εντός τουλάχιστον 15 λεπτών, χωρίς να απαιτείται δοκιμαστική δόση²⁴³. Από τις μελέτες ασφαλείας, δεν προέκυψαν σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες ή θάνατοι, που να σχετίζονταν με τον ΚΣ²⁴⁶. Ωστόσο, ο FDA έχει εγείρει ένα θέμα σχετιζόμενο με δυνητικό κίνδυνο θανάτου, βασιζόμενος σε αυξημένο ποσοστό θανάτων στην ομάδα του ΚΣ, συγκριτικά με τις άλλες ομάδες ασθενών, στις διάφορες κλινικές μελέτες²⁵⁸. Γενικά, τα δεδομένα ασφαλείας του ΚΣ στην κλινική πράξη είναι μάλλον αντικρουόμενα, αλλά φαίνεται να γέρνουν σαφώς υπέρ ενός προφίλ υψηλής ασφαλείας και αποτελεσματικότητας.

Η αποτελεσματικότητα του ΚΣ σιδήρου σε ασθενείς με ΙΦΕΝ, έχει μελετηθεί από τους Gasche και συν. σε δύο συγκριτικές κλινικές μελέτες. Στην πρώτη²⁵⁹, οι ασθενείς με αναιμία τυχαιοποιήθηκαν και έλαβαν είτε ΚΣ (n=137), είτε θειικό σίδηρο από το στόμα (n=63), για 12 εβδομάδες.



Εικόνα 1. Διάγραμμα σταθμίσεως κινδύνου για την ανάπτυξη αντιδράσεων οξειδωτικού στρες έναντι αντιδράσεων υπερευαισθησίας, για 4 σύμπλοκα παρεντερικού σιδήρου. (Πηγή: Qunibi WY. *Arzneimittelforschung* 2010;60(6a):399-412)

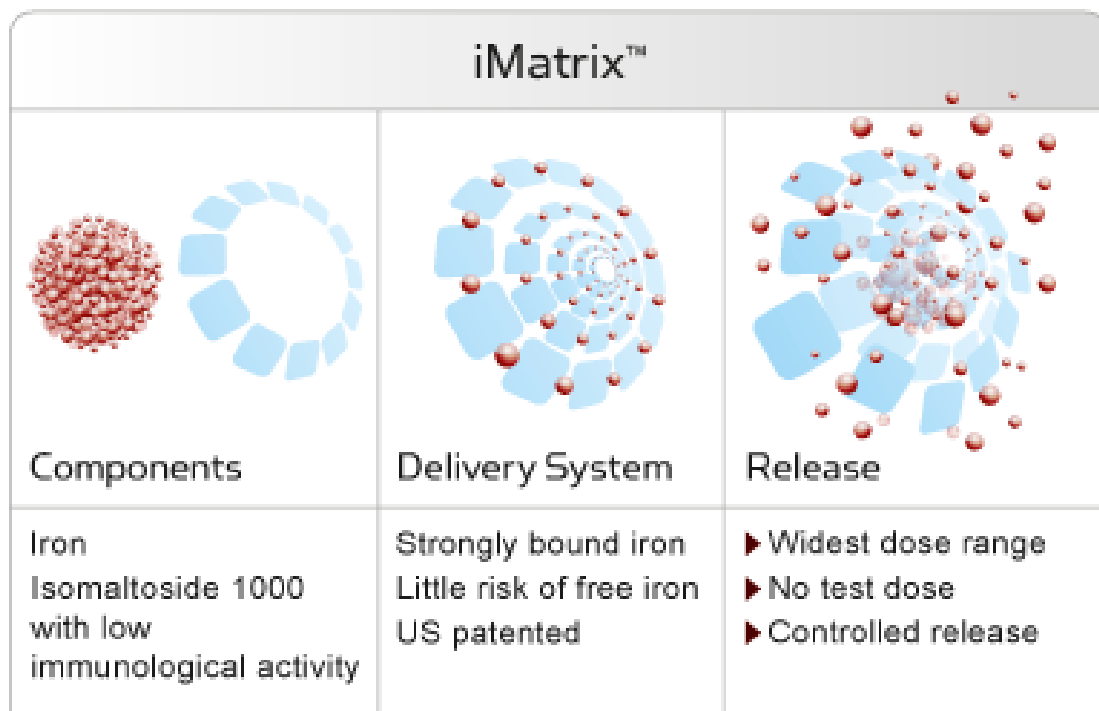
Η ανταπόκριση (αύξηση αιμοσφαιρίνης >2 g/dL) ήταν υψηλότερη στους ασθενείς που έλαβαν ΚΣ, την εβδομάδα 2 ($P < 0.01$) και την εβδομάδα 4 ($P < 0.05$). Οι ασθενείς αυτοί είχαν μικρότερο ποσοστό αποχώρησης από τη μελέτη εξαιτίας ανεπιθύμητων αντιδράσεων (1.5% έναντι 7.9%, $P < 0.05$). Στη δεύτερη μελέτη²⁶⁰, η αποτελεσματικότητα και ασφάλεια προτυποποιημένων σταθερών δόσεων ΚΣ ($n=240$) συγκρίθηκε με κατά περίπτωση υπολογισμένες δόσεις ΣΣ ($n=235$), σε αναιμία λόγω ΙΦΕΝ. Ο μέσος όρος εγχύσεων ήταν 2.1 ± 0.6 για τον ΚΣ και 5.8 ± 1.6 για τον ΣΣ ($P < 0.005$). Το ποσοστό ανταπόκρισης την εβδομάδα 12 ήταν 65.8% στην ομάδα ΚΣ και 53.6% στην ομάδα ΣΣ ($P = 0.004$). Την εβδομάδα αυτή το ποσοστό των ασθενών που δεν ήταν αναιμικοί ήταν μεγαλύτερο στην ομάδα του ΚΣ (72.8% έναντι 61.8%, $P = 0.015$). Η πλήρης συμμόρφωση στη θεραπεία ήταν μεγαλύτερη στην ομάδα του ΚΣ (92.5% έναντι 79.1%, $P < 0.01$). Δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στις ανεπιθύμητες ενέργειες ανάμεσα στις δύο ομάδες (13.9% έναντι 11.3%, $P = 0.41$).

5.3.3.5. Ισομαλτοζικός σίδηρος (ΙΣ)

Μία νέα, προσφάτως εγκριθείσα, μορφή ΕΦ σιδήρου είναι ο ΙΣ, μία μορφή αρκετά παρόμοια με τον ΚΣ. Ο ΙΣ είναι ένα κολλοειδές με το σίδηρο προσδεμένο σε γραμμικά ολιγομερή υδατάνθρακα, που συνδεόμενα μεταξύ τους δημιουργούν μία τρισδιάστατη δομή που μοιάζει στη φερριτίνη, μειώνοντας έτσι την τοξικότητα και τον ελεύθερο ανόργανο 3σθενή σίδηρο, επιτρέποντας την ελεγχόμενη και αργή αποδέσμευση του σιδήρου προς τις δεσμευτικές πρωτεΐνες²⁶¹ (εικόνα 2). Ο σίδηρος είναι διαθέσιμος σε μη-ιονική υδατοδιαλυτή μορφή, σε διάλυμα με pH μεταξύ 5 και 7. Ο χρόνος ημίσειας ζωής για τον ελεύθερο σίδηρο είναι 5 ώρες και 20 ώρες για τον ολικό σίδηρο (ελεύθερο & δεσμευμένο). Λόγω χαμηλής τοξικότητας, ο ΙΣ μπορεί να χορηγηθεί σε υψηλές δόσεις, μικρό χρόνο και χωρίς να απαιτείται δοκιμαστική δόση. Θεραπευτική απάντηση αναμένεται σε μερικές ημέρες, ενώ η φερριτίνη φθάνει τη μέγιστη τιμή της σε 7-9 ημέρες²⁶². Λόγω μεγέθους του συμπλόκου, ο ΙΣ δεν αποβάλλεται δια των νεφρών. Ο ΙΣ μπορεί να χορηγηθεί:

- Ως ΕΦ ένεση 100-200 mg, έως 3 φορές/εβδομάδα (μέχρι 50 mg/min)
- ΕΦ έγχυση 200-1000 mg, μία φορά/εβδομάδα, με ρυθμό
 - 0-5 mg/Kg σε 15 λεπτά
 - 6-10 mg/Kg σε 30 λεπτά
 - 11-20 mg/Kg σε 60 λεπτά
 - >20 mg/Kg θα πρέπει να χορηγείται σε 2 επισκέψεις, με διάστημα μίας εβδομάδας μεταξύ τους.

Σε μελέτη ασφάλειας και αποτελεσματικότητας²⁶³, σε 182 ασθενείς με χρόνια νεφρική νόσο, δεν παρατηρήθηκαν αναφυλακτικές ή καθυστερημένες αλλεργικές αντιδράσεις ή άλλες σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες. Ο ΙΣ ήταν κλινικά καλά ανεκτός, ασφαλής και αποτελεσματικός. Ενθαρρυντικά αποτελέσματα προέκυψαν και από άλλη συγκριτική με τα άλλα σκευάσματα σιδήρου, μελέτη²⁶⁴, όπου ο ΙΣ εμφάνισε χαμηλή ανοσογονικότητα και χαμηλό ποσοστό ελεύθερου ανόργανου σιδήρου. Ο ΙΣ φαίνεται να έχει πολύ καλό οικονομολογικό προφίλ, μειώνοντας το κόστος χορήγησης ΕΦ σιδήρου²⁶⁵. Ο παράγοντας πάντως είναι ακόμη υπό αξιολόγηση και αναμένονται μεγαλύτερες και εκτενέστερες μελέτες.



Εικόνα 2. Η δομή του συστήματος μεταφοράς και αποδέσμευσης του ισομαλτοζικού σιδήρου. (Πηγή: www.monofer.com)

5.3.3.6. Ferumoxytol

Το ferumoxytol είναι ένα σύμπλοκο σιδήρου με polyglucose sorbitol carboxymethylether, που εγκρίθηκε από τον FDA το 2009 για τη θεραπεία της ΣΠΑ σε ασθενείς με χρόνια νεφρική νόσο. Το σκεύασμα δίνει τη δυνατότητα ταχείας χορήγησης (<1 λεπτό) μέχρι και 510 mg σιδήρου^{266,267}. Ωστόσο, μετά την πρόσληψή του από το ΔΕΣ, έχει δειχθεί ότι- εξαιτίας των ισχυρών παραμαγνητικών ιδιοτήτων του- αλλοιώνει την απεικόνιση της μαγνητικής τομογραφίας (MT) μέχρι και 3 μήνες μετά τη χορήγησή του^{267,268}. Λαμβάνοντας υπόψη την υψηλή χρησιμότητα της MT σε ασθενείς με ΙΦΕΝ^{269,270}, η ιδιότητά του αυτή είναι σημαντικό μειονέκτημα. Επί του παρόντος, το ferumoxytol δεν έχει αξιολογηθεί σε ασθενείς με ΙΦΕΝ.

5.4. Θεραπεία της ανεπαρκούς ερυθροποίησης^{271,272}

Η EPO είναι η κύρια ορμόνη που ελέγχει την ερυθροποίηση. Δρα στα προγονικά κύτταρα της ερυθράς σειράς στο μυελό των οστών και ελέγχει τον πολλαπλασιασμό τους, προάγει τη διαφοροποίησή τους και συντηρεί τη βιωσιμότητά τους καθώς διαφοροποιούνται^{273,274}. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η έκφραση της EPO είναι αντιστρόφως ανάλογη της οξυγόνωσης των ιστών και των επιπέδων αιμοσφαιρίνης, ενώ η σχέση μεταξύ βαθμού αναιμίας και απάντησης στην EPO είναι ημιλογαριθμική¹⁴. Η συγκέντρωση EPO μπορεί να αυξηθεί έως και 100 φορές, σε καταστάσεις σοβαρής αναιμίας, αν και αυτό δε συμβαίνει σε κάποιους ασθενείς²⁷⁵. Η μέτρηση των επιπέδων EPO έχει νόημα μόνο σε επίπεδα αιμοσφαιρίνης <10 g/dL¹³², ενώ επίπεδα EPO ιδιαίτερος χαμηλά για το βαθμό αναιμίας είναι ενδεικτικά ανεπαρκούς ερυθροποίησης, που εμπλέκεται στην AXN²⁷⁶. Σε ασθενείς με ΙΦΕΝ έχουν αναφερθεί υψηλότερα, σε σχέση με το γενικό πληθυσμό, επίπεδα EPO^{275,277,278}, ενώ στην αναιμία των ΙΦΕΝ, η παραγωγή EPO δεν αντιστοιχεί στο βαθμό αναιμίας^{45,179}.

Το θεραπευτικό αποτέλεσμα της EPO στηρίζεται στην αναστροφή της αντιπολλαπλασιαστικής δράσης των κυτταροκινών, παράλληλα με διέγερση της πρόσληψης σιδήρου και βιοσύνθεσης αίμης στους ερυθροβλάστες. Αντίστοιχα, πτωχή ανταπόκριση σε θεραπεία με ερυθροποιητικούς παράγοντες σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα προφλεγμονωδών κυτταροκινών και μικρή διαθεσιμότητα σιδήρου²⁷¹. Υπάρχουν περιορισμένα δεδομένα αναφορικά με την πιθανή επίδραση της θεραπείας με ερυθροποιητικούς παράγοντες και τη διόρθωση της αναιμίας στην πορεία της υποκείμενης νόσου, ειδικά από τη στιγμή που η epoetin μπορεί να ασκήσει επιπρόσθετες βιολογικές δράσεις, όπως εμπλοκή με τον καταρράκτη μετάδοσης σήματος των κυτταροκινών. Χορήγηση EPO σε ποντίκια έδειξε να μειώνει το βαθμό κολίτιδας από DNBS, υποδεικνύοντας πιθανή χρησιμότητα στη θεραπεία των ΙΦΕΝ²⁷⁹. Επιπλέον, η EPO μπορεί να βελτιώσει την επούλωση της αναστόμωσης μετά από χειρουργική επέμβαση στο παχύ έντερο, αυξάνοντας τον αριθμό των ινοβλαστών και επιταχύνοντας την αγγειογένεση²⁸⁰.

5.4.1. Ερυθροποιητικοί παράγοντες (πίνακας 3)

5.4.1.1. Ανασυνδυασμένη ανθρώπινη EPO (recombinant human EPO, rHuEPO)

Υπάρχουν δύο μορφές rHuEPO: η epoetin-a και η epoetin-b. Μετά την απομόνωση της ανθρώπινης EPO σε ούρα ασθενών με απλαστική αναιμία το 1977²⁸¹, το γονίδιο της ανθρώπινης EPO ταυτοποιήθηκε και κλωνοποιήθηκε το 1983²⁸², άνοιξε ο δρόμος για την ευρείας κλίμακας παραγωγή rHuEPO, με χρήση τεχνικών γενετικής μηχανικής. Η epoetin συνδέεται στο διμερή υποδοχέα EPO στην επιφάνεια των ερυθροβλαστών και οδηγεί σε δομική μετατροπή του. Η μετατροπή αυτή με τη σειρά της επάγει τη φωσφορυλίωση τυροσίνης από την κινάση JaK-2 σε μία πλειάδα ενδοκυττάρων μορίων, όπως ο STAT-5, τα οποία ενεργοποιούν τη μεταγραφή και μετάφραση του γονιδίου EPO στον πυρήνα του κυττάρου²⁸³. Η ενεργοποίηση των μονοπατιών αυτών προάγει τον πολλαπλασιασμό και αναστέλλει την απόπτωση των προγονικών κυττάρων της ερυθράς σειράς²⁸⁴. Η epoetin είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στη διέγερση της ερυθροποίησης^{27,45,285,286}, ενώ φαίνεται να παρουσιάζει και ένα εύρος άλλων πλειοτροπικών ιδιοτήτων, όπως προστασία των ιστών του νευρικού συστήματος, μυοκαρδίου, νεφρών, εντέρου και αρθρώσεων²⁸⁷. Η epoetin απαιτεί χορήγηση με συχνότητα 3 φορές/εβδομάδα.

5.4.1.2. Darbepoetin alpha (DPO-α)

Η ανάγκη για δημιουργία αναλόγων της EPO με μεγαλύτερη διάρκεια δράσης, άρα και αραιότερα διαστήματα χορήγησης, με την ίδια όμως βιολογική δράση, οδήγησε στη σύνθεση της DPO-α²⁸⁸. Η DPO-α έχει 5 αλυσίδες υδατανθράκων προσδεμένες σε άζωτο, σε σύγκριση με την ενδογενή και την ανασυνδυασμένη EPO, που έχουν τρεις. Και τα 3 μόρια έχουν επιπλέον και μία μονήρη αλυσίδα υδατανθράκων, προσδεμένη σε οξυγόνο²⁸⁹. Το MB της DPO-α είναι 37.1 kDa, σε σύγκριση με 30.4 kDa της EPO, και ο χρόνος ημίσειας ζωής της μετά ΕΦ χορήγηση είναι 25.3 ώρες, τριπλάσιος από τις 8.5 ώρες της epoetin-a, ενώ και ο χρόνος κάθαρσής της από το πλάσμα είναι 4 φορές μεγαλύτερος²⁹⁰. Αυτό επιτρέπει την αραιότερη χορήγηση, με μία ένεση την εβδομάδα ή και πιο αραιά²⁹¹.

| Half-life (h) | Periodicity | | Initial dose | Target levels |
|---------------|-------------|-----|----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| | iv | sc | | |
| Epoetin β | 9 | 24 | 1-3 times per week 100-150 IU/kg per week, (max 300 IU /kg) | |
| Epoetin α | 7 | 20 | 1-3 times per week 100-150 IU/kg per week, (max 300 IU /kg) | Hemoglobin: 11-12 g/dL, Hematocrit: 33%-36% |
| Darbepoetin α | 25 | 48 | Every 1-2 wk 0.45 µg/kg every 2 wk | ↑ hemoglobin every 2 wk: 0.5-1 g/dL |
| CERA | 133 | 137 | Every 2-4 wk 0.6 µg/kg every 2 wk | |

Πίνακας 3. Διαθέσιμοι ερυθροποιητικοί παράγοντες (Πηγή: αναφορά 272)

5.4.1.3. Συνεχής ενεργοποιητής του υποδοχέα EPO (continuous EPO receptor activator, CERA)

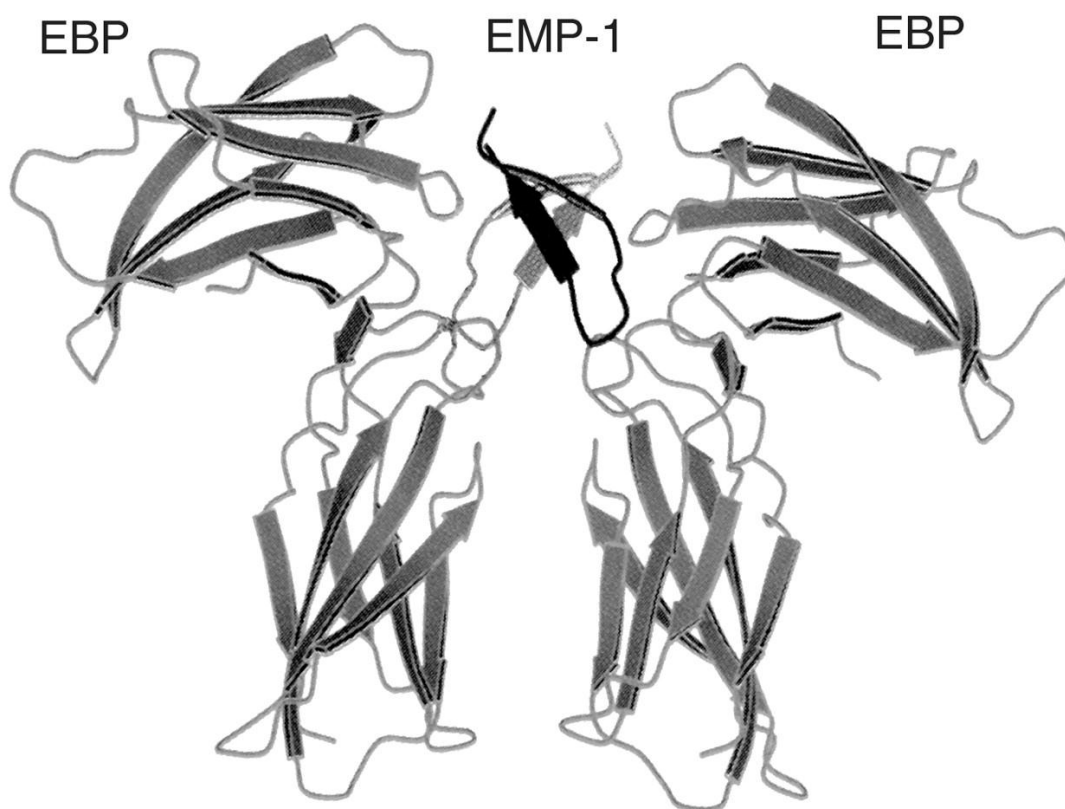
Ο CERA είναι ένας άλλος ερυθροποιητικός παράγοντας που κυκλοφόρησε την προηγούμενη δεκαετία και προκαλεί επανειλημμένη διέγερση του υποδοχέα της EPO^{292,293}. Το μόριό του προκύπτει από την ενσωμάτωση μίας αλυσίδας πολυμερούς (methoxy-polyethylene-glycol) μεγέθους 30 kDa, στο μόριο της EPO, διπλασιάζοντας έτσι το MB, οδηγώντας σε επιμήκυνση του χρόνου ημίσειας ζωής στις 130 ώρες. Ο παράγοντας αυτός μπορεί να χορηγείται με ασφάλεια κάθε 3-4 εβδομάδες²⁹⁴⁻²⁹⁷. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει αποτέλεσμα παρόμοιο με της EPO, στη σταθεροποίηση των επιπέδων αιμοσφαιρίνης²⁹⁸⁻³⁰³.

5.4.1.4. Ανάλογα EPO νέας γενιάς

Η νέα γενιά αναλόγων της EPO περιλαμβάνει τη synthetic erythropoiesis protein και πεπτίδια μιμητικά της EPO. Οι παράγοντες αυτοί δρουν μέσω ενεργοποίησης του υποδοχέα EPO³⁰⁴⁻³⁰⁷ (εικόνα 3). Το hematide είναι ένα συνθετικό πεπτίδιο-αγωνιστής του υποδοχέα EPO, και αν και δεν έχει δομική αναλογία με την EPO, έχει την ιδιότητα να διεγείρει τον υποδοχέα και να επάγει την ερυθροποίηση για διάστημα μεγαλύτερο του ενός μήνα, με καλή ανοχή και σταθερότητα σε θερμοκρασία δωματίου³⁰⁴.

5.4.2. Η επίδραση της θεραπείας με ερυθροποιητικούς παράγοντες στην αναιμία των ΙΦΕΝ

Η αποτελεσματικότητα και ασφάλεια της θεραπείας με EPO στην ανθεκτική αναιμία των ΙΦΕΝ έχει μελετηθεί σε διάφορες μελέτες^{18,27,45,308,309}. Οι Horina και συν.¹⁸ δοκίμασαν πρώτοι τέτοια θεραπεία σε 3 ασθενείς με μακροχρόνιο ιστορικό ΙΦΕΝ και χρόνια, ανθεκτική αναιμία. Παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των τιμών αιμοσφαιρίνης και στους 3 ασθενείς. Οι Gasche και συν.¹⁷ σε μία μελέτη που συνέκρινε τη μονοθεραπεία με ΕΦ σίδηρο με τη συνδυασμένη θεραπεία με ΕΦ σίδηρο και EPO, για 5 εβδομάδες, παρατήρησαν ότι η αύξηση των επιπέδων αιμοσφαιρίνης ήταν μεγαλύτερη στην ομάδα που έλαβε και EPO, συγκριτικά με την ομάδα που έλαβε μόνο σίδηρο (5 g/dL έναντι 2 g/dL, αντίστοιχα). Η υπεροχή της συνδυαστικής θεραπείας επιβεβαιώθηκε και από μία άλλη διπλή-τυφλή μελέτη⁴⁵, όπου βρέθηκε ότι η rHuEPO ήταν αποτελεσματική σε ασθενείς με αναιμία ανθεκτική σε από του στόματος σίδηρο.



Εικόνα 3. Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου του εξωκυττάριου τμήματος του υποδοχέα EPO (EBP) με το EPO-mimetic peptide 1 (EMP-1). (Πηγή: Farrell, F. et al. *Oncologist* 2004;9(Suppl 5):18-30)

Σε μία άλλη, ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο, μελέτη²⁷, σε ασθενείς με NC και αναιμία ανθεκτική σε σίδηρο από το στόμα, η θεραπεία με ΕΦ και EPO είχε σαν αποτέλεσμα μεγαλύτερη και ταχύτερη διόρθωση της αιμοσφαιρίνης, απ' ό τι μόνο ο ΕΦ σίδηρος. Η θεραπεία με EPO φαίνεται να είναι ασφαλής και αποτελεσματική και σε παιδιά με ΙΦΕΝ και ανθεκτική αναιμία³⁰⁸.

Στην πρώτη μελέτη που διερεύνησε την επίδραση της DPO-α στην ανθεκτική αναιμία ασθενών με ΙΦΕΝ, επιβεβαιώθηκε η αύξηση των επιπέδων αιμοσφαιρίνης, μετά από χορήγηση ΣΣ με DPO-α, ενώ η αραιότερη χορήγηση της ένεσης ήταν πιο φιλική για τους ασθενείς³¹⁰. Παράλληλα, έχει δειχθεί ότι η επιτυχής αντιμετώπιση της αναιμίας των ΙΦΕΝ με EPO, βελτιώνει τη ζωτικότητα και το επίπεδο ζωής των ασθενών, καθώς βελτιώνει τους δείκτες ευζωίας, ψυχολογικής διάθεσης, σωματικής ικανότητας και κοινωνικής δραστηριότητας και ελαττώνει την ανάγκη μεταγγίσεων αίματος^{27,311-313}.

5.4.3. Ανεπιθύμητες ενέργειες (ΑΕ) των ερυθροποιητικών παραγόντων

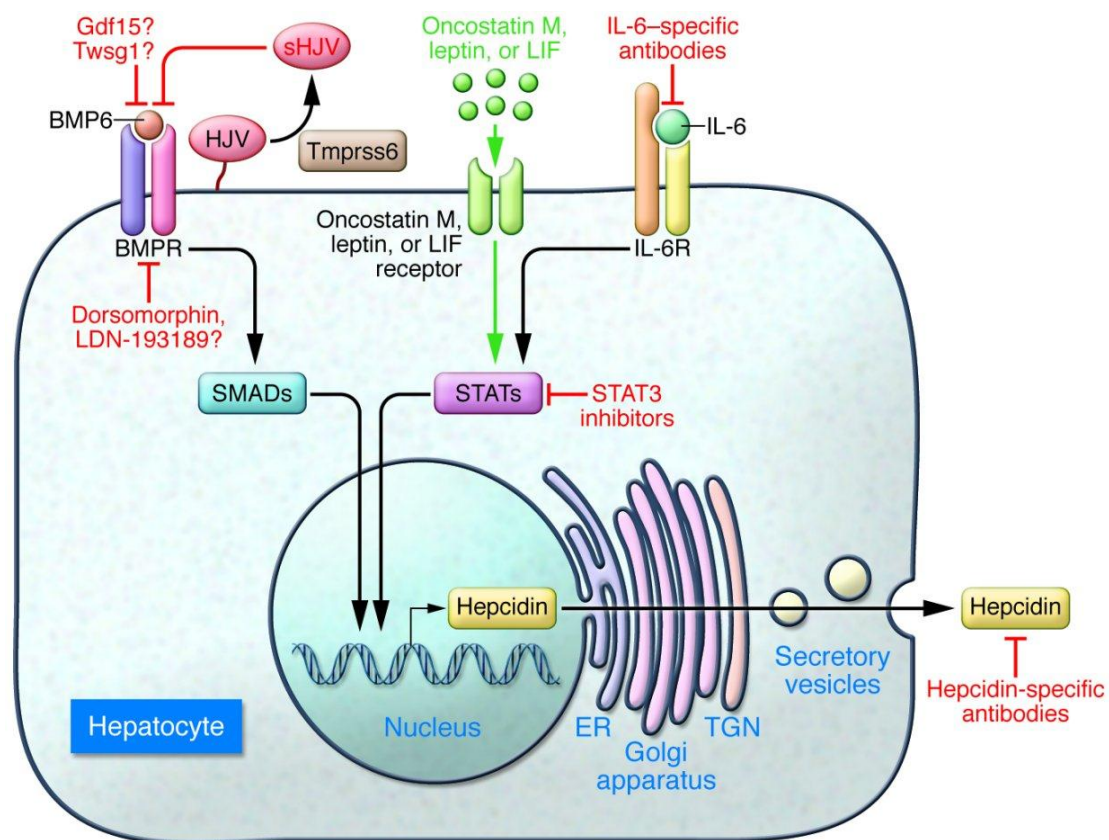
Η χρήση των ερυθροποιητικών παραγόντων σχετίζεται με διάφορες ΑΕ. Η υπέρταση είναι η συχνότερη ΑΕ, με συχνότητα 5-24%³¹⁴. Η αγγειακή θρόμβωση είναι επίσης συχνή^{315,316}, αν και δεν ανευρίσκεται σε άλλες μικρές μελέτες^{317,318}. Ο κίνδυνος σοβαρών καρδιαγγειακών συμβαμάτων, όπως θρομβοεμβολικό επεισόδιο και θάνατος, αυξάνει όταν τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης αυξάνονται ταχέως (>1 g/dL κάθε 2 εβδομάδες)³¹⁹. Η ανάπτυξη αντισωμάτων έναντι της ΕΡΟ είναι μία σπάνια αλλά σοβαρή επιπλοκή της θεραπείας με ερυθροποιητικούς παράγοντες. Από το 1998 έως το 2004, υπήρξε μία σημαντική αύξηση των ασθενών που εμφάνισαν αμιγή απλασία των ερυθρών (pure red-cell aplasia, PRCA), δευτεροπαθώς λόγω σχηματισμού εξουδετερωτικών αντι-ΕΡΟ αντισωμάτων^{320,321}. Η PRCA χαρακτηρίζεται από σοβαρή αναιμία, ανάγκη πολλών μεταγγίσεων και πλήρη απουσία ανταπόκρισης σε αυξανόμενες δόσεις rHuEPO. Η PRCA αποδόθηκε στην αντικατάσταση της ανθρώπινης αλβουμίνης από polysorbate 80 (λόγω του κινδύνου ανάπτυξης σπογγώδους εγκεφαλοπάθειας των βοοειδών) κατά την κατασκευή του φαρμάκου και στο συνακόλουθο σχηματισμό μικκυλίων υψηλής ανοσογονικότητας, πιθανώς εξαιτίας της αλληλεπίδρασής του με το ακάλυπτο ελαστικό τμήμα των προγεμισμένων συριγγών³²²⁻³²⁴. Ήδη από το 2007, το φαινόμενο έχει εκλείψει. Άλλες πιθανές ΑΕ των ερυθροποιητικών παραγόντων είναι οίδημα, εμπύρετο, ζάλη, κεφαλαλγία, αϋπνία, κνησμός και δυσκοιλιότητα.

5.5. Άλλες θεραπευτικές προσεγγίσεις- Θεραπεία της αναιμίας χρόνιας νόσου

Οι ανταγωνιστές της hepcidin αναμένεται να ωφελήσουν ασθενείς με νοσήματα υπερέκφρασης της ορμόνης αυτής, που εκδηλώνονται με εικόνα συστηματικής ΣΠΑ, σε έδαφος ΑΧΝ³²⁵. Διάφορες προσεγγίσεις έχουν λάβει χώρα σχετικά με την ανάπτυξη ανταγωνιστών της hepcidin (εικόνα 4). Ένα αντίσωμα που εξουδετερώνει τη hepcidin έχει ήδη χρησιμοποιηθεί επιτυχώς σε ένα μοντέλο αναιμίας της φλεγμονής, σε ποντίκια³²⁶. Πέρα από την απευθείας εμπλοκή στη δράση της hepcidin, έχουν περιγραφεί και άλλοι παράγοντες που στοχεύουν μονοπάτια ρύθμισης της παραγωγής hepcidin. Η Dorsomorphin, ένα μικρομοριακός αναστολέας της σηματοδότησης BMP, φαίνεται ότι αναστέλλει την επαγωγή της hepcidin από το σίδηρο, *in vivo*³²⁷. Η διαλυτή HJV (Hemojuveline), δρώντας επίσης ως ανταγωνιστής της σηματοδότησης BMP, ελάττωσε τη βασική έκφραση hepcidin σε ποντίκια και ταυτόχρονα αύξησε το ηπατικό φορτίο σιδήρου³²⁸. Επιπροσθέτως, μερικές τρέχουσες θεραπείες μπορεί να δρουν εν μέρει μέσω μείωσης της παραγωγής hepcidin. Θεραπείες έναντι των κυτταροκινών, όπως το anti-IL6 αντίσωμα, έχει φανεί ότι καταστέλλουν την παραγωγή hepcidin και βελτιώνουν την αναιμία^{329,330}. Μερικοί διεγερτικοί της ερυθροποίησης παράγοντες, όπως οι αναστολείς της propyl hydroxylase, θα μπορούσαν επίσης να είναι αποτελεσματικοί καταστολείς της hepcidin, όχι μόνο επάγοντας την ερυθροποίηση, αλλά και επηρεάζοντας το μονοπάτι του HIF³³¹.

Σε μία πολύ πρόσφατη μελέτη³³² πειραματικής κολίτιδας, μέσω μεταφοράς T-κυττάρων, σε ποντίκια, δοκιμάστηκε η αναστολή της hepcidin με 3 διαφορετικούς παράγοντες: 1) HJV.Fc, μία ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη που εμποδίζει την σύνδεση των BMPs στον υποδοχέα τους, 2) LDN-193189, ένα μικρό οργανικό μόριο, ανάλογο της dorsomorphin, που αναστέλλει τη μεταγωγή του BMP σήματος, και 3) ένα anti-BMP6 αντίσωμα. Φάνηκε ότι όλοι οι παράγοντες ανέστειλαν την έκφραση της hepcidin και αύξησαν τα επίπεδα σιδήρου στον ορό. Επίσης, οδήγησαν σε μέτρια μείωση της έκφρασης φλεγμονωδών κυτταροκινών στο παχύ έντερο. Φαίνεται ότι η αναστολή της έκφρασης της hepcidin μπορεί να διορθώσει την αναιμία των IFEN και να ελαττώσει τη βαρύτητα της εντερικής φλεγμονής. Παρόμοια αποτελέσματα επετεύχθησαν, τόσο σε ζωικά μοντέλα όσο και σε κυτταρική σειρά ανθρώπινου ηπατώματος, με τη χρήση του LDN-193189, αλλά και δύο ανταγωνιστών του BMP-ligand: noggin και ALK3-Fc^{333,334}. Εν τέλει, οι παράγοντες αναστολής της hepcidin φαίνεται ότι αποτελούν μία πολλά υποσχόμενη νέα κατηγορία φαρμακολογικών παραγόντων, που συμβάλλουν

αποτελεσματικά στην αντιμετώπιση της αναιμίας που συνοδεύει τις ΙΦΕΝ, γεγονός που αναμένεται να επιβεβαιωθεί σε μελλοντικές, μεγαλύτερες μελέτες.



Εικόνα 4. Πιθανά μονοπάτια στα οποία η έκφραση και η ενεργότητα της hepcidin μπορούν να τροποποιηθούν φαρμακολογικά. (Πηγή: Bartnikas TB, Fleming MD. J Clin Invest. 2010;120:4187-4190)

Βιβλιογραφία

Η αναιμία στις
Ιδιοπαθείς
Φλεγμονώδεις Εντερικές
Νόσους

Μέρος 2ο



1. Kulnigg S, Gasche C. Systematic review: managing anaemia in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;24:1507–1523.
2. de la Morena F, Gisbert JP. Anemia and inflammatory bowel disease. *Rev Esp Enferm Dig.* 2008;100:285–293.
3. Schreiber S, Wedel S. Diagnosis and treatment of anemia in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 1997;3:204–216.
4. Gasche C. Complications of inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology.* 2000;47:49–56.
5. Wilson A, Reyes E, Ofman J. Prevalence and outcomes of anemia in inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. *Am J Med.* 2004;116(Suppl 7A):44S–49S.
6. Gasche C. Anemia in IBD: the overlooked villain. *Inflamm Bowel Dis.* 2000;6:142–150.
7. Gasche C, Lomer MC, Cavill I, Weiss G. Iron, anaemia, and inflammatory bowel diseases. *Gut.* 2004;53:1190–1197.
8. Pizzi LT, Weston CM, Goldfarb NI, Moretti D, Cobb N, Howell JB, Infantolino A, Dimarino AJ, Cohen S. Impact of chronic conditions on quality of life in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2006;12:47–52.
9. Wells CW, Lewis S, Barton JR, Corbett S. Effects of changes in hemoglobin level on quality of life and cognitive function in inflammatory bowel disease patients. *Inflamm Bowel Dis.* 2006;12:123–130.
10. Beutler E, Waalen J. The definition of anemia: what is the lower limit of normal of the blood hemoglobin concentration? *Blood.* 2006;107:1747–50.
11. Perry GS, Byers T, Yip R, et al. Iron nutrition does not account for the hemoglobin differences between blacks and whites. *J Nutr.* 1992;122:1417–1424.
12. WHO, UNICEF, UNU. Iron Deficiency Anemia: Assessment, Prevention and Control. Report of a joint WHO/UNICEF/UNU consultation. Geneva: World Health Organization; 1998.
13. Gasche C, Berstad A, Befrits R, Beglinger C, Dignass A, Erichsen K, Gomollon F, Hjortswang H, Koutroubakis I, Kulnigg S, Oldenburg B, Rampton D, Schroeder O, Stein J, Travis S, Van Assche G. Guidelines on the diagnosis and management of iron deficiency and anemia in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:1545–1553.

14. Weiss G, Goodnough LT. Anemia of chronic disease. *N Engl J Med*. 2005;352:1011–1023.
15. Semrin G, Fishman DS, Bousvaros A, Zholudev A, Saunders AC, Correia CE, Nemeth E, Grand RJ, Weinstein DA. Impaired intestinal iron absorption in Crohn's disease correlates with disease activity and markers of inflammation. *Inflamm Bowel Dis*. 2006;12:1101–1106.
16. Oldenburg B, Koningsberger JC, Van Berge Henegouwen GP, Van Asbeck BS, Marx JJ. Iron and inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2001;15:429–438.
17. Gasche C, Reinisch W, Lochs H, et al. Anemia in Crohn's disease. Importance of inadequate erythropoietin production and iron deficiency. *Dig Dis Sci*. 1994;39:1930–1934.
18. Horina JH, Petritsch W, Schmid CR, et al. Treatment of anemia in inflammatory bowel disease with recombinant human erythropoietin: results in three patients. *Gastroenterology*. 1993;104:1828–1831.
19. Lomer MC, Kodjabashia K, Hutchinson C, et al. Intake of dietary iron is low in patients with Crohn's disease: a case-control study. *Br J Nutr*. 2004;91:141–148.
20. de Silva AD, Mylonaki M, Rampton DS. Oral iron therapy in inflammatory bowel disease: usage, tolerance, and efficacy. *Inflamm Bowel Dis*. 2003;9:316–320.
21. Gisbert JP, Gomollón F. Common misconceptions in the diagnosis and management of anemia in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2008;103:1299–1307.
22. Taffet SL, Das KM. Sulfasalazine. Adverse effects and desensitization. *Dig Dis Sci*. 1983;28:833–842.
23. Haas JD, Brownlie T 4th. Iron deficiency and reduced work capacity: a critical review of the research to determine a causal relationship. *J Nutr*. 2001;131:676S–688S.
24. Goodnough LT, Nissenson AR. Anemia and its clinical consequences in patients with chronic diseases. *Am J Med*. 2004;116 Suppl 7A:1S–2S.
25. Kulnigg S, Teischinger L, Dejaco C, Waldhör T, Gasche C. Rapid recurrence of IBD-associated anemia and iron deficiency after intravenous iron sucrose and erythropoietin treatment. *Am J Gastroenterol*. 2009;104:1460–1467.

26. Leitgeb C, Pecherstorfer M, Fritz E, Ludwig H. Quality of life in chronic anemia of cancer during treatment with recombinant human erythropoietin. *Cancer*. 1994;73:2535–2542.
27. Gasché C, Dejaco C, Waldhoer T, Tillinger W, Reinisch W, Fueger GF, Gangl A, Lochs H. Intravenous iron and erythropoietin for anemia associated with Crohn disease. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med*. 1997;126:782–787.
28. Romberg-Camps MJ, Bol Y, Dagnelie PC, Hesselink-van de Kruijs MA, Kester AD, Engels LG, van Deursen C, Hameeteman WH, Pierik M, Wolters F, Russel MG, Stockbrügger RW. Fatigue and health-related quality of life in inflammatory bowel disease: results from a population-based study in the Netherlands: the IBD-South Limburg cohort. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16:2137–47.
29. Gomollon F, Gisbert JP. Anemia and inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*. 2009;15:4659–65.
30. Bambach CP, Hill GL. Long term nutritional effects of extensive resection of the small intestine. *Aust N Z J Surg*. 1982;52:500–506.
31. Beeken WL. Absorptive defects in young people with regional enteritis. *Pediatrics*. 1973;52:69–74.
32. Beeken WL. Remediable defects in Crohn disease: a prospective study of 63 patients. *Arch Intern Med*. 1975;135:686–690.
33. Burbige EJ, Huang SH, Bayless TM. Clinical manifestations of Crohn's disease in children and adolescents. *Pediatrics*. 1975;55:866–871.
34. Dyer NH, Child JA, Mollin DL, Dawson AM. Anaemia in Crohn's disease. *Q J Med*. 1972;41:419–436.
35. Ebinger M, Leidl R, Thomas S, Von Tirpitz C, Reinshagen M, Adler G, König HH. Cost of outpatient care in patients with inflammatory bowel disease in a German University Hospital. *J Gastroenterol Hepatol*. 2004;19:192–199.
36. Ershler WB, Chen K, Reyes EB, Dubois R. Economic burden of patients with anemia in selected diseases. *Value Health*. 2005;8:629–638.
37. Greenstein AJ, Kark AE, Dreiling DA. Crohn's disease of the colon. II. Controversial aspects of hemorrhage, anemia and rectal involvement in granulomatous disease involving the colon. *Am J Gastroenterol*. 1975;63:40–48.

38. Harries AD, Fitzsimons E, Dew MJ, Heatley RV, Rhodes J. Association between iron deficiency anaemia and mid-arm circumference in Crohn's disease. *Hum Nutr Clin Nutr.* 1984;38:47–53.
39. Hoffbrand AV, Stewart JS, Booth CC, Mollin DL. Folate deficiency in Crohn's disease: incidence, pathogenesis, and treatment. *Br Med J.* 1968;2:71–75.
40. Lakatos L, Pandur T, David G, Balogh Z, Kuronya P, Tollas A, Lakatos PL. Association of extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease in a province of western Hungary with disease phenotype: results of a 25-year follow-up study. *World J Gastroenterol.* 2003;9:2300–2307.
41. Niv Y, Abukasis G. Prevalence of ulcerative colitis in the Israeli kibbutz population. *J Clin Gastroenterol.* 1991;13:98–101.
42. Niv Y, Torten D, Tamir A, Epstein L. Incidence and prevalence of ulcerative colitis in the upper Galilee, Northern Israel, 1967-1986. *Am J Gastroenterol.* 1990;85:1580–1583.
43. Reilly J, Ryan JA, Strole W, Fischer JE. Hyperalimentation in inflammatory bowel disease. *Am J Surg.* 1976;131:192–200.
44. Revel-Vilk S, Tamary H, Broide E, Zoldan M, Dinari G, Zahavi I, Yaniv I, Shamir R. Serum transferrin receptor in children and adolescents with inflammatory bowel disease. *Eur J Pediatr.* 2000;159:585–589.
45. Schreiber S, Howaldt S, Schnoor M, Nikolaus S, Bauditz J, Gasché C, Lochs H, Raedler A. Recombinant erythropoietin for the treatment of anemia in inflammatory bowel disease. *N Engl J Med.* 1996;334:619–623.
46. Vijverman A, Piront P, Belaiche J, Louis E. Evolution of the prevalence and characteristics of anemia in inflammatory bowel diseases between 1993 and 2003. *Acta Gastroenterol Belg.* 2006;69:1–4.
47. Walker AM, Szneke P, Bianchi LA, Field LG, Sutherland LR, Dreyer NA. 5-Aminosalicylates, sulfasalazine, steroid use, and complications in patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol.* 1997;92:816–820.
48. Werlin SL, Grand RJ. Severe colitis in children and adolescents: diagnosis. Course, and treatment. *Gastroenterology.* 1977;73:828–832.
49. Gomollón F, Gisbert JP. Anemia and inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol.* 2009;15:4659-65.
50. Bergamaschi G, Di Sabatino A, Albertini R, Ardizzone S, Biancheri P, Bonetti E, Cassinotti A, Cazzola P, Markopoulos K, Massari A, Rosti V, Porro GB, Corazza GR. Prevalence and pathogenesis of anemia in inflammatory bowel

- disease. Influence of anti-tumor necrosis factor-alpha treatment. *Haematologica*. 2010;95:199-205.
51. Bager P, Befrits R, Wikman O, Lindgren S, Moum B, Hjortswang H, Dahlerup JF. The prevalence of anemia and iron deficiency in IBD outpatients in Scandinavia. *Scand J Gastroenterol*. 2011;46:304-9.
 52. Goodhand JR, Kamperidis N, Rao A, Laskaratos F, McDermott A, Wahed M, Naik S, Croft NM, Lindsay JO, Sanderson IR, Rampton DS. Prevalence and management of anemia in children, adolescents, and adults with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;doi: 10.1002/ibd.21740.
 53. de Vizia B, Poggi V, Conenna R, Fiorillo A, Scippa L. Iron absorption and iron deficiency in infants and children with gastrointestinal diseases. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1992;14:21–26.
 54. Ormerod TP. Observations on the incidence and cause of anaemia in ulcerative colitis. *Gut*. 1967;8:107–114.
 55. Ormerod TP. Anaemia in ulcerative colitis. *Proc R Soc Med*. 1968;61:931.
 56. Weiss G, Gasche C. Pathogenesis and treatment of anemia in inflammatory bowel disease. *Haematologica*. 2010;95:175-178.
 57. Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell*. 2010; 142: 24-38.
 58. De Domenico I, McVey Ward D, Kaplan J. Regulation of iron acquisition and storage: Consequences for iron-linked disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008; 9: 72-81.
 59. Siah CW, Ombiga J, Adams LA, et al. Normal iron metabolism and the physiopathology of iron overload disorders. *Clin Biochem Rev* 2006;27:5–16.
 60. Muñoz M, Villar I, García-Erce JA. An update on iron physiology. *World J Gastroenterol* 2009;15:4617–26.
 61. Andrews NC. Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med* 1999;341:1986–95.
 62. Fleming RE, Bacon BR. Orchestration of iron homeostasis. *N Engl J Med* 2005;352:1741–4.
 63. Muñoz M, García-Erce JA, Remacha AF. Disorders of iron metabolism. Part 1: molecular basis of iron homeostasis. *J Clin Pathol*. 2011;64:281-6.
 64. Marignani M, Angeletti S, Bordi C, et al. Reversal of long-standing iron deficiency anaemia after eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol* 1997;32:617–22.

65. Krishnamurthy P, Xie T, Schuetz JD. The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis. *Pharmacol Ther* 2007;114:345–58.
66. Andrews NC. Understanding heme transport. *N Engl J Med* 2005;353:2508–9.
67. Zhang AS, Enns CA. Molecular mechanisms of normal iron homeostasis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009:207–14.
68. Crichton RR, Danielsson BG, Geisser P. Iron therapy with special emphasis on intravenous administration. Bremen: UNI-Med Verlag AG, 2008:pp 14-23.
69. Andrews NC. Forging a field: the golden age of iron biology. *Blood* 2008;112:219–30.
70. Sheftel AD, Zhang A, Brown C, et al. Direct interorganellar transfer of iron from endosome to mitochondrion. *Blood* 2007;110:125–32.
71. Imlay JA, Chin SM, Linn S. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the fenton reaction in vivo and in vitro. *Science* 1988;240:640–2.
72. Nemeth E, Ganz T. The role of hepcidin in iron metabolism. *Acta Haematol.* 2009;122:78-86.
73. Aisen P, Enns C, Wessling-Resnick M. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33:940–59.
74. Singh B, Arora S, Agrawal P, Gupta SK. Hepcidin: a novel peptide hormone regulating iron metabolism. *Clin Chim Acta.* 2011;412:823-30.
75. Krause A, Nietz S, Magert HJ, et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett* 2000;480:147–50.
76. Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 2001;276:7806–10.
77. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 2001;276:7811–9.
78. Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest* 2002;110:1037–44.
79. Valore EV, Ganz T. Posttranslational processing of hepcidin in human hepatocytes is mediated by the prohormone convertase furin. *Blood Cells Mol Dis.* 2008;40:132–138.
80. Peslova G, Petrak J, Kuzelova K, Hrdy I, Halada P, Kuchel PW, Soe-Lin S, Ponka P, Sutak R, Becker E, Huang ML, Suryo RY, Richardson DR, Vyoral D.

- Hepcidin, the hormone of iron metabolism, is bound specifically to alpha-2-macroglobulin in blood. *Blood*. 2009;113:6225–6236.
81. Ganz T, Olbina G, Girelli D, Nemeth E, Westerman M. Immunoassay for human serum hepcidin. *Blood*. 2008;112:4292–4297.
 82. Rivera S, Nemeth E, Gabayan V, Lopez MA, Farshidi D, Ganz T. Synthetic hepcidin causes rapid dose-dependent hypoferremia and is concentrated in ferroportin-containing organs. *Blood*. 2005;106:2196–2199.
 83. Hunter HN, Fulton DB, Ganz T, Vogel HJ. The solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis. *J Biol Chem* 2002;277:37597–603.
 84. Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, et al. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:8780–5.
 85. Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, et al. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *PNAS* 2002;99:4596–601.
 86. Ramey G, Deschemin JC, Durel B, et al. Hepcidin targets ferroportin for degradation in hepatocytes. *Haematologica* 2010;95:501–4.
 87. Camaschella C. BMP6 orchestrates iron metabolism. *Nat Genet* 2009;41:386–8.
 88. Zhang AS, Gao J, Koeberl DD, et al. The role of hepatocyte hemojuvelin in the regulation of bone morphogenic protein-6 and hepcidin expression in vivo. *J Biol Chem* 2010;285:16416–23.
 89. Lin L, Goldberg YP, Ganz T. Competitive regulation of hepcidin mRNA by soluble and cell-associated hemojuvelin. *Blood* 2005;106:2884–9.
 90. Gao J, Chen J, Kramer M, et al. Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferrin receptor 2 is required for transferrin-induced hepcidin expression. *Cell Metab* 2009;9:217–27.
 91. Schmidt PJ, Toran PT, Giannetti AM, et al. The transferrin receptor modulates Hfe-dependent regulation of hepcidin expression. *Cell Metab* 2008;7:205–14.
 92. Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Gastroenterology* 2010;139:393–408.
 93. Lee PL, Beutler E. Regulation of hepcidin and iron-overload disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2009;4:489–515.
 94. Ryan JD, Ryan E, Fabre A, et al. Defective bone morphogenic protein signalling underlies hepcidin deficiency in HFE hereditary hemochromatosis. *Hepatology* 2010;52:1266–73.

95. Silvestri L, Pagani A, Nai A, et al. The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *Cell Metab* 2008;8:502–11.
96. Finberg KE, Heeney MM, Campagna DR, et al. Mutations in TMPRSS6 cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). *Nat Genet* 2008;40:569–71.
97. Melis MA, Cau M, Congiu R, et al. A mutation in the TMPRSS6 gene, encoding a transmembrane serine protease that suppresses hepcidin production, in familial iron deficiency anemia refractory to oral iron. *Haematologica* 2008;93:1473–9.
98. Huang H, Constante M, Layoun A, et al. Contribution of STAT3 and SMAD4 pathways to the regulation of hepcidin by opposing stimuli. *Blood* 2009;113:3593–9.
99. Ashby DR, Gale DP, Busbridge M, et al. Erythropoietin administration in humans causes a marked and prolonged reduction in circulating hepcidin. *Haematologica* 2010;95:505–8.
100. Weiss G, Houston T, Kastner S, et al. Regulation of cellular iron metabolism by erythropoietin: activation of iron-regulatory protein and up-regulation of transferrin receptor expression in erythroid cells. *Blood* 1997;89:680–7.
101. Tanno T, Bhanu NV, Oneal PA, et al. High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat Med* 2007;13:1096–101.
102. Tanno T, Porayette A, Orapan S, et al. Identification of TWSG1 as a second novel erythroid regulator of hepcidin expression in murine and human cells. *Blood* 2009;114:181–6.
103. Peyssonnaud C, Zinkernagel AS, Schuepbach RA, et al. Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *J Clin Invest* 2007;117:1926–32.
104. Shah YM, Matsubara T, Ito S, et al. Intestinal hypoxia-inducible transcription factors are essential for iron absorption following iron deficiency. *Cell Metab* 2009;9:152–64.
105. Andolfo I, De Falco L, Asci R, et al. Regulation of Divalent Metal Transporter 1 (DMT1) non-IRE isoform by the microRNA Let-7d in erythroid cells. *Haematologica* 2010;95:1244–52.

106. Iolascon A, De Falco L, Beaumont C. Molecular basis of inherited microcytic anemia due to defects in iron acquisition or heme synthesis. *Haematologica* 2009;94:395–408.
107. Delaby C, Pilard N, Puy H, et al. Sequential regulation of ferroportin expression after erythrophagocytosis in murine macrophages: early mRNA induction by haem, followed by irondependent protein expression. *Biochem J* 2008;411:123–31.
108. Marro S, Chiabrando D, Messana E, et al. Heme controls ferroportin1 (FPN1) transcription involving Bach1, Nrf2 and a MARE/ARE sequence motif at position -7007 of the FPN1 promoter. *Haematologica* 2010;95:1261–8.
109. De Domenico I, Vaughn MB, Li L, et al. Ferroportin-mediated mobilization of ferritin iron precedes ferritin degradation by the proteasome. *Embo J* 2006;25:5396–404.
110. Kong WN, Zhao SE, Duan XL, et al. Decreased DMT1 and increased ferroportin I expression in the mechanisms of reduced iron retention in macrophages by erythropoietin in rats. *J Cell Biochem* 2008;104:629–41.
111. Auriac A, Willemetz A, Canonne-Hergaux F. Lipid raft-dependent endocytosis: a new route for hepcidin-mediated regulation of ferroportin in macrophages. *Haematologica* 2010;95:1269–77.
112. Chaston T, Chung B, Mascarenhas M, et al. Evidence for differential effects of hepcidin in macrophages and intestinal epithelial cells. *Gut* 2008;57:374–82.
113. Gasche C. Anemia in inflammatory bowel diseases. Bremen: UNI-MED, 2008: pp 46-47.
114. Eckardt KU, Kurtz A. Regulation of erythropoietin production. *Eur J Clin Invest.* 2005;35 Suppl 3:13-9.
115. Ebert BL, Bunn HF. Regulation of the erythropoietin gene. *Blood.* 1999;94:1864-77.
116. Jelkmann W. Molecular biology of erythropoietin. *Intern Med.* 2004;43:649-59.
117. Ratcliffe PJ. From erythropoietin to oxygen: hypoxia-inducible factor hydroxylases and the hypoxia signal pathway. *Blood Purif.* 2002;20:445-50.
118. Smyth JF, Boogaerts MA, Ehmer BRM, Nowrousian MR, Kasper C, Oberhoff C, et al. Pathophysiology of cancer-related anemia. In: Smyth JF,

- Boogaerts MA, Ehmer BRM, eds. rhErythropoietin in cancer supportive treatment. New York: Marcel Dekker, 1996:13–34.
119. Weiss G. Iron metabolism in the anemia of chronic disease. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1790:682-93.
120. Means RT Jr. Recent developments in the anemia of chronic disease. *Curr Hematol Rep*. 2003;2:2116–121.
121. Wang CQ, Udupa KB, Lipschitz DA. Interferon-gamma exerts its negative regulatory effect primarily on the earliest stages of murine erythroid progenitor cell development. *J Cell Physiol*. 1995;162: 134–138.
122. Taniguchi S, Dai CH, Price JO, Krantz SB. Interferon gamma downregulates stem cell factor and erythropoietin receptors but not insulin-like growth factor-I receptors in human erythroid colony-forming cells. *Blood*. 1997;90:2244–2252.
123. Maciejewski JP, Selleri C, Sato T, Cho HJ, Keefer LK, Nathan CF, Young N.S. Nitric oxide suppression of human hematopoiesis in vitro. Contribution to inhibitory action of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *J Clin Investig*. 1995;96:1085–1092.
124. Testa U. Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis. *Leukemia*. 2004;18:1176-1199.
125. Gasche C. Anemia in inflammatory bowel diseases. Bremen: UNI-MED, 2008: pp 39-40.
126. Zermati Y, Varet B, Hermine O. TGF-beta1 drives and accelerates erythroid differentiation in the epo-dependent UT-7 cell line even in the absence of erythropoietin. *Exp Hematol* 2000; 28: 256-266.
127. Gibellini D, Bassini A, Re MC et al. Stroma-derived factor 1alpha induces a selective inhibition of human erythroid development via the functional upregulation of Fas/CD95 ligand. *Br J Haematol* 2000; 111: 432-440.
128. Graziadei I, Gaggl S, Kaserbacher R, Braunsteiner H, Vogel W. The acute-phase protein alpha 1-antitrypsin inhibits growth and proliferation of human early erythroid progenitor cells (burst-forming units-erythroid) and of human erythroleukemic cells (K562) in vitro by interfering with transferrin iron uptake. *Blood*. 1994;83:260–268.
129. Weiss G, Graziadel I, Urbanek M, Grunewald K, Vogel W. Divergent effects of alpha 1-antitrypsin on the regulation of iron metabolism in human

- erythroleukaemic (K562) and myelomonocytic (THP-1) cells. *Biochem J.* 1996;319 (Pt 3):897–902.
130. Broxmeyer HE. H-ferritin: a regulatory cytokine that down-modulates cell proliferation. *J Lab Clin Med.* 1992;120:367–370.
131. Rodriguez RM, Corwin HL, Gettinger A, Corwin MJ, Gubler D, Pearl RG. Nutritional deficiencies and blunted erythropoietin response as causes of the anemia of critical illness. *J Crit Care.* 2001;16:36–41.
132. Miller CB, Jones RJ, Piantadosi S, Abeloff MD, Spivak J. Decreased erythropoietin response in patients with the anemia of cancer. *N Engl J Med.* 1990; 322:1689–1692.
133. Cazzola M, Ponchio L, de Benedetti F, Ravelli A, Rosti V, Beguin Y, Invernizzi R, Barosi G, Martini A. Defective iron supply for erythropoiesis and adequate endogenous erythropoietin production in the anemia associated with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *Blood.* 1996;87:4824–4830.
134. Theurl I, Mattle V, Seifert M, Mariani M, Marth C, Weiss G. Dysregulated monocyte iron homeostasis and erythropoietin formation in patients with anemia of chronic disease. *Blood.* 2006;107:4142–4148.
135. Jelkmann W. Proinflammatory cytokines lowering erythropoietin production. *J Interferon Cytokine Res.* 1998;18:555–559.
136. Means RT Jr, Krantz SB. Inhibition of human erythroid colony-forming units by gamma interferon can be corrected by recombinant human erythropoietin. *Blood.* 1991;78:2564–2567.
137. Minoo P, Zadeh MM, Rottapel R, Lebrun JJ, Ali S. A novel SHP-1/Grb2- dependent mechanism of negative regulation of cytokine-receptor signaling: contribution of SHP-1 C-terminal tyrosines in cytokine signaling. *Blood.* 2004;103: 1398–1407.
138. E. Metzen, W. Jelkmann, Erythropoietin and erythropoiesis, In: G. Weiss, V. Gordeuk, C. Hershko (Eds.), *Anemia of Chronic Disease*, Taylor and Francis, New York, 2005, pp. 61–86.
139. Raja KB, O Latunde-Dada G, Peters TJ. Role of interleukin-6 in hypoxic regulation of intestinal iron absorption. *Br J Haematol* 2005;131:656–62.
140. Wrighting DM, Andrews NC. Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood* 2006;108:3204–9.

141. Wessling-Resnick M. Iron homeostasis and the inflammatory response. *Annu Rev Nutr* 2010;30:18.1-18.18.
142. Weinstein DA, Roy CN, Fleming MD, et al. Inappropriate expression of hepcidin is associated with iron refractory anemia: implications for the anemia of chronic disease. *Blood* 2002;100:3776–81.
143. Zhang K, Shen X, Wu J, et al. Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. *Cell* 2006;124:587–99.
144. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 2007;449:819–26.
145. Jansson K, Redler B, Truedsson L, et al. Intraperitoneal cytokine response after major surgery: higher postoperative intraperitoneal versus systemic cytokine levels suggest the gastrointestinal tract as the major source of the postoperative inflammatory reaction. *Am J Surg* 2004;187:372–7.
146. Franke A, Lante W, Fackeldey V, et al. Pro-inflammatory cytokines after different kinds of cardio-thoracic surgical procedures: is what we see what we know? *Eur J Cardiothorac Surg* 2005;28:569–75.
147. Muñoz M, García-Vallejo JJ, Sempere JM, et al. Acute phase response and cytokine release in patients undergoing lumbar spinal surgery: modulation by perioperative treatment with naproxen and famotidine. *Eur Spine J* 2004;13:367–73.
148. Van Iperen CE, Kraaijenahgen RJ, Biesma DH, et al. Iron metabolism and erythropoiesis after surgery. *Br J Surg* 1998;85:41–5.
149. Theurl I, Aigner E, Theurl M, et al. Regulation of iron homeostasis in anemia of chronic disease and iron deficiency anemia: diagnostic and therapeutic implications. *Blood* 2009;113:5277–86.
150. Oppenheimer SJ. Iron and its relation to immunity and infectious disease. *J Nutr* 2001;131:616S–35S.
151. Scrimshaw NS, SanGiovanni JP. Synergism of nutrition, infection, and immunity: an overview. *Am J Clin Nutr* 1997;66:464S–77S.
152. Bellamy MC, Gednaey JA. Unrecognised iron deficiency in critical illness. *Lancet* 1998;352:1903.
153. Van Iperen CE, Gaillard CA, Kraaijenhagen RJ, et al. Response of erythropoiesis and iron metabolism to recombinant human erythropoietin in intensive care unit patients. *Crit Care Med* 2000;28:2773–8.

154. Hamilton LD, Gubler CJ, Cartwright GE, Wintrobe MM. Diurnal variation in the plasma iron level of man. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1964;61:44.
155. Speck B. Diurnal variation of serum iron and the latent iron binding capacity in normal adults. *Helv Med Acta* 1968;34:231.
156. Fairbanks VF, Beutler E. Iron deficiency. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Eds. *Williams Hematology*, 5th edn. USA: McGraw-Hill, 1995: 498.
157. Zilva JF, Patston VJ. Variations in serum-iron in healthy women. *Lancet* 1966;1:459-62.
158. Fujino M, Dawson EB, Holeman T, McGanity WJ. Interrelationships between estrogenic activity, serum iron and ascorbic acid levels during the menstrual cycle. *Am J Clin Nutr.* 1966;18:256-60.
159. Cartwright GE. The anemia of chronic disorders. *Semin Hematol.* 1966;3:351-75.
160. Bainton DF, Finch CA. The diagnosis of iron deficiency anemia. *Am J Med.* 1964;37:62-70.
161. Banerjee RN, Narang RM. Haematological changes in malignancy. *Br J Haematol.* 1967;13:829-43.
162. Handjani AM, Banihashemi A, Rafiee R, Tolou H. Serum iron in acute myocardial infarction. *Blut.* 1971;23:363-6.
163. Syrkis I, Machtey I. Hypoferremia in acute myocardial infarction. *J Am Geriatr Soc.* 1973;21:28-30.
164. Laboratory evaluation of iron status. In: Crichton RR, Danielson BG, Geisser P. *Iron therapy with special emphasis on intravenous administration*, 3rd edn. Bremen: UNI-MED, 2008: 26-29.
165. Walters GO, Miller FM, Worwood M. Serum ferritin concentration and iron stores in normal subjects. *J Clin Pathol.* 1973;26:770-772.
166. Guyatt GH, Oxman AD, Ali M, Willan A, McIlroy W, Patterson C. Laboratory diagnosis of iron-deficiency anemia: an overview. *J Gen Intern Med.* 1992;7:145-153.
167. Mast AE, Blinder MA, Gronowski AM, Chumley C, Scott MG. Clinical utility of the soluble transferrin receptor and comparison with serum ferritin in several populations. *Clin Chem.* 1998;44:45-51.
168. Kis AM, Carnes M. Detecting iron deficiency in anemic patients with concomitant medical problems. *J Gen Intern Med.* 1998;13:455-461.

169. Sawhney MS, Lipato T, Nelson DB, Lederle FA, Rector TS, Bond JH. Should patients with anemia and low normal or normal serum ferritin undergo colonoscopy? *Am J Gastroenterol*. 2007;102:82–88.
170. Coenen JL, vanDieijen-Visser MP, van Pelt J, van Deursen CT, Fickers MM, van Wersch JW, Brombacher PJ. Measurements of serum ferritin used to predict concentrations of iron in bone marrow in anemia of chronic disease. *Clin Chem* 1991; 37: 560-563.
171. Koulaouzidis A, Said E, Cottier R, Saeed AA. Soluble transferrin receptors and iron deficiency, a step beyond ferritin. A systematic review. *J Gastrointestin Liver Dis*. 2009;18:345-52.
172. Guagnozzi D, Severi C, Ialongo P, Viscido A, Patrizi F, Testino G, Vanella L, Labriola R, Strom R, Caprilli R. Ferritin as a simple indicator of iron deficiency in anemic IBD patients. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:150-151.
173. Lee KM, Sartor RB. Oral iron potentiates immune-mediated colitis in IL-10 deficient mice. *Gastroenterol*. 2007;132:A701.
174. Kasvosve I, Delanghe J. Total iron binding capacity and transferrin concentration in the assessment of iron status. *Clin Chem Lab Med*. 2002;40:1014-8.
175. Hawkins RC. Total iron binding capacity or transferrin concentration alone outperforms iron and saturation indices in predicting iron deficiency. *Clin Chim Acta*. 2007;380:203-7.
176. Shek CC, Swaminathan R. A cost effective approach to the biochemical diagnosis of iron deficiency. *J Med*. 1990;21:313-22.
177. Withold W, Neumayer C, Beyrau R, Heins M, Schauseil S, Rick W. Efficacy of transferrin determination in human sera in the diagnosis of iron deficiency. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. 1994;32:19-25.
178. Ravindran V, Jain S, Mathur DS. The differentiation of anaemia in rheumatoid arthritis: parameters of iron-deficiency in an Indian rheumatoid arthritis population. *Rheumatol Int*. 2008;28:507-11.
179. Gasche C, Waldhoer T, Feichtenschlager T, Male C, Mayer A, Mittermaier C, Petritsch W. Prediction of response to iron sucrose in inflammatory bowel disease-associated anemia. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2382-2387.

180. Stein J, Hartmann F, Dignass AU. Diagnosis and management of iron deficiency anemia in patients with IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010;7:599-610.
181. Wish JB. Assessing iron status: beyond serum ferritin and transferrin saturation. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2006;1:S4-8.
182. Fishbane S, Kowalski EA, Imbriano LJ, Maesaka JK: The evaluation of iron status in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 1996;7:2654–2657.
183. Tessitore N, Solero GP, Lippi G, Bassi A, Faccini GB, Bedogna V, Gammaro L, Brocco G, Restivo G, Bernich P, Lupo A, Maschio G: The role of iron status markers in predicting response to intravenous iron in haemodialysis patients on maintenance erythropoietin. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:1416–1423.
184. Kalantar-Zadeh K, Hoffken B, Wunsch H, Fink H, Kleiner M, Luft FC: Diagnosis of iron deficiency anemia in renal failure patients during the post-erythropoietin era. *Am J Kidney Dis* 1995;26:292–299.
185. Clark SF. Iron deficiency anemia: diagnosis and management. *Curr Opin Gastroenterol*. 2009;25:122–128.
186. Beguin Y. Soluble transferrin receptor for the evaluation of erythropoiesis and iron status. *Clin Chim Acta* 2003;329:9–22.
187. Thomas L, Thomas C. Anemia in iron deficiency and disorders of iron metabolism. *Dtsch Med Wochenschr* 2002;127:1591–1594.
188. Fernandez-Rodriguez AM, Guindeo-Casasús MC, Molero-Labarta T, Domínguez-Cabrera C, Hortal-Cascón L, Pérez-Borges P, Vega-Díaz N, Saavedra-Santana P, Palop-Cubillo L. Diagnosis of iron deficiency in chronic renal failure. *Am J Kidney Dis* 1999;34:508–513.
189. Hanif E, Ayyub M, Anwar M, Ali W, Bashir M. Evaluation of serum transferrin receptor concentration in diagnosing and differentiating iron deficiency anaemia from anaemia of chronic disorders. *J Pak Med Assoc* 2005;55:13-6.
190. Jain S, Narayan S, Chandra J, Sharma S, Jain S, Malhan P. Evaluation of serum transferrin receptor and sTfR ferritin indices in diagnosing and differentiating iron deficiency anemia from anemia of chronic disease. *Indian J Pediatr* 2010;77:179-83.
191. Punnonen K, Irjala K, Rajamaki A. Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency. *Blood* 1997;89:1052–7.

192. Semrin G, Fishman DS, Bousvaros A, Zholudev A, Saunders AC, Correia CE, Nemeth E, Grand RJ, Weinstein DA. Impaired intestinal iron absorption in Crohn's disease correlates with disease activity and markers of inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:1101–1106.
193. Arnold J, Sangwaiya A, Bhatkal B, Geoghegan F, Busbridge M. Hepcidin and inflammatory bowel disease: dual role in host defence and iron homeostasis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009;21:425–429.
194. Oustamanolakis P, Koutroubakis IE, Messaritakis I, Malliaraki N, Sfiridaki A, Kouroumalis EA. Serum hepcidin and prohepcidin concentrations in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2011;23:262-268.
195. Kroot JJ, Kemna EH, Bansal SS, Busbridge M, Campostrini N, Girelli D, Hider RC, Koliaraki V, Mamalaki A, Olbina G, Tomosugi N, Tselepis C, Ward DG, Ganz T, Hendriks JC, Swinkels DW. Results of the first international round robin for the quantification of urinary and plasma hepcidin assays: need for standardization. *Haematologica* 2009;94:1748–1752.
196. Luukkonen S, Punnonen K. Serum pro-hepcidin concentrations and their responses to oral iron supplementation in healthy subjects manifest considerable inter-individual variation, *Clin Chem Lab Med* 2006;44:1361–1362.
197. Beirão I, Almeida S, Swinkels D, Costa PM, Moreira L, Fonseca I, Freitas C, Cabrita A, Porto G. Low serum levels of prohepcidin, but not hepcidin-25, are related to anemia in familial amyloidosis TTR V30M. *Blood Cells Mol Dis* 2008;41:175-8.
198. Kaya Z, Yildiz E, Gursel T, Albayrak M, Kocak U, Karadeniz C, Dalgic B. Serum prohepcidin levels in children with solid tumors, inflammatory bowel disease and iron deficiency anaemia. *J Trop Pediatr* 2010. Epub ahead of print.
199. Nagy J, Lakner L, Poor V, Pandur E, Mozsik G, Miseta A, Sipos K. Serum prohepcidin levels in chronic inflammatory bowel diseases. *J Crohns Colitis* 2010;4:649–653.
200. Sasu BJ, Li H, Rose MJ, Arvedson TL, Doellgast G, Molineux G. Serum hepcidin but not prohepcidin may be an effective marker for anemia of inflammation (AI). *Blood Cells Mol Dis* 2010;45:238–245.
201. Briggs C. Quality counts: new parameters in blood cell counting. *Int J Lab Hematol*. 2009;31:277-97.

202. Bessman JD, Gilmer PR, Gardner FH. Improved classification of anemias by MCV and RDW. *Am J Clin Pathol* 1983;80:322-326.
203. Buttarello M, Plebani M. Automated blood cell counts: state of the art. *Am J Clin Pathol* 2008;130:104-16.
204. Brittenham GM, Koepke JA. Red blood cell volume distributions and the diagnosis of anemia: help or hindrance? *Arch Pathol Lab Med* 1987;111:1146-1148.
205. Cakal B, Akoz AG, Ustundag Y, Yalinkilic M, Ulker A, Ankarali H. Red cell distribution width for assessment of activity of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci.* 2009;54:842-847.
206. Clarke K, Sagunathy R, Kansal S. RDW as an additional marker in inflammatory bowel disease/undifferentiated colitis. *Dig Dis Sci* 2008;53:2521-2523.
207. Oustamanolakis P, Koutroubakis IE, Messaritakis I, Kefalogiannis G, Niniraki M, Kouroumalis EA. Measurement of reticulocyte and red blood cell indices in the evaluation of anemia in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis.* 2011;5:295-300.
208. Hörl WH, Cavill I, MacDougall IC, Schaefer RM, Sunder-Plassmann G. How to diagnose and correct iron deficiency during r-huEPO therapy--a consensus report. *Nephrol Dial Transplant.* 1996;11:246-50.
209. Schaefer RM, Schaefer L. The hypochromic red cell: a new parameter for monitoring of iron supplementation during rhEPO therapy. *J Perinat Med.* 1995;23:83-88.
210. Chuang CL, Liu RS, Wei YH, Huang TP, Tarng DC. Early prediction of response to intravenous iron supplementation by reticulocyte haemoglobin content and high-fluorescence reticulocyte count in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2003;18:370-377.
211. Metzgeroth G, Hastka J. Diagnostic work-up of iron deficiency. *J Lab Med* 2004;28:391-399.
212. Scrimgeour AG, Condlin ML. Zinc and micronutrient combinations to combat gastrointestinal inflammation. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2009;12:653-660.
213. Davis BH. Report on the ISLH-sponsored immature reticulocyte fraction (IRF) workshop. *Lab Hematol* 1997;3:261-263.

214. Urrechaga E. Clinical utility of the new Beckman-coulter parameter red blood cell size factor in the study of erythropoiesis. *Int J Lab Hematol* 2009;31:623-629.
215. Urrechaga E, Borque L, Escanero JF. Analysis of reticulocyte parameters on the Sysmex XE 5000 and LH 750 analyzers in the diagnosis of inefficient erythropoiesis. *Int J Lab Hematol* 2011;33:37-44.
216. Beckman-Coulter bulletin 9618: Research use only (RUO) options for Coulter LH series hematology systems. Beckman Coulter Inc, 2006. www.beckmancoulter.com
217. Schroder O, Mickisch O, Seidler U, et al. Intravenous iron sucrose versus oral iron supplementation for the treatment of iron deficiency anemia in patients with inflammatory bowel disease—a randomized, controlled, open-label, multicenter study. *Am J Gastroenterol*. 2005;100:2503–2509.
218. Erichsen K, Ulvik RJ, Nysaeter G, et al. Oral ferrous fumarate or intravenous iron sucrose for patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2005;40:1058 –1065.
219. Erichsen K, Hausken T, Ulvik RJ, et al. Ferrous fumarate deteriorated plasma antioxidant status in patients with Crohn disease. *Scand J Gastroenterol*. 2003;38:543–548.
220. Gasche C, Dejaco C, Reinisch W, et al. Sequential treatment of anemia in ulcerative colitis with intravenous iron and erythropoietin. *Digestion*. 1999;60:262–267.
221. Cucino C, Sonnenberg A. Cause of death in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2001;7:250 –255.
222. Ali M, Rigolosi R, Fayemi AO, et al. Failure of serum ferritin levels to predict bone-marrow iron content after intravenous iron-dextran therapy. *Lancet*. 1982;1:652– 655.
223. Ganzoni AM. Intravenous iron-dextran: therapeutic and experimental possibilities. *Schweiz Med Wochenschr*. 1970;100:301–303.
224. Zhu A, Kaneshiro M, Kaunitz JD. Evaluation and treatment of iron deficiency anemia: a gastroenterological perspective. *Dig Dis Sci*. 2010;55:548–559.
225. Rimon E, et al. Are we giving too much iron? Low-dose iron therapy is effective in octogenarians. *Am J Med*. 2005;118:1142–1147.

226. Zhou SJ, Gibson RA, Crowther CA, Makrides M. Should we lower the dose of iron when treating anaemia in pregnancy? A randomized dose-response trial. *Eur J Clin Nutr.* 2009;63:183–190.
227. Hurrell R, Egli I. Iron bioavailability and dietary reference values. *Am J Clin Nutr.* 2010;91:1461S–1467S.
228. Haig A, Driman DK. Iron-induced mucosal injury to the upper gastrointestinal tract. *Histopathology.* 2006;48:808–812.
229. Kaye P, et al. Iron-induced mucosal pathology of the upper gastrointestinal tract: a common finding in patients on oral iron therapy. *Histopathology.* 2008;53: 311–317.
230. Carrier J, Aghdassi E, Platt I, Cullen J, Allard JP. Effect of oral iron supplementation on oxidative stress and colonic inflammation in rats with induced colitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2001;15:1989–1999.
231. Carrier J, Aghdassi E, Cullen J, Allard JP. Iron supplementation increases disease activity and vitamin E ameliorates the effect in rats with dextran sulfate sodium-induced colitis. *J Nutr.* 2002;132:3146–3150.
232. Klopčič B, Chua A, Loh LL, Trinder D, Lawrance IC. Increased dietary iron increases the level of chronic intestine inflammation and the development of colonic tumorigenesis in the mouse. *Gastroenterology.* 2009;136:A90.
233. Aghdassi E, Carrier J, Cullen J, Tischler M, Allard JP. Effect of iron supplementation on oxidative stress and intestinal inflammation in rats with acute colitis. *Dig Dis Sci.* 2001;46:1088–1094.
234. Seril DN, et al. Dietary iron supplementation enhances DSS-induced colitis and associated colorectal carcinoma development in mice. *Dig Dis Sci.* 2002;47: 1266–1278.
235. Seril DN, Liao J, Yang CS, Yang GY. Systemic iron supplementation replenishes iron stores without enhancing colon carcinogenesis in murine models of ulcerative colitis: comparison with iron-enriched diet. *Dig Dis Sci.* 2005;50:696–707.
236. Troost FJ, et al. Iron supplements inhibit zinc but not copper absorption in vivo in ileostomy subjects. *Am J Clin Nutr.* 2003;78:1018–1023.
237. Bork K. Localized cutaneous siderosis following intramuscular iron injections. *Hautarzt.* 1984;35:598–599.
238. MacKinnon AE, Bancewicz J. Sarcoma after injection of intramuscular iron. *Br Med J.* 1973;2:277–279.

239. Greenberg G. Sarcoma after intramuscular iron injection. *Br Med J.* 1976;1:1508–1509.
240. Fielding J. Does sarcoma occur in man after intramuscular iron? *Scand J Haematol.* 1977;32:100–104.
241. Kaushansky K, Kipps T. in: Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (eds: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG.), McGraw-Hill Professional, Maidenhead, 2005: pp 1433–1466.
242. Auerbach M, Ballard H, Glaspy J. Clinical update: intravenous iron for anaemia. *Lancet* 2007;369:1502–1504.
243. Muñoz M, Gómez-Ramírez S, García-Erce JA. Intravenous iron in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2009;15:4666-74.
244. Aronoff GR. Safety of intravenous iron in clinical practice: implications for anemia management protocols. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15 Suppl 2:S99–S106.
245. Van Wyck DB. Labile iron: manifestations and clinical implications. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15 Suppl 2:S107–S111.
246. Crichton RR, Danielsson BG, Geisser P. Iron therapy with special emphasis on intravenous administration. 4th ed. Vol. 103. Bremen: UNI-Med Verlag AG; 2008: pp 58-79.
247. Silverstein SB, Rodgers GM. Parenteral iron therapy options. *Am J Hematol.* 2004;76:74–78.
248. Fishbane S, Kowalski EA. The comparative safety of intravenous iron dextran, iron saccharate, and sodium ferric gluconate. *Semin Dial.* 2000;13:381–384.
249. Danielson BG. Structure, chemistry, and pharmacokinetics of intravenous iron agents. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15 Suppl 2:S93–S98.
250. Macdougall IC. Experience with intravenous iron in nephrology. *Semin Hematol.* 2006;43:S9–S12.
251. Chertow GM, Mason PD, Vaage-Nilsen O, Ahlmén J. Update on adverse drug events associated with parenteral iron. *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21:378–382.
252. Bodemar G, Kechagias S, Almer S, Danielson BG. Treatment of anaemia in inflammatory bowel disease with iron sucrose. *Scand J Gastroenterol.* 2004;39:454–458.

253. Lindgren S, Wikman O, Befrits R, Blom H, Eriksson A, Granno C, Ung KA, Hjortswang H, Lindgren A, Unge P. Intravenous iron sucrose is superior to oral iron sulphate for correcting anaemia and restoring iron stores in IBD patients: A randomized, controlled, evaluator-blind, multicentre study. *Scand J Gastroenterol.* 2009;39:1–8.
254. Gisbert JP, Bermejo F, Pajares R, Pérez-Calle JL, Rodríguez M, Algaba A, Mancenido N, de la Morena F, Careros JA, McNicholl AG, et al. Oral and intravenous iron treatment in inflammatory bowel disease: Hematological response and quality of life improvement. *Inflamm Bowel Dis.* 2009;15:1485–1491.
255. Grau PW. Intravenous iron therapy. In: Beaumont C, Beris P, Beuzard Y, Brugnara C, editors. *Disorders of iron homeostasis, erythrocytes, erythropoiesis.* Paris: European School of Haematology; 2006. pp. 420–434.
256. Fletes R, Lazarus JM, Gage J, Chertow GM. Suspected iron dextran-related adverse drug events in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 2001;37:743–749.
257. Beshara S, Sørensen J, Lubberink M, Tolmachev V, Långström B, Antoni G, Danielson BG, Lundqvist H. Pharmacokinetics and red cell utilization of ⁵²Fe/⁵⁹Fe-labelled iron polymaltose in anaemic patients using positron emission tomography. *Br J Haematol.* 2003;120:853–859.
258. Food and Drugs Administration Center for Drug Evaluation and Research. Summary minutes of the Drug Safety and Risk Management Advisory Committee. February 1, 2008 [online] Available from: URL: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/08/minutes/2008-4337m1-Final.pdf>.
259. Kulnigg S, et al. A novel intravenous iron formulation for treatment of anemia in inflammatory bowel disease: the ferric carboxymaltose (FERINJECT) randomized controlled trial. *Am J Gastroenterol.* 2008;103:1182–1192.
260. Evstatiev R, Marteau P, Iqbal T, Khalif IL, Stein J, Bokemeyer B, Chohey IV, Gutzwiller FS, Riopel L, Gasche C; FERGI Study Group. FERGIcor, a Randomized Controlled Trial on Ferric Carboxymaltose for Iron Deficiency Anemia in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology.* 2011 Jun 12. [Epub ahead of print]
261. Locatelli F, Del Vecchio L. New erythropoiesis-stimulating agents and new iron formulations. *Contrib Nephrol.* 2011;171:255-60.

262. Gozzard D. When is high-dose intravenous iron repletion needed? Assessing new treatment options. *Drug Des Devel Ther.* 2011;5:51-60.
263. Wikström B, Bhandari S, Barany P, Kalra PA, Ladefoged S, Wilske J, Thomsen LL. Iron isomaltoside 1000: a new intravenous iron for treating iron deficiency in chronic kidney disease. *J Nephrol.* 2011 Jan 14. doi: 10.5301/JN.2011.6248. [Epub ahead of print]
264. Jahn MR, Andreasen HB, Fütterer S, Nawroth T, Schünemann V, Kolb U, Hofmeister W, Muñoz M, Bock K, Meldal M, Langguth P. A comparative study of the physicochemical properties of iron isomaltoside 1000 (Monofer®), a new intravenous iron preparation and its clinical implications. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011 Mar 23. [Epub ahead of print]
265. Bhandari S. A hospital-based cost minimization study of the potential financial impact on the UK health care system of introduction of iron isomaltoside 1000. *Ther Clin Risk Manag.* 2011;7:103-13.
266. Balakrishnan VS, et al. Physicochemical properties of ferumoxytol, a new intravenous iron preparation. *Eur J Clin Invest.* 2009;39:489–496.
267. Lu M, Cohen MH, Rieves D, Pazdur R. FDA report: ferumoxytol for intravenous iron therapy in adult patients with chronic kidney disease. *Am J Hematol.* 2010;85:315–319.
268. Coyne DW. Ferumoxytol for treatment of iron deficiency anemia in patients with chronic kidney disease. *Expert Opin Pharmacother.* 2009;10:2563–2568.
269. Bruining DH, Loftus EV Jr. Technology insight: new techniques for imaging the gut in patients with IBD. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2008;5:154–161.
270. Sinha R, et al. Role of MRI in Crohn's disease. *Clin Radiol.* 2009;64:341–352.
271. Tsiolakidou G, Koutroubakis IE. Stimulating erythropoiesis in inflammatory bowel disease associated anemia. *World J Gastroenterol.* 2007;13:4798-806.
272. Moreno López R, Sicilia Aladrén B, Gomollón García F. Use of agents stimulating erythropoiesis in digestive diseases. *World J Gastroenterol.* 2009;15:4675-85.
273. Eschbach JW, Adamson JW. Guidelines for recombinant human erythropoietin therapy. *Am J Kidney Dis.* 1989; 14: 2-8.

274. Jelkmann W. Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev.* 1992; 72: 449-489.
275. Tsitsika A, Stamoulakatou A, Kafritsa Y, Paleologos G, Panayotou I, Premetis E, Roma E, Papassotiriou I. Erythropoietin levels in children and adolescents with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2005; 27: 93-96.
276. Barosi G. Inadequate erythropoietin response to anemia: definition and clinical relevance. *Ann Hematol.* 1994; 68: 215-223.
277. Demirturk L, Hulagu S, Yaylaci M, Altin M, Ozel M. Serum erythropoietin levels in patients with severe anemia secondary to inflammatory bowel disease and the use of recombinant human erythropoietin in patients with anemia refractory to treatment. *Dis Colon Rectum.* 1995; 38: 896-897.
278. Kapsoritakis AN, Koukourakis MI, Sfiridaki A, Potamianos SP, Kosmadaki MG, Koutroubakis IE, Kouroumalis EA. Mean platelet volume: a useful marker of inflammatory bowel disease activity. *Am J Gastroenterol.* 2001; 96: 776-781.
279. Cuzzocrea S, Mazzon E, Di Paola R, Patel NS, Genovese T, Muia C, De Sarro A, Thiemermann C. Erythropoietin reduces the development of experimental inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004; 311: 1272-1280.
280. Fatouros MS, Vekinis G, Bourantas KL, Mylonakis EP, Scopelitou AS, Malamou-Mitsis VD, Kappas AM. Influence of growth factors erythropoietin and granulocyte macrophage colony stimulating factor on mechanical strength and healing of colonic anastomoses in rats. *Eur J Surg.* 1999; 165: 986-992.
281. Miyake T, Kung CK, Goldwasser E. Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem.* 1977; 252: 5558-5564.
282. Lin FK, Suggs S, Lin CH, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, Chen KK, Fox GM, Martin F, Stabinsky Z. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985; 82: 7580-7584.
283. Lacombe C, Mayeux P. The molecular biology of erythropoietin. *Nephrol Dial Transplant.* 1999; 14 Suppl 2: 22-28.
284. Koury MJ, Bondurant MC. Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. *Science.* 1990; 248: 378-381.

285. Chang J, Couture F, Young S, McWatters KL, Lau CY. Weekly epoetin alfa maintains hemoglobin, improves quality of life, and reduces transfusion in breast cancer patients receiving chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 2597-2605.
286. Witzig TE, Silberstein PT, Loprinzi CL, Sloan JA, Novotny PJ, Mailliard JA, Rowland KM, Alberts SR, Krook JE, Levitt R, Morton RF. Phase III, randomized, double-blind study of epoetin alfa compared with placebo in anemic patients receiving chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 2606-2617.
287. Kaltwasser JP, Kessler U, Gottschalk R, Stucki G, Moller B. Effect of recombinant human erythropoietin and intravenous iron on anemia and disease activity in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2001; 28: 2430-2436.
288. Egrie JC, Browne JK. Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *Br J Cancer*. 2001; 84 Suppl 1: 3-10.
289. Macdougall IC, Gray SJ, Elston O, Breen C, Jenkins B, Browne J, Egrie J. Pharmacokinetics of novel erythropoiesis stimulating protein compared with epoetin alfa in dialysis patients. *J Am Soc Nephrol*. 1999; 10: 2392-2395.
290. Vanrenterghem Y, Barany P, Mann JF, Kerr PG, Wilson J, Baker NF, Gray SJ. Randomized trial of darbepoetin alfa for treatment of renal anemia at a reduced dose frequency compared with rHuEPO in dialysis patients. *Kidney Int*. 2002; 62: 2167-2175.
291. Nissenson AR, Swan SK, Lindberg JS, Soroka SD, Beatey R, Wang C, Picarello N, McDermott-Vitak A, Maroni BJ. Randomized, controlled trial of darbepoetin alfa for the treatment of anemia in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis*. 2002; 40: 110-118.
292. Haselbeck A, Bailon P, Pahlke W. The discovery and characterization of CERA, an innovative agent for the treatment of anemia. *Blood*. 2002 ; 100 : 227A.
293. Macdougall IC. CERA (Continuous Erythropoietin Receptor Activator): a new erythropoiesis-stimulating agent for the treatment of anemia. *Curr Hematol Rep*. 2005; 4: 436-440.
294. Provenzano R, Besarab A, Macdougall IC, Ellison DH, Maxwell AP, Sulowicz W, Klinger M, Rutkowski B, Correa-Rotter R, Dougherty FC. The continuous erythropoietin receptor activator (C.E.R.A.) corrects anemia at extended administration intervals in patients with chronic kidney disease not on dialysis: results of a phase II study. *Clin Nephrol*. 2007;67:306-317.

295. Locatelli F, Reigner B. C.E.R.A.: pharmacodynamics, pharmacokinetics and efficacy in patients with chronic kidney disease. *Expert Opin Investig Drugs*. 2007;16:1649–1661.
296. Levin NW, Fishbane S, Canedo FV, Zeig S, Nassar GM, Moran JE, Villa G, Beyer U, Oguey D. Intravenous methoxy polyethylene glycol-epoetin beta for haemoglobin control in patients with chronic kidney disease who are on dialysis: a randomised non-inferiority trial (MAXIMA) *Lancet*. 2007;370:1415–1421.
297. Johnson DL, Jolliffe LK. Erythropoietin mimetic peptides and the future. *Nephrol Dial Transplant*. 2000;15:1274–1277.
298. Sulowicz W, Locatelli F, Ryckelynck JP, Balla J, Csiky B, Harris K, Ehrhard P, Beyer U. Once-monthly subcutaneous C.E.R.A. maintains stable hemoglobin control in patients with chronic kidney disease on dialysis and converted directly from epoetin one to three times weekly. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2007;2:637–646.
299. Saracho Rotaeché R. Is CERA therapy every 2-4 weeks worse than usual EPO therapy 1-3 times per week? *Nefrologia*. 2008;28 Suppl 2:28–29.
300. Klinger M, Arias M, Vargemezis V, Besarab A, Sulowicz W, Gerntholtz T, Ciechanowski K, Dougherty FC, Beyer U. Efficacy of intravenous methoxy polyethylene glycol-epoetin beta administered every 2 weeks compared with epoetin administered 3 times weekly in patients treated by hemodialysis or peritoneal dialysis: a randomized trial. *Am J Kidney Dis*. 2007;50:989–1000.
301. Macdougall IC, Walker R, Provenzano R, de Alvaro F, Locay HR, Nader PC, Locatelli F, Dougherty FC, Beyer U. C.E.R.A. corrects anemia in patients with chronic kidney disease not on dialysis: results of a randomized clinical trial. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3:337–347.
302. Macdougall IC, Ashenden M. Current and upcoming erythropoiesis-stimulating agents, iron products, and other novel anemia medications. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2009;16:117–130.
303. Canaud B, Mingardi G, Braun J, Aljama P, Kerr PG, Locatelli F, Villa G, Van Vlem B, McMahon AW, Kerloeguen C, et al. Intravenous C.E.R.A. maintains stable haemoglobin levels in patients on dialysis previously treated with darbepoetin alfa: results from STRIATA, a randomized phase III study. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23:3654–3661.

304. Kochendoerfer GG, Chen SY, Mao F, Cressman S, Traviglia S, Shao H, Hunter CL, Low DW, Cagle EN, Carnevali M, et al. Design and chemical synthesis of a homogeneous polymer-modified erythropoiesis protein. *Science*. 2003;299:884–887.
305. Sytkowski AJ, Lunn ED, Risinger MA, Davis KL. An erythropoietin fusion protein comprised of identical repeating domains exhibits enhanced biological properties. *J Biol Chem*. 1999;274:24773–24778.
306. Wrighton NC, Farrell FX, Chang R, Kashyap AK, Barbone FP, Mulcahy LS, Johnson DL, Barrett RW, Jolliffe LK, Dower WJ. Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin. *Science*. 1996;273:458–464.
307. Vadas O, Hartley O, Rose K. Characterization of new multimeric erythropoietin receptor agonists. *Biopolymers*. 2008;90:496–502.
308. Dohil R, Hassall E, Wadsworth LD, Israel DM. Recombinant human erythropoietin for treatment of anemia of chronic disease in children with Crohn's disease. *J Pediatr*. 1998; 132: 155-159.
309. Christodoulou DK, Tsianos EV. Anemia in inflammatory bowel disease - the role of recombinant human erythropoietin. *Eur J Intern Med*. 2000; 11: 222-227.
310. Koutroubakis IE, Karmiris K, Makreas S, Xidakis C, Niniraki M, Kouroumalis EA. Effectiveness of darbepoetin-alfa in combination with intravenous iron sucrose in patients with inflammatory bowel disease and refractory anaemia: a pilot study. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2006; 18: 421-425.
311. Goodnough LT, Skikne B, Brugnara C. Erythropoietin, iron, and erythropoiesis. *Blood*. 2000; 96: 823-833.
312. Demetri GD, Kris M, Wade J, Degos L, Cella D. Quality-of-life benefit in chemotherapy patients treated with epoetin alfa is independent of disease response or tumor type: results from a prospective community oncology study. Procrit Study Group. *J Clin Oncol*. 1998; 16: 3412-3425.
313. Crawford J, Cella D, Cleeland CS, Cremieux PY, Demetri GD, Sarokhan BJ, Slavin MB, Glaspy JA. Relationship between changes in hemoglobin level and quality of life during chemotherapy in anemic cancer patients receiving epoetin alfa therapy. *Cancer*. 2002; 95: 888-895.

314. Vaziri ND. Mechanism of erythropoietin-induced hypertension. *Am J Kidney Dis.* 1999;33:821–828.
315. Besarab A, Bolton WK, Browne JK, Egrie JC, Nissenson AR, Okamoto DM, Schwab SJ, Goodkin DA. The effects of normal as compared with low hematocrit values in patients with cardiac disease who are receiving hemodialysis and epoetin. *N Engl J Med.* 1998;339:584–590.
316. Churchill DN, Muirhead N, Goldstein M, Posen G, Fay W, Beecroft ML, Gorman J, Taylor DW. Probability of thrombosis of vascular access among hemodialysis patients treated with recombinant human erythropoietin. *J Am Soc Nephrol.* 1994;4:1809–1813.
317. Moreno F, Sanz-Guajardo D, Lopez-Gomez JM, Jofre R, Valderrabano F. Increasing the hematocrit has a beneficial effect on quality of life and is safe in selected hemodialysis patients. Spanish Cooperative Renal Patients Quality of Life Study Group of the Spanish Society of Nephrology. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11:335–342.
318. Furuland H, Linde T, Ahlmen J, Christensson A, Strombom U, Danielson BG. A randomized controlled trial of haemoglobin normalization with epoetin alfa in pre-dialysis and dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2003;18:353–361.
319. Locatelli F, Covic A, Eckardt KU, Wiecek A, Vanholder R. Anaemia management in patients with chronic kidney disease: a position statement by the Anaemia Working Group of European Renal Best Practice (ERBP) *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24:348–354.
320. Casadevall N, Nataf J, Viron B, Kolta A, Kiladjian JJ, Martin-Dupont P, Michaud P, Papo T, Ugo V, Teyssandier I, et al. Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin. *N Engl J Med.* 2002;346:469–475.
321. Cournoyer D, Toffelmire EB, Wells GA, Barber DL, Barrett BJ, Delage R, Forrest DL, Gagnon RF, Harvey EA, Laneuville P, et al. Anti-erythropoietin antibody-mediated pure red cell aplasia after treatment with recombinant erythropoietin products: recommendations for minimization of risk. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15:2728–2734.
322. Locatelli F, Aljama P, Barany P, Canaud B, Carrera F, Eckardt KU, Macdougall IC, Macleod A, Horl WH, Wiecek A, et al. Erythropoiesis-

- stimulating agents and antibody-mediated pure red-cell aplasia: here are we now and where do we go from here? *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19:288–293.
323. Bennett CL, Luminari S, Nissenson AR, Tallman MS, Klinge SA, McWilliams N, McKoy JM, Kim B, Lyons EA, Trifilio SM, et al. Pure red-cell aplasia and epoetin therapy. *N Engl J Med*. 2004;351:1403–1408.
324. Rossert J, Casadevall N, Eckardt KU. Anti-erythropoietin antibodies and pure red cell aplasia. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15:398–406.
325. Nemeth E. Targeting the hepcidin-ferroportin axis in the diagnosis and treatment of anemias. *Adv Hematol*. 2010;2010:750643.
326. Sasu BJ, Hainu M, Boone TC, et al. Hepcidin, hepcidin antagonists and methods of use. US patent no. US2008213277, Amgen Inc. Thousand Oaks, Calif, USA, September 2008.
327. Yu PB, Hong CC, Sachidanandan C, et al. Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. *Nat Chem Biol*. 2008;4:33–41.
328. Babitt JL, Huang FW, Xia Y, Sidis Y, Andrews NC, Lin HY. Modulation of bone morphogenetic protein signaling in vivo regulates systemic iron balance. *J Clin Invest*. 2007;117:1933-9.
329. Nishimoto N, Kanakura Y, Aozasa K, et al. Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody treatment of multicentric Castleman disease. *Blood*. 2005;106:2627–2632.
330. Kawabata H, Tomosugi N, Kanda J, Tanaka Y, Yoshizaki K, Uchiyama T. Anti-interleukin 6 receptor antibody tocilizumab reduces the level of serum hepcidin in patients with multicentric Castleman's disease. *Haematologica*. 2007;92:857–858.
331. Klaus S, Arend M, Fournay P, et al. Induction of erythropoiesis and iron utilization by the HIF prolyl hydroxylase inhibitor FG-4592. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16:p. 49A.
332. Wang L, Trebicka E, Fu Y, Ellenbogen S, Hong CC, Babitt JL, Lin HY, Cherayil BJ. The bone morphogenetic protein-hepcidin axis as a therapeutic target in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2011 Feb 23. doi: 10.1002/ibd.21675.
333. Steinbicker AU, Sachidanandan C, Vonner AJ, Yusuf RZ, Deng DY, Lai CS, Rauwerdink KM, Winn JC, Saez B, Cook CM, Szekely BA, Roy CN, Seehra JS, Cuny GD, Scadden DT, Peterson RT, Bloch KD, Yu PB. Inhibition of

bone morphogenetic protein signaling attenuates anemia associated with inflammation. *Blood*. 2011;117:4915-23.

334. Theurl I, Schroll A, Sonnweber T, Nairz M, Theurl M, Willenbacher W, Eller K, Wolf D, Seifert M, Sun CC, Babitt JL, Hong CC, Menhall T, Gearing P, Lin HY, Weiss G. Pharmacologic inhibition of hepcidin expression reverses anemia of chronic disease in rats. *Blood*. 2011 Jul 5. [Epub ahead of print]

ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

Μέρος 3ο

Στόχοι των κλινικών μελετών

Οι στόχοι των κλινικών μελετών, στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν:

1. Η καταγραφή των επιδημιολογικών, κλινικών και εργαστηριακών δεδομένων, σχετικά με την αναιμία σε ασθενείς με ΙΦΕΝ, που παρακολουθούνται στη Γαστρεντερολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου.
2. Η μελέτη των διαταραχών της ομοιόστασης της σιδήρου και η συσχέτισή τους με τους μηχανισμούς φλεγμονής, σε ασθενείς με ΙΦΕΝ, με ιδιαίτερη έμφαση στη μελέτη του ρόλου της πρωτεΐνης hepcidin.
3. Η μελέτη των διαταραχών ερυθροποίησης σε ασθενείς με ΙΦΕΝ, με έμφαση στο ρόλο συμβατικών και νέας γενιάς αιματολογικών δεικτών στη διάγνωση διαταραχών ερυθροποίησης αλλά και ομοιόστασης του σιδήρου.
4. Η μελέτη της επίδρασης θεραπευτικών παρεμβάσεων στους ανωτέρω μηχανισμούς και στις ανωτέρω παραμέτρους.

Κλινικές μελέτες

Μέρος 3ο

Ο ρόλος των συγκεντρώσεων στον ορό hepcidin και prohepcidin στους μηχανισμούς αναιμίας ασθενών με ΙΦΕΝ



1.1. Περίληψη

Εισαγωγή: Η αναιμία είναι μία σημαντική επιπλοκή των ΙΦΕΝ. Πρόσφατα δεδομένα υποδεικνύουν τη hepcidin ως ένα κύριο μεσολαβητή της αναιμίας, με κεντρικό ρόλο στην ομοιόσταση και μεταβολισμό του σιδήρου. Ο σκοπός της μελέτης ήταν η αξιολόγηση των επιπέδων της hepcidin και της προ-ορμόνης της, prohepcidin, σε ασθενείς με ΙΦΕΝ, και η σύγκρισή τους με υγιείς μάρτυρες.

Υλικό-μέθοδος: Στη μελέτη έλαβαν μέρος 100 ασθενείς με ΙΦΕΝ [49 με ΕΚ και 51 με ΝC] και 102 υγιείς μάρτυρες (ΥΜ). Τα επίπεδα hepcidin και prohepcidin μετρήθηκαν με εμπορικά διαθέσιμα κιτ ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Αξιολογήθηκε η συσχέτισή τους με κλινικές και εργαστηριακές παραμέτρους.

Αποτελέσματα: Τα μέσα επίπεδα hepcidin ήταν σημαντικά υψηλότερα σε ασθενείς με ΕΚ και ΝC, συγκριτικά με ΥΜ ($P < 0.0001$). Τα μέσα επίπεδα prohepcidin ήταν σημαντικά χαμηλότερα σε ασθενείς με ΙΦΕΝ, συγκριτικά με τους ΥΜ ($P = 0.03$). Στη μονοπαραγοντική ανάλυση, υπήρχε σημαντική αρνητική συσχέτιση ($r = -0.36$, $P = 0.0003$) της hepcidin ορού και θετική ($r = 0.65$, $P < 0.0001$) της prohepcidin ορού με τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης. Στους ασθενείς με ΙΦΕΝ βρέθηκε επίσης σημαντική συσχέτιση της hepcidin ($r = 0.34$, $P = 0.0007$) και της prohepcidin ($r = -0.21$, $P = 0.04$) με τα επίπεδα φερριτίνης. Η hepcidin ορού συσχετίστηκε με την ενεργότητα της νόσου (για την ΕΚ, $r = 0.36$, $P = 0.009$) και τη C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) ($r = 0.29$, $P = 0.004$). Μετά από πολυπαραγοντική ανάλυση, τα επίπεδα hepcidin ορού εμφάνισαν σημαντική συσχέτιση με τη φερριτίνη ($P = 0.0008$) και την ενεργότητα της νόσου (για την ΕΚ, $P = 0.004$).

Συμπέρασμα: Τα επίπεδα hepcidin και prohepcidin στον ορό ασθενών με ΙΦΕΝ εμφανίζονται σημαντικώς διαφορετικά, σε σύγκριση με ΥΜ. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ένα ουσιώδη ρόλο των δύο αυτών ορμονών στην ανάπτυξη αναιμίας στις ΙΦΕΝ.

1.2. Εισαγωγή

Η αναιμία είναι η συχνότερη συστηματική επιπλοκή των ΙΦΕΝ, προσβάλλοντας περίπου το ένα τρίτο (1/3) των ασθενών¹, με ισχυρή επίδραση στην ποιότητα ζωής και τις πνευματικές λειτουργίες². Διάφορες μελέτες έριξαν φως πρόσφατα στους μηχανισμούς και την επίδραση της αναιμίας σε ασθενείς με ΙΦΕΝ³⁻⁵. Επιπλέον, δημοσιεύθηκαν κατευθυντήριες οδηγίες για τη διάγνωση και αντιμετώπιση της αναιμίας, σε τέτοιους ασθενείς⁶. Ο συχνότερος τύπος αναιμίας στις ΙΦΕΝ είναι η ΣΠΑ, που οφείλεται σε μειωμένη πρόσληψη σιδήρου στο επίπεδο του εντεροκυττάρου, εξαιτίας της φλεγμονής, αλλά και σε αυξημένη απώλεια σιδήρου, λόγω απώλειας αίματος από τον εντερικό βλεννογόνο. Άλλες, λιγότερο συχνές αιτίες αναιμίας στις ΙΦΕΝ είναι η χρόνια φλεγμονώδης νόσος (ΑΧΝ), η ανεπάρκεια βιταμίνης Β₁₂ ή/και φυλικού οξέος και η φαρμακο-επαγόμενη αναιμία^{6,7}.

Την τελευταία δεκαετία, η γνώση μας πάνω στο ρόλο της hepcidin στην ομοιόσταση και το μεταβολισμό του σιδήρου έχει αυξηθεί σημαντικά⁸⁻¹⁰. Η πρωτεΐνη παράγεται κυρίως στο ήπαρ, όπου η έκφραση του mRNA οδηγεί στο σχηματισμό μίας πρόδρομης πρωτεΐνης με 84 αμινοξέα (prohepcidin). Έχει βρεθεί ότι η hepcidin μειώνει το ποσό του σιδήρου στην κυκλοφορία αναστέλλοντας της έξοδό του από τα κύτταρα, συνδεδεμένη στη ferroportin και επάγοντας την φαγοκυττάρωση και αποδόμησή της^{11,12}. Η παραγωγή hepcidin ρυθμίζεται από το σίδηρο και τη φλεγμονή¹³. Ο σίδηρος επάγει τη hepcidin *in vivo*, μειώνοντας έτσι την περίσσεια σιδήρου και προστατεύοντας τους ιστούς από την τοξικότητα των ελευθέρων ριζών. Αντίθετα, η σιδηροπενία καταλήγει στη μείωση της παραγωγής hepcidin, γεγονός που εξασφαλίζει μεγαλύτερη διαθεσιμότητα σιδήρου στα αναπτυσσόμενα ερυθροκύτταρα του μυελού των οστών^{14,15}. Η αναιμία και η υποξία αναστέλλουν επίσης τη σύνθεση της hepcidin¹⁶.

Μέχρι πρότινος, δεν υπήρχε διαθέσιμη μία αξιόπιστη εργαστηριακή μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού των hepcidin και prohepcidin στον ορό, ενώ τώρα οι δύο αυτές πρωτεΐνες μπορούν να προσδιορισθούν με εμπορικά διαθέσιμη μέθοδο. Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι η hepcidin ορού, αλλά όχι η prohepcidin, συσχετίζεται με τη φλεγμονή¹⁷.

Λίγα είναι γνωστά σχετικά με το ρόλο της hepcidin και της προ-ορμόνης της στους μηχανισμούς αναιμίας σε ασθενείς με ΙΦΕΝ. Στη NC, τα επίπεδα hepcidin στα ούρα βρέθηκαν αυξημένα, ειδικά στην ενεργό φάση της νόσου¹⁸. Αντίθετα, έχει αναφερθεί σημαντική ελάττωση των επιπέδων hepcidin ορού σε ασθενείς με ΙΦΕΝ, με ή

χωρίς αναιμία, συγκριτικά με YM¹⁹. Τα δεδομένα αναφορικά με τα επίπεδα prohepcidin στις ΙΦΕΝ είναι επίσης περιορισμένα και αντικρουόμενα^{20,21}.

Ο σκοπός της μελέτης αυτής ήταν ο προσδιορισμός των επιπέδων hepcidin και prohepcidin στον ορό ασθενών με ΙΦΕΝ, η σύγκρισή τους με YM και η συσχέτισή τους με εδραιωμένες παραμέτρους αξιολόγησης αναιμίας και το προφίλ φλεγμονής του κάθε ασθενούς.

1.3. Υλικό-Μεθοδολογία

Ασθενείς

Στη μελέτη συμμετείχαν 100 διαδοχικοί ασθενείς με ΙΦΕΝ, που παρακολουθούνται στη Γαστρεντερολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου. Τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά τους παρουσιάζονται στον πίνακα 1. Οι ασθενείς συγκρίθηκαν με 102 υγιείς μάρτυρες (YM), αντίστοιχης ηλικίας. Οι YM επιλέχθηκαν μεταξύ υγιών αιμοδοτών, χωρίς αναιμία ή οικογενειακό ιστορικό ΙΦΕΝ. Ασθενείς με ιστορικό αιμορραγίας πεπτικού, κακοήθειας, χημειοθεραπείας ή ακτινοθεραπείας, νεφρικής ανεπάρκειας ή αιματολογικά, ηπατικά και αυτοάνοσα νοσήματα, εξαιρέθηκαν από τη μελέτη. Εξαιρέθηκαν επίσης, γυναίκες ασθενείς με ιστορικό τρέχουσας κύησης ή πρόσφατου (<12 μήνες από την έναρξη της μελέτης) τοκετού. Επιπλέον, σε κανένα ασθενή ή YM δεν είχε χορηγηθεί μετάγγιση αίματος ή θεραπεία με σίδηρο ή EPO, κατά τη διάρκεια των τελευταίων 3 μηνών από την έναρξη της μελέτης.

Η διάγνωση της ΕΚ και της ΝC βασίσθηκε στα παγκοσμίως καθιερωμένα και καθολικώς αποδεκτά κριτήρια^{22,23}. Η ταξινόμηση του φαινοτύπου της νόσου στηρίχθηκε στην ταξινόμηση κατά Montreal²⁴. Όλοι οι ασθενείς και οι YM ανήκαν στην Καυκάσια φυλή. Η ενεργότητα της νόσου στους ασθενείς με ΝC αξιολογήθηκε με το δείκτη ενεργότητας της ΝC, CDAI (Crohn's disease activity index) [Best et al, Gastroenterology 1976] και οι ασθενείς διαιρέθηκαν σε δύο ομάδες: με «ενεργό» νόσο, με δείκτη CDAI > 150 και «ανεργό» νόσο, με δείκτη CDAI ≤ 150. Στους ασθενείς με ΕΚ, για την αξιολόγηση της νόσου χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης SCCAI (Simple Clinical Colitis Activity Index) [Walmsley et al, Gut 1998]. «Ενεργός» νόσος θεωρήθηκε όταν οι βαθμοί ήταν 3 ή περισσότεροι. Η ενεργότητα της νόσου υπολογίσθηκε τη στιγμή λήψεως των δειγμάτων αίματος.

| | ΕΚ | NC | ΙΦΕΝ | ΥΜ |
|-------------------------------------|------------|------------|-------------|------------|
| Αριθμός | 49 | 51 | 100 | 102 |
| Ηλικία (έτη, median, εύρος) | 53 (15-78) | 45 (16-79) | 49 (15-79) | 44 (19-61) |
| Άνδρες | 32 | 26 | 58 | 82 |
| Γυναίκες | 17 | 25 | 42 | 20 |
| Ενεργοί καπνιστές | 9 | 21 | 30 | 58 |
| Ενεργότητα νόσου | | | | |
| Ενεργή | 11 | 9 | 20 | |
| Μη ενεργή | 38 | 42 | 80 | |
| Διάρκεια νόσου (έτη, median, εύρος) | 9 (1-31) | 7 (1-35) | 8 (1-35) | |
| Εντόπιση νόσου | | | | |
| Ορθίτις(ΕΚ)/Ειλεός(NC) | 14 | 21 | | |
| Αριστερή(ΕΚ)/Π.Ε.(NC) | 23 | 13 | | |
| Εκτεταμένη(ΕΚ)/Ειλεοκολίτις(NC) | 12 | 16 | | |
| Ανώτερο πεπτικό | | 1 | | |
| Μορφή νόσου (NC) | | | | |
| Στενωτική | | 11 | | |
| Διατριαινουσα | | 8 | | |
| Φλεγμονώδης | | 32 | | |
| Περιεδρική νόσος | | 6 | | |
| Εξωεντερικές εκδηλώσεις | 7 | 26 | 33 | |
| Τρέχουσα θεραπεία | | | | |
| Salazopyrine | 7 | 9 | 16 | |
| 5-ASA | 41 | 19 | 60 | |
| Κορτικοστεροειδή | 2 | 16 | 18 | |
| Azathioprine | 10 | 21 | 31 | |
| Methotrexate | 3 | 4 | 7 | |
| Infliximab | 2 | 10 | 12 | |
| Μετρονιδαζόλη | 0 | 6 | 6 | |

Πίνακας 1. Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών και ΥΜ που συμμετείχαν στη μελέτη

Την ίδια στιγμή καταγράφηκαν και οι καπνιστικές συνήθειες και οι ασθενείς ταξινομήθηκαν σε 3 ομάδες, ως «ενεργοί», «πρώην» ή «παλαιοί» καπνιστές. Ο ορισμός της αναιμίας βασίστηκε στα διεθνή κριτήρια του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας και καθορίστηκε ως αιμοσφαιρίνη < 12 g/dL σε μη έγκυες γυναίκες και < 13 g/dL σε άνδρες²⁵.

Το σύνολο των ασθενών υπέγραψε έντυπο ενημερωμένης συγκατάθεσης. Το πρωτόκολλο της μελέτης συμμορφώθηκε με τις κατευθυντήριες οδηγίες περί ηθικής της Διακήρυξης του Ελσίνκι του 1975 (6^η αναθεώρηση, 2008) και εγκρίθηκε από την Επιτροπή Ηθικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Εργαστηριακές μετρήσεις

Από ασθενείς και YM συλλέχθηκαν δείγματα ολικού αίματος για γενική αίματος και μέτρηση της Ταχύτητας Καθίζησης Ερυθρών (ΤΚΕ), άμεσα με τη λήψη τους. Όλες οι γενικές αίματος διενεργήθηκαν στον αιματολογικό αναλυτή Coulter LH 780 (Beckman Coulter, Inc., California, USA), βάσει των οδηγιών του κατασκευαστή. Τα δείγματα ορού συλλέχθηκαν μετά από άμεση φυγοκέντρηση των δειγμάτων ολικού αίματος, σε θερμοκρασία δωματίου, προς προσδιορισμό των ακόλουθων εργαστηριακών παραμέτρων: C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP), σίδηρος (Fe), φερριτίνη, βιταμίνη B₁₂, φυλικό οξύ, τρανσφερρίνη, διαλυτός υποδοχέας τρανσφερρίνης (sTfR) και κορεσμός τρανσφερρίνης (Tsat). Όλες οι μετρήσεις διεξήχθησαν βάσει της κοινής εργαστηριακής πρακτικής.

Μέθοδος μέτρησης hepcidin/prohepcidin ορού

Τα δείγματα ορών από ασθενείς και YM καταψύχθηκαν άμεσα και μόνο μία φορά, στους -80°C, μέχρι να υποστούν επεξεργασία. Οι συγκεντρώσεις στον ορό των hepcidin-25 και prohepcidin προσδιορίστηκαν με χρήση εμπορικής διαθέσιμων κιτ ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (DRG International, Inc., New Jersey, USA, αριθμός καταλόγου EIA-4705 και EIA-4644, αντίστοιχα), βάσει των οδηγιών του κατασκευαστή, με τρόπο τυφλό, χωρίς προηγούμενη γνώση της διάγνωσης ή άλλων κλινικών πληροφοριών. Το αναμενόμενο εύρος φυσιολογικών τιμών για τη hepcidin και την prohepcidin, βάσει του κατασκευαστή, ήταν 13.3-54.4 ng/ml (5-95% εύρος κατανομής) και 58.9-158.1 ng/ml (5-95% εύρος κατανομής), αντίστοιχα. Το δυναμικό εύρος προσδιορισμού της μεθόδου (assay dynamic range) ήταν 0.9-140 ng/ml για τη hepcidin και 0-1000 ng/ml για την prohepcidin. Η αναλυτική ευαισθησία της μεθόδου

(analytical sensitivity) ήταν 0.9 ng/ml για τη hepcidin και <3.95 ng/ml για την prohepcidin. Οι διακυμάνσεις intra-assay (πολλαπλές μετρήσεις πλήθους δειγμάτων, διαφόρων συγκεντρώσεων) και inter-assay (διακύμανση τιμών του ίδιου δείγματος, σε μετρήσεις διαδοχικών ημερών) υπολογίσθηκαν βάσει των αποτελεσμάτων μετρήσεων 3 διαφορετικών δειγμάτων δεδομένων συγκεντρώσεων, για κάθε ουσία. Για τη hepcidin, ο intra-assay συντελεστής διακύμανσης (coefficient of variation, CV= SD/mean) ήταν μεταξύ 4.10% και 4.86%, ενώ ο inter-assay CV ήταν μεταξύ 7.37% και 11.42%. Για την prohepcidin, η intra-assay διακύμανση ήταν 4.07-4.69% και η inter-assay διακύμανση ήταν 4.82-9.76%.

Στατιστική ανάλυση

Για την αξιολόγηση της κανονικότητας των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov. Καθώς οι τιμές των hepcidin και prohepcidin δεν είχαν κανονική κατανομή, τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσες (median) τιμές, με το εύρος τους. Για την ομαδοποίηση και παρουσίαση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν διαγράμματα τύπου Box & Whisker (Box and Whisker plots). Οι συγκρίσεις μεταξύ των δύο ομάδων έγιναν με χρήση του Mann-Whitney U-test. Οι συγκρίσεις ανάμεσα στις τρεις ομάδες ασθενών έγιναν με χρήση του Kruskal-Wallis test (μη παραμετρική ανάλυση διακύμανσης). Η συσχέτιση ανάμεσα στις hepcidin/prohepcidin και άλλους δείκτες ορού καθώς και κλινικές παραμέτρους, ελέγχθηκε με γραμμική συσχέτιση (linear regression). Για την προσαρμογή παραγόντων σύγχυσης (confounders) χρησιμοποιήθηκε ανάλυση multiple regression (stepwise method). Στο τελικό μοντέλο, οι εξαρτώμενες μεταβλητές ήταν οι hepcidin/prohepcidin ορού, και οι συν-μεταβλητές ήταν εκείνες με τιμή σημαντικότητας μικρότερη του 0.1 στη μονοπαραγοντική ανάλυση. Η ευαισθησία, ειδικότητα, θετική προγνωστική αξία (ΘΠΑ) και αρνητική προγνωστική αξία (ΑΠΑ) υπολογίσθηκαν ώστε να αξιολογηθεί η αξιοπιστία των hepcidin/prohepcidin στη διάγνωση της ενεργού νόσου, αναιμίας ή ΣΠΑ.

Ως στατιστικά σημαντικό επίπεδο θεωρήθηκε τιμή $P < 0.05$. Όλες οι αναλύσεις ήταν τύπου two-tailed και διενεργήθηκαν με χρήση του στατιστικού προγράμματος InStat, version 3 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, USA).

1.4. Αποτελέσματα

Ο επιπολασμός της αναιμίας σε αυτή την ομάδα ασθενών με ΙΦΕΝ ήταν 42% (41.2% για την ΕΚ και 42.9% για τη ΝC). Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται οι μετρηθείσες εργαστηριακές παράμετροι των ασθενών με ΕΚ και ΝC, συγκριτικά με τους ΥΜ. Παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές σε όλες τις ελεγχθείσες παραμέτρους (αιμοσφαιρίνη, φερριτίνη, Tsat, sTfR, MCV, CRP, hepcidin/prohepcidin) μεταξύ ασθενών, τόσο με ΕΚ όσο και με ΝC, και ΥΜ. Δε βρέθηκαν διαφορές μεταξύ ΕΚ και ΝC. 30 ασθενείς (30%) είχαν ΣΠΑ, οριζόμενη ως φερριτίνη<30 μg/L και Tsat<16%. Υπήρχε σημαντική συσχέτιση των επιπέδων φερριτίνης με τα επίπεδα CRP (P=0.04), αλλά όχι με τους κλινικούς δείκτες ενεργότητας της νόσου.

Οι κατανομές των επιπέδων hepcidin και prohepcidin στους ασθενείς με ΕΚ και ΝC, όπως και στους ΥΜ, παρουσιάζονται στις εικόνες 1 & 2. Τα μέσα επίπεδα hepcidin ήταν σημαντικά υψηλότερα στους ασθενείς με ΕΚ και ΝC, συγκριτικά με τους ΥΜ (P<0.0001). Ασθενείς με νόσο σε ύφεση είχαν επίσης σημαντικά υψηλότερα επίπεδα hepcidin ορού, σε σχέση με τους ΥΜ (P<0.0001). Ασθενείς με ΣΠΑ είχαν χαμηλότερα επίπεδα hepcidin, συγκριτικά με εκείνους χωρίς ΣΠΑ, αν και η διαφορά δεν ήταν στατιστικώς σημαντική (P=0.09). Τα μέσα επίπεδα prohepcidin ήταν σημαντικά χαμηλότερα στους ασθενείς με ΙΦΕΝ, συγκριτικά με τους ΥΜ (P=0.03), όμως όταν εξαιρέθηκαν οι ασθενείς με ενεργό νόσο, η διαφορά δεν ήταν στατιστικώς σημαντική (P=0.06). Ασθενείς με σιδηροπενία είχαν χαμηλότερα επίπεδα prohepcidin, συγκριτικά με εκείνους χωρίς σιδηροπενία, αν και η διαφορά δεν ήταν στατιστικώς σημαντική (P=0.17). Ο πίνακας 3 παρουσιάζει τις συσχετίσεις μεταξύ hepcidin και επιλεγμένων εργαστηριακών δεικτών. Υπήρχε σημαντική αρνητική συσχέτιση της hepcidin με τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης και θετική συσχέτιση με τη φερριτίνη, τη CRP και τον δείκτη SCCAI (για την ΕΚ). Σημαντική θετική συσχέτιση υπήρχε μεταξύ επιπέδων prohepcidin ορού και αιμοσφαιρίνης, ενώ αρνητική συσχέτιση με τα επίπεδα φερριτίνης (Πίνακας 4). Βρέθηκε επίσης σημαντική αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα hepcidin και στα επίπεδα prohepcidin, στους ασθενείς με ΙΦΕΝ.

| Παράμετρος Median (εύρος) | EK | NC | YM | p |
|------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------|
| Αιμοσφαιρίνη (g/dl) | 13.3 (9.5-16.6) | 12.8 (8.6-15.7) | 15.2 (12.1-18.0) | <0.0001 |
| Φερριτίνη (μg/L) | 42.1 (3.6-381.3) | 33.4 (2.2-514.0) | 71.0 (10.0- 259.5) | 0.003 |
| Tsat (%) | 19.4 (2.2-47.8) | 14.1 (2.6-52.2) | 28.9 (8.0-91.8) | <0.0001 |
| sTfR (mg/L) | 1.3 (0.7-6.8) | 1.5 (0.8-4.4) | 1.1 (0.5-1.7) | <0.0001 |
| MCV (fl) | 86.2 (66.9- 102.9) | 89.2 (61.8- 110.1) | 90.7 (69.0- 100.9) | 0.01 |
| CRP(mg/dl) | 0.37 (0.32-5.3) | 0.39 (0.32-10.7) | 0.29 (0.29-1.5) | <0.0001 |
| TKE (mm/h) | 17 (1-80) | 28 (3-84) | 5.5 (1-36) | <0.0001 |
| Hepcidin (ng/ml) | 76.3 (16.5-736) | 70.9 (16.7- 306.9) | 47.0 (8.6-340.2) | <0.0001 |
| Prohepcidin (ng/ml) | 89.1 (13.8- 158.3) | 97.2 (20.1- 162.8) | 121.4 (9.1- 265.5) | 0.03 |

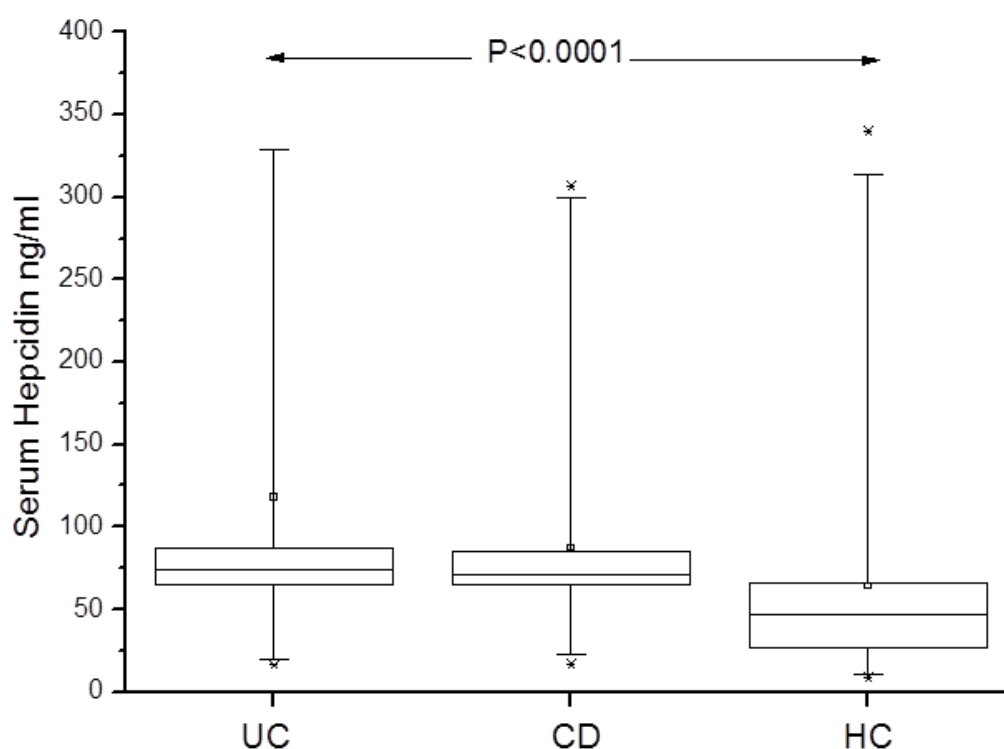
Πίνακας 2. Εργαστηριακές παράμετροι ασθενών με ΙΦΕΝ και YM.

Στον πίνακα 5 παρουσιάζονται οι παράγοντες που σχετίζονται με τη hepcidin, στην πολυπαραγοντική ανάλυση. Μετά την ομαλοποίηση με άλλες συν-μεταβλητές, οι παράμετροι που βρέθηκε να συσχετίζονται με τη hepcidin ορού στο τελικό μοντέλο, ήταν η φερριτίνη (P=0.0008) και ο δείκτης SCCAI (για την EK) (P=0.004). Τα επίπεδα prohepcidin, μετά την ομαλοποίηση με άλλες συν-μεταβλητές, δεν έδειξαν συσχέτιση με άλλες παραμέτρους (Πίνακας 6).

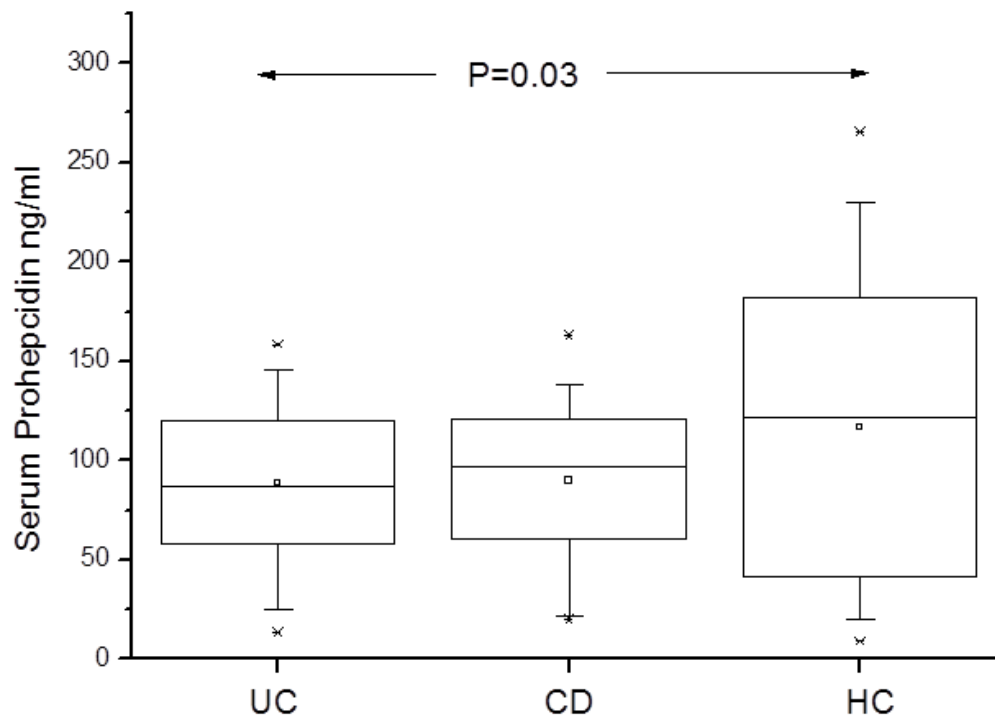
Η ευαισθησία της χαμηλής hepcidin για τη διάγνωση της αναιμίας, με όριο αποκοπής τα 79.4 ng/ml (ανώτερο 95% όριο εμπιστοσύνης των YM), ήταν 71%, η ειδικότητα 43%, ενώ η ΘΠΑ 48% και η ΑΠΑ 68%. Παρομοίως, η ευαισθησία της χαμηλής hepcidin για τη διάγνωση της ΣΠΑ ήταν 81%, η ειδικότητα 45%, ενώ η ΘΠΑ

ήταν 52% και η ΑΠΑ 76%. Αντίθετα, τα υψηλά επίπεδα hepcidin (>79.4 ng/ml) είχαν ευαισθησία 65% , ειδικότητα 7%, ΘΠΑ 39% και ΑΠΑ 89%, για τη διάγνωση της ενεργού νόσου.

Δεν υπήρχαν σημαντικές συσχετίσεις ανάμεσα στα επίπεδα hepcidin/prohepcidin ορού και άλλα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών (φύλο, ηλικία, κάπνισμα, διάρκεια νόσου, εξωεντερικές εκδηλώσεις και χρήση φαρμάκων). Οι ασθενείς με ΙΦΕΝ που ελάμβαναν infliximab δεν είχαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα hepcidin/prohepcidin, συγκριτικά με τους ασθενείς εκτός τέτοιας θεραπείας (P=0.34).



Εικόνα 1. Κατανομή επιπέδων hepcidin στον ορό ασθενών με ΕΚ (UC, n=49), ασθενών με ΝΚ (CD, n=51) και ΥΜ (HC, n=102). Τα ορθογώνια αντιστοιχούν στην τιμή median με το εύρος 25-75%. Οι άξονες δείχνουν την 5^η & 95^η εκατοστιαία θέση, ενώ τα x αντιστοιχούν στην 1^η και 99^η εκατοστιαία θέση.



Εικόνα 2. Κατανομή επιπέδων prohepcidin στον ορό ασθενών με ΕΚ (UC, n=49), ασθενών με ΝΚ (CD, n=51) και ΥΜ (HC, n=102). Τα ορθογώνια αντιστοιχούν στην τιμή median με το εύρος 25-75%. Οι άξονες δείχνουν την 5^η & 95^η εκατοστιαία θέση, ενώ τα x αντιστοιχούν στην 1^η και 99^η εκατοστιαία θέση.

| Παράμετρος | Hepcidin ορού | | |
|--------------------------|---------------|----------------|--------|
| | r | r ² | p |
| Αιμοσφαιρίνη (g/dl) | -0.36 | 0.13 | 0.0003 |
| Φερριτίνη (μg/L) | 0.34 | 0.11 | 0.0007 |
| Tsat (%) | 0.13 | 0.02 | 0.19 |
| sTfR (mg/L) | -0.09 | 0.008 | 0.39 |
| SCCAI (EK) | 0.36 | 0.13 | 0.009 |
| CDAI (NC) | 0.24 | 0.06 | 0.09 |
| CRP (mg/l) | 0.29 | 0.08 | 0.004 |
| Prohepcidin ορού (ng/ml) | -0.33 | 0.11 | 0.0009 |

Πίνακας 3. Συσχέτιση μεταξύ επιπέδων hepcidin ορού και επιλεγμένων παραμέτρων.

| Παράμετρος | Prohepcidin ορού | | |
|-----------------------|------------------|----------------|---------|
| | r | r ² | p |
| Αιμοσφαιρίνη (g/dl) | 0.65 | 0.42 | <0.0001 |
| Φερριτίνη (μg/L) | -0.21 | 0.04 | 0.04 |
| Tsat (%) | -0.12 | 0.01 | 0.24 |
| sTfR (mg/L) | 0.14 | 0.02 | 0.18 |
| SCCAI (EK) | -0.02 | 0.0005 | 0.87 |
| CDAI (NC) | 0.12 | 0.01 | 0.44 |
| CRP (mg/l) | -0.11 | 0.01 | 0.29 |
| Hepcidin ορού (ng/ml) | -0.33 | 0.11 | 0.0009 |

Πίνακας 4. Συσχέτιση μεταξύ επιπέδων prohepcidin ορού και επιλεγμένων παραμέτρων.

| Μεταβλητή | Hepcidin ορού | | |
|--------------|---------------|--------|--------|
| | Συντελεστής | r | p |
| Αιμοσφαιρίνη | -4.1 | -0.003 | 0.33 |
| Φερριτίνη | 0.43 | 0.34 | 0.0008 |
| CRP | 8.38 | 0.12 | 0.21 |
| SCCAI (EK) | 18.1 | 0.37 | 0.004 |
| CDAI (NC) | -0.09 | -0.13 | 0.47 |
| Prohepcidin | 0.09 | 0.04 | 0.73 |

Πίνακας 5. Συσχέτιση διαφόρων μεταβλητών με τα επίπεδα hepcidin ορού, στην πολυπαραγοντική ανάλυση

| Μεταβλητή | Prohepcidin ορού | | |
|--------------|------------------|--------|------|
| | Συντελεστής | r | p |
| Αιμοσφαιρίνη | 0.23 | 0.0005 | 0.91 |
| Φερριτίνη | 0.03 | 0.06 | 0.63 |
| Hepcidin | 0.008 | 0.04 | 0.86 |

Πίνακας 6. Συσχέτιση διαφόρων μεταβλητών με τα επίπεδα prohepcidin ορού, στην πολυπαραγοντική ανάλυση

1.5. Συζήτηση

Η μελέτη αυτή είναι η πρώτη που διερευνά ταυτόχρονα τα επίπεδα hepcidin και prohepcidin στον ορό ασθενών με ΙΦΕΝ. Υπάρχει ουσιαστική δυσκολία στην ερμηνεία των επιπέδων hepcidin/prohepcidin ορού σε ασθενείς με ΙΦΕΝ, στη βάση του διπλού ρόλου που παίζουν οι δύο αυτές ορμόνες, καθώς εμπλέκονται τόσο στην ομοιόσταση του σιδήρου, όσο και στους μηχανισμούς αναιμίας. Ως εκ τούτου, φαίνεται πως υπάρχουν ιδιαίτερα πολύπλοκα μονοπάτια επαγωγής και αναστολής των πρωτεϊνών αυτών, που βασίζονται στην ισορροπία μεταξύ του βαθμού σιδηροπενίας και του βαθμού αναιμίας χρόνιας νόσου, σε κάθε ασθενή. Ολοένα και περισσότερα δεδομένα παρουσιάζουν την IL-6 ως κύριο φλεγμονώδη μεσολαβητή της έκφρασης της hepcidin^{13,16,26,27}. Έχει δειχθεί ότι χορήγηση IL-6 ή βακτηριακού λιποπολυσακχαρίτη σε ποντίκια και ανθρώπους επάγει την παραγωγή hepcidin^{27,28}. Ο βαθμός επαγωγής της

hepcidin από άλλους φλεγμονώδεις παράγοντες, όπως λιποπολυσακχαρίτες, IL-1 ή TNF- α , εξαρτάται από την ικανότητά τους να επάγουν δευτερογενώς την έκφραση της IL-6²⁷.

Διάφορες μέθοδοι έχουν εξελιχθεί για τη μέτρηση της hepcidin, που βασίζονται στην τεχνική φασματοφωτομετρίας μάζας (mass spectrometry), οι οποίες περιλαμβάνουν τις: surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry και liquid chromatography tandem-MS techniques. Πρόσφατα, έχουν εξελιχθεί επίσης ανοσοϊστοχημικές μέθοδοι για τη hepcidin-25, που αποτελούνται από RIA (radioimmunoassay) και ELISA. Επί του παρόντος, δεν υπάρχει μέθοδος αναφοράς για μετρήσεις hepcidin. Σε μία πρόσφατη πολυκεντρική μελέτη²⁹, τα επίπεδα hepcidin που μετρήθηκαν με διάφορες μεθόδους διέφεραν σημαντικά, όμως η αναλυτική διακύμανση (analytical variance) είναι γενικά χαμηλή και παρόμοια σε όλες τις μεθόδους.

Η βιβλιογραφία αναφορικά με το ρόλο των hepcidin/prohepcidin στους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς αναιμίας των ΙΦΕΝ είναι μάλλον περιορισμένη και αντιφατική. Τα επίπεδα hepcidin στα ούρα έχουν βρεθεί αυξημένα στη NC, κυρίως σε ενεργό νόσο¹⁸. Οι Arnold και συν.¹⁹ χρησιμοποιώντας RIA μέτρησαν τη hepcidin στον ορό 61 ασθενών με ΙΦΕΝ (51 με ΕΚ, 20 με αναιμία) και 25 ΥΜ. Βρήκαν ότι τα επίπεδα hepcidin ορού ήταν σημαντικά χαμηλότερα στους ασθενείς με ΙΦΕΝ, συγκριτικά με τους ΥΜ, και υπήρχε θετική συσχέτιση με την IL-6. Η δική μας, μεγαλύτερη μελέτη με 100 ασθενείς, έδειξε σημαντικά αυξημένα επίπεδα hepcidin σε ασθενείς με ΙΦΕΝ, συγκριτικά με ΥΜ, ενώ υπήρχε θετική συσχέτισή τους με την ενεργότητα της νόσου, αλλά μόνο σε ασθενείς με ΕΚ. Σε μία μελέτη από την Ουγγαρία με 102 ασθενείς με ΙΦΕΝ, τα επίπεδα prohepcidin στον ορό των ασθενών δε διέφεραν σημαντικά από τα επίπεδα των ΥΜ²¹. Σε ένα μικρό αριθμό παιδιατρικών ασθενών με ΙΦΕΝ (n=15), η prohepcidin ορού ήταν σημαντικά αυξημένη και υπήρχε θετική συσχέτιση με τη CRP²⁰. Στη μελέτη μας, βρήκαμε σημαντικά ελαττωμένα επίπεδα prohepcidin σε ασθενείς με ΙΦΕΝ, σε σύγκριση με ΥΜ, που δε συσχετιζόνταν με την ενεργότητα της νόσου. Πρόσφατες μελέτες έχουν επίσης δείξει εμφανώς μειωμένα επίπεδα prohepcidin στον ορό, σε μη-επιπλεγμένη ΣΠΑ³⁰. Επιπρόσθετα, δεν έχει αναφερθεί συσχέτιση μεταξύ επιπέδων prohepcidin ορού και αναιμίας της φλεγμονής¹⁷.

Τα υψηλότερα επίπεδα hepcidin και τα χαμηλότερα prohepcidin σε ασθενείς με ΙΦΕΝ, συγκριτικά με ΥΜ, υπογραμμίζουν τον καίριο ρόλο που παίζουν οι δύο αυτές ορμόνες στις ΙΦΕΝ. Η ισχυρή συσχέτισή τους (θετική για τη hepcidin και αρνητική για την prohepcidin) με την αιμοσφαιρίνη στη μονοπαραγοντική ανάλυση, υποδεικνύει ότι έχουν σημαντική συνεισφορά στη δημιουργία της αναιμίας, όμως η πολυπαραγοντική ανάλυση δείχνει ότι τα επίπεδά τους από μόνα τους φαίνονται ανεπαρκή για χρήση στο διαχωρισμό της ΣΠΑ από την ΑΧΝ. Αυτό επιτείνεται και από την απουσία συσχέτισης ανάμεσα στις hepcidin/prohepcidin και των Tsat & sTfR, οι οποίοι είναι εδραιωμένοι δείκτες για την ταξινόμηση της αναιμίας. Αντίθετα, η θετική συσχέτιση που βρήκαμε ανάμεσα στη hepcidin και στη φερριτίνη είναι μάλλον αναμενόμενη καθώς και οι δύο είναι πρωτεΐνες οξείας φάσεως και τα επίπεδά τους αυξάνονται κατά τη διάρκεια ενεργού φλεγμονώδους διαδικασίας.

Στη μελέτη μας, στην πολυπαραγοντική ανάλυση μόνο η hepcidin διατήρησε ισχυρή θετική συσχέτιση με τη φερριτίνη και την ενεργότητα της νόσου στην ΕΚ, ενώ δεν υπήρχε συσχέτιση της prohepcidin με καμία άλλη παράμετρο. Η αντιφατική βιβλιογραφία αναφορικά με το ρόλο της prohepcidin στις ΙΦΕΝ, θα μπορούσε να ερμηνευθεί από τα πολύπλοκα βιοχημικά μονοπάτια της παραγωγής hepcidin. Φαίνεται ότι η prohepcidin δρα απλώς ως προ-μορφή της hepcidin και δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αξιόπιστος δείκτης ΣΠΑ ή ΑΧΝ. Μολονότι δεν έχουν περιγραφεί σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ hepcidin-25 και prohepcidin στον ορό^{31,32}, και λαμβάνοντας υπόψη ότι μελέτες δεν έχουν απαντήσει μέχρι τώρα στο ερώτημα εάν η prohepcidin υφίσταται περαιτέρω επεξεργασία και ωρίμανση είτε στην κυκλοφορία, είτε στην εξωκυττάρια ουσία, μετά την απελευθέρωσή της από τα ηπατικά ή άλλα κύτταρα³³, η αρνητική συσχέτισή τους στη μονοπαραγοντική ανάλυση φαίνεται να παρέχει τεκμηρίωση, αν και όχι τόσο ισχυρή, που υποστηρίζει την ύπαρξη ενός κοινού βιοχημικού μονοπατιού, τουλάχιστον μέχρις ένα βαθμό, που είναι υπεύθυνο για την ισορροπία ανάμεσα στο μετασχηματισμό της prohepcidin και την παραγωγή hepcidin στο ήπαρ.

Το εύρημα της ισχυρότερης συσχέτισης της hepcidin με την ενεργότητα της νόσου σε ασθενείς με ΕΚ, απ' ότι σε ασθενείς με ΝΚ, δεν φαίνεται να έχει κάποια εμφανή εξήγηση. Θα μπορούσε να αποδοθεί στη γνωστή μεγάλη διακύμανση των τιμών των κλινικών δεικτών ενεργότητας και ειδικά του CDAI. Επιπλέον, η θεραπεία με infliximab, που οδηγεί σε μείωση της ενεργότητας της νόσου και βελτίωση της αναιμίας³, δε συσχετίστηκε με τα επίπεδα hepcidin. Ωστόσο, η μελέτη μας ήταν τύπου

cross-sectional, και ο αριθμός των ασθενών με ΙΦΕΝ υπό θεραπεία με infliximab ήταν μικρός για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων. Το εύρημα της μάλλον ικανοποιητικής ευαισθησίας της χαμηλής hepcidin στη διάγνωση της ΣΠΑ (81%) υποδεικνύει ένα πιθανό ρόλο της στη φαρέτρα μας των δεικτών αναιμίας, ειδικά σε συνδυασμό με άλλους δείκτες, εδραιωμένους ή νέας γενιάς.

Η μελέτη μας έχει ορισμένους περιορισμούς, συμπεριλαμβανομένου του σχεδιασμού cross-sectional, που καθιστούν αδύνατη την αποσαφήνιση εάν τα επίπεδα στον ορό των μετρημένων δεικτών επηρεάζουν (θετικά ή αρνητικά) μελλοντικές μεταβολές των επιπέδων αιμοσφαιρίνης. Ο αριθμός των ασθενών με ΙΦΕΝ και αναιμία ήταν μάλλον μικρός για ανάλυση των υπο-ομάδων, αναφορικά με το αίτιο της αναιμίας. Επιπλέον, υπάρχουν ορισμένες αμφισβητήσεις σχετικά με τη μέθοδο ELISA για τη μέτρηση της prohepcidin, καθώς φαίνεται ότι η τελευταία μπορεί να είναι ασταθής στον ορό¹⁷.

Συμπερασματικά, η μελέτη μας έδειξε ότι τα επίπεδα στον ορό των hepcidin/prohepcidin είναι σημαντικά επηρεασμένα σε ασθενείς με ΙΦΕΝ, συγκριτικά με ΥΜ. Το εύρημα αυτό φαίνεται να βασίζεται στον ουσιώδη ρόλο των δύο αυτών ορμονών στη διαδικασία της φλεγμονής.

1.6. Βιβλιογραφία

1. Gasche C, Lomer M C E, Cavill I, Weiss G. Iron, anemia, and inflammatory bowel diseases. *Gut* 2004;53:1190-1197.
2. Wells C W, Lewis S, Barton J R, Corbett S. Effects of changes in hemoglobin level on quality of life and cognitive function in inflammatory bowel disease patients. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:123-130.
3. Bergamaschi G, Di Sabatino A, Albertini R, Ardizzone S, Biancheri P, Bonetti E, et al. Prevalence and pathogenesis of anemia in inflammatory bowel disease. Influence of anti-tumor necrosis factor-alpha treatment. *Haematologica* 2010;95:199-205.
4. Gomollón F, Gisbert JP. Anaemia and inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*. 2009;15:4659-4665.
5. Weiss G, Gasche C. Pathogenesis and treatment of anemia in inflammatory bowel disease. *Haematologica*. 2010;95:175-178.

6. Gasche C, Berstad A, Befrits R, Beglinger C, Dignass A, Erichsen K, et al. Guidelines on the diagnosis and management of iron deficiency and anemia in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13:1545-1553.
7. Tsiolakidou G, Koutroubakis IE. Stimulating erythropoiesis in inflammatory bowel disease anemia. *World J Gastroenterol*. 2007;13:4798-4806.
8. Hugman A. Hepcidin: an important new regulator of iron homeostasis. *Clin Lab Haematol*. 2006;28:75-83.
9. Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem*. 2001;276:7806-7810.
10. Krause A, Neitz S, Mägert HJ, Schulz A, Forssmann WG, Schulz-Knappe P, et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett*. 2000;480:147-150.
11. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. 2004;306:2090-2093.
12. Delaby C, Pilard N, Gonçalves AS, Beaumont C, Canonne-Hergaux F. Presence of the iron exporter ferroportin at the plasma membrane of macrophages is enhanced by iron loading and down-regulated by hepcidin. *Blood*. 2005;106:3979-3984.
13. Ganz T. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood*. 2003;102:783-788.
14. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem*. 2001;276:7811-7819.
15. Kemna E, Tjalsma H, Laarakkers C, Nemeth E, Willems H, Swinkels D. Novel urine hepcidin assay by mass spectrometry. *Blood*. 2005;106:3268-3270.
16. Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan JL, Bigard X, Devaux I, et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest*. 2002;110:1037-1044.
17. Sasu BJ, Li H, Rose MJ, Arvedson TL, Doellgast G, Molineux G. Serum hepcidin but not prohepcidin may be an effective marker for anemia of inflammation (AI). *Blood Cells Mol Dis*. 2010;45:238-245.

18. Semrin G, Fishman DS, Bousvaros A, Zholudev A, Saunders AC, Correia CE, et al. Impaired intestinal iron absorption in Crohn's disease correlates with disease activity and markers of inflammation. *Inflamm Bowel Dis*. 2006;12:1101-1106.
19. Arnold J, Sangwaiya A, Bhatkal B, Geoghegan F, Busbridge M. Hepcidin and inflammatory bowel disease: dual role in host defence and iron homeostasis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2009;21:425-429.
20. Kaya Z, Yildiz E, Gursel T, Albayrak M, Kocak U, Karadeniz C, et al. Serum Prohepcidin Levels in Children with Solid Tumors, Inflammatory Bowel Disease and Iron Deficiency Anaemia. *J Trop Pediatr*. 2010 Jul 2. [Epub ahead of print].
21. Nagy J, Lakner L, Poor V, Pandur E, Mozsik G, Miseta A, et al. Serum prohepcidin levels in chronic inflammatory bowel diseases. *J Crohns Colitis*. 2010;4:649-653.
22. Stange EF, Travis SP, Vermeire S, Beglinger C, Kupcinkas L, Geboes K, et al. European Crohn's and Colitis Organisation. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut*. 2006;55:i1-15.
23. Stange EF, Travis SPL, Vermeire S, Reinisch W, Geboes K, Barakauskiene R, et al. European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO). European evidence based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: Definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis*. 2008;2:1-23.
24. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, Brant SR, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol*. 2005;19 Suppl A:5-36.
25. WHO, UNICEF, UNU. Iron Deficiency Anemia: Assessment, Prevention and Control. A guide for programme managers. WHO reference number: WHO/NHD/01.3, WHO publications, 2001, p33.
26. Ganz T. Hepcidin and its role in regulating systemic iron metabolism. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006:29-35.
27. Fleming MD. The regulation of hepcidin and its effects on systemic and cellular iron metabolism. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2008:151-158.
28. Kemna E, Pickkers P, Nemeth E, van der Hoeven H, Swinkels D. Time-course analysis of hepcidin, serum iron, and plasma cytokine levels in humans injected with LPS. *Blood* 2005;106:1864-1866.

29. Kroot JJC, Kemna EHJM, Bansal SS, Busbridge M, Campostrini N, Girelli D, et al. Results of the first international round robin for the quantification of urinary and plasma hepcidin assays: need for standardization. *Haematologica* 2009;94:1748-1752.
30. Jayarane S, Sthaneshwar P, Sokkalingam S. Serum prohepcidin concentrations in rheumatoid arthritis. *Pathology*. 2009;41:178-182.
31. Kemna EH, Kartikasari AE, van Tits LJ, Pickkers P, Tjalsma H, Swinkels DW. Regulation of hepcidin: insights from biochemical analyses on human serum samples. *Blood Cells Mol. Diseases* 2008;40: 339–346.
32. Valore E, Ganz T. Posttranslational processing of hepcidin in human hepatocytes is mediated by the prohormone convertase furin. *Blood Cells Mol. Dis.* 2008;40:132–138.
33. Beirão I, Almeida S, Swinkels D, Costa PM, Moreira L, Fonseca I, et al. Low serum levels of prohepcidin, but not hepcidin-25, are related to anemia in familial amyloidosis TTR V30M. *Blood Cells Mol Dis.* 2008;41:175-178.

Κλινικές μελέτες

Μέρος 3ο

**Ο ρόλος των δεικτών
ερυθροκυττάρων και
δικτυοερυθροκυττάρων στην
αξιολόγηση της αναιμίας των ΙΦΕΝ**



2.1. Περίληψη

Εισαγωγή: Οι συχνότεροι τύποι αναιμίας στις ΙΦΕΝ είναι η ΣΠΑ και η ΑΧΝ. Ο διαχωρισμός μεταξύ των δύο αυτών καταστάσεων είναι σημαντικός για την αντιμετώπιση του ασθενούς. Ο σκοπός της μελέτης αυτής ήταν η διερεύνηση της χρησιμότητας των δεικτών ερυθροκυττάρων και δικτυοερυθροκυττάρων (ΔΕΚ) στην αξιολόγηση της αναιμίας που συνοδεύει τις ΙΦΕΝ.

Υλικό-μέθοδος: Στη μελέτη έλαβαν μέρος 100 ασθενείς με ΙΦΕΝ [49 με ΕΚ και 51 με ΝC] και 102 υγιείς μάρτυρες (ΥΜ). Η μέτρηση των δεικτών ερυθρών και ΔΕΚ έγινε με χρήση του αιματολογικού αναλυτή Coulter LH 780 (Beckman Coulter). Επιπλέον, αναλύθηκαν τα επίπεδα στον ορό φερριτίνης, κορεσμού τρανσφερρίνης (Tsat) και διαλυτών υποδοχέων τρανσφερρίνης (sTfR), σε όλους τους ασθενείς και ΥΜ.

Αποτελέσματα: Ο επιπολασμός της αναιμίας ήταν 41.2% για την ΕΚ και 42.9% για τη ΝC, ενώ 30 ασθενείς (30%) έπασχαν από ΣΠΑ. Βρέθηκε σημαντική συσχέτιση του εύρους κατανομής των ερυθρών (RDW), του παράγοντα μεγέθους των ερυθρών (Red blood cell size factor, RSF) και του συντελεστή διακύμανσης του εύρους κατανομής των ΔΕΚ (Reticulocyte distribution width-coefficient of variation, RDWR-CV) με τον Tsat και τον sTfR, αλλά όχι με τα επίπεδα φερριτίνης. Οι ασθενείς με ΣΠΑ είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα RDW και RDWR-CV καθώς και σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα RSF, συγκριτικά με τους ασθενείς χωρίς ΣΠΑ. Οι υψηλές τιμές του RDW (ευαισθησία 93%, ειδικότητα 81%) και οι χαμηλές τιμές του RSF (ευαισθησία 83%, ειδικότητα 82%) ήταν οι καλύτεροι δείκτες για τη διάγνωση της ΣΠΑ. Υπήρχε σημαντική συσχέτιση των RDWR-CV και RDWR-SD (Standard Deviation) με την ενεργότητα της νόσου και τα επίπεδα CRP.

Συμπέρασμα: Οι RDW, RSF και RDWR θα μπορούσαν να είναι χρήσιμοι δείκτες για την αξιολόγηση της αναιμίας και της ενεργότητας της νόσου στις ΙΦΕΝ.

2.2. Εισαγωγή

Η αναιμία είναι μία από τις συχνότερες εξωεντερικές εκδηλώσεις τω ΙΦΕΝ¹⁻³, με σημαντική επίδραση στην ποιότητα ζωής των ασθενών⁴. Οι συχνότεροι τύποι αναιμίας είναι η ΣΠΑ (έως και στο 90% τω ασθενών) και η ΑΧΝ (με επιπολασμό 11-42%)⁵⁻⁸. Άλλα σπανιότερα αίτια αναιμίας είναι η ένδεια βιταμίνης Β₁₂ ή φυλικού οξέος, η αιμόλυση και αναιμία από φάρμακα^{9,10}.

Ένα συχνό και περίπλοκο πρόβλημα που αντιμετωπίζει ο κλινικός που χειρίζεται ασθενείς με ΙΦΕΝ είναι η διάγνωση του τύπου της αναιμίας σε κάθε ασθενή και ο καθορισμός του βαθμού σιδηροπενίας και του βαθμού φλεγμονής, με στόχο τη, βασισμένη σε στοιχεία, απόφαση για την καλύτερη αντιμετώπιση της αναιμίας, εξατομικευμένη για κάθε ασθενή¹¹. Η αξιολόγηση της αναιμίας απαιτεί τον καθορισμό του προφίλ σιδήρου του οργανισμού. Η φερριτίνη ορού είναι ένας δείκτης των αποθηκών σιδήρου, όμως υπό συνθήκες φλεγμονής μπορεί να μην αντιστοιχεί επακριβώς στις αποθήκες σιδήρου, καθώς η έκφρασή της επηρεάζεται από τις κυτταροκίνες¹². Ο σίδηρος ορού και ο Tsat είναι χαμηλοί και στις δύο καταστάσεις (ΣΠΑ & ΑΧΝ), έτσι δεν είναι χρήσιμοι στη διαφορική διάγνωση¹². Τα επίπεδα sTfR στον ορό είναι αυξημένα σε καταστάσεις χαμηλής διαθεσιμότητας σιδήρου για ερυθροποίηση αλλά στην ΑΧΝ είναι φυσιολογικά, εξαιτίας του γεγονότος ότι η έκφραση του υποδοχέα τρανσφερρίνης επηρεάζεται αρνητικά από τις φλεγμονώδεις κυτταροκίνες¹³. Φαίνεται ότι οι συμβατικοί δείκτες του προφίλ σιδήρου δε μπορούν με ασφάλεια να αναγνωρίσουν τη ΣΠΑ, πάνω σε μία χρόνια φλεγμονώδη κατάσταση.

Κατά την τελευταία δεκαετία, έχουν προστεθεί στη φαρέτρα μας διάφορες νέες παράμετροι για τη διάγνωση της ΣΠΑ ή της ΑΧΝ, σαν αποτέλεσμα της ανάπτυξης πιο εξειδικευμένων και τεχνολογικά προηγμένων αυτόματων αιματολογικών αναλυτών. Ο αιματολογικός αναλυτής COULTER® LH 780 (Beckman Coulter, Inc., CA, USA) είναι ένα αναλυτής τελευταίας γενιάς που παρέχει αυτοματοποιημένες μετρήσεις μίας ποικιλίας νέων δεικτών ερυθρών και ΔΕΚ. Ο RSF είναι η τετραγωνική ρίζα του γινομένου MCV X MRV (Mean Reticulocyte Volume) και φαίνεται να είναι μία κατάλληλη παράμετρος για τη μελέτη της ερυθροποιητικής δραστηριότητας του μυελού των οστών, καθώς παρουσιάζει υψηλό ποσοστό συμφωνίας με την αιμοσφαιρίνη των ΔΕΚ (reticulocyte hemoglobin content, CHr)¹⁴. Το κλάσμα των ανώριμων ΔΕΚ (IRF, immature reticulocyte fraction) είναι ένας πρώιμος και ευαίσθητος δείκτης ερυθροποίησης και είναι χρήσιμος στο διαχωρισμό αναιμίας με αυξημένη ερυθροποίηση

από αναιμία με μειωμένη δραστηριότητα του μυελού και από καταστάσεις όπως οξείες λοιμώξεις και μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα¹⁵. Το RDWR-SD είναι η τυπική απόκλιση του όγκου των ΔΕΚ πολλαπλασιασμένου με τον παράγοντα όγκου. Το RDWR-CV είναι ο λόγος του RDWR-SD/μέσο όγκο ΔΕΚ, πολλαπλασιασμένο επί 100. Και οι δύο δείκτες εξάγονται από το ιστόγραμμα των ΔΕΚ. Το RDWR είναι μία εκτίμηση της διασποράς μεγέθους εντός του πληθυσμού των ΔΕΚ¹⁶.

Ο σκοπός της μελέτης αυτής ήταν η διερεύνηση της χρησιμότητας διαφόρων δεικτών ερυθρών και ΔΕΚ στην αξιολόγηση της αναιμίας των ΙΦΕΝ.

2.3. Υλικό-Μεθοδολογία

Ασθενείς

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιοι ασθενείς και ΥΜ της παραγράφου 1.3.

Εργαστηριακές μετρήσεις

Από ασθενείς και ΥΜ συλλέχθηκαν δείγματα ολικού αίματος για γενική αίματος και μέτρηση της Ταχύτητας Καθίζησης Ερυθρών (ΤΚΕ), άμεσα με τη λήψη τους. Όλες οι γενικές αίματος διενεργήθηκαν στον αιματολογικό αναλυτή Coulter® LH 780 (Beckman Coulter, Inc., California, USA), βάσει των οδηγιών του κατασκευαστή.

Επιπλέον, σε κάθε ασθενή και ΥΜ μετρήθηκαν οι δείκτες: RSF, IRF, RDWR-SD και RDWR-CV. Τα δείγματα ορού συλλέχθηκαν μετά από άμεση φυγοκέντρηση των δειγμάτων ολικού αίματος, σε θερμοκρασία δωματίου, προς προσδιορισμό των ακόλουθων εργαστηριακών παραμέτρων: C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP), σίδηρος (Fe), φερριτίνη, τρανσφερρίνη, διαλυτός υποδοχέας τρανσφερρίνης (sTfR) και κορεσμός τρανσφερρίνης (Tsat). Όλες οι μετρήσεις διεξήχθησαν βάσει της κοινής κλινικής πρακτικής.

Στατιστική ανάλυση

Όλα τα αποτελέσματα εκφράζονται ως [μέση τιμή ± τυπική απόκλιση]. Οι συγκρίσεις μεταξύ των 3 διαγνωστικών ομάδων, αναφορικά με τις συνεχείς μετρήσεις, έγιναν με το τεστ Kruskal-Wallis (μη παραμετρική ANOVA). Οι post hoc πολλαπλές δοκιμασίες σύγκρισης έγιναν με το τεστ Dunn. Οι συγκρίσεις ανάμεσα σε δύο ομάδες έγιναν είτε με το Student's t-test, είτε με το Mann-Whitney U test. Το Kolmogorov & Smirnov test χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της παραδοχής ότι τα δεδομένα εξήχθησαν από πληθυσμούς που ακολουθούν την κατανομή Gauss. Οι συσχετίσεις

μεταξύ των δεικτών ερυθρών/ΔΕΚ και δεικτών σιδηροπενίας ή ενεργότητας νόσου αναλύθηκαν με τη μέθοδο συσχέτισης Pearson. Για την εκτίμηση της αξιοπιστίας των δεικτών στη διάγνωση ΣΠΑ, υπολογίσθηκαν η ευαισθησία, η ειδικότητα και η ΘΠΑ και ΑΠΑ. Ως στατιστικά σημαντικό επίπεδο θεωρήθηκε τιμή $P < 0.05$. Όλες οι αναλύσεις ήταν τύπου two-tailed και διενεργήθηκαν με χρήση του στατιστικού προγράμματος InStat, version 3 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, USA).

2.4. Αποτελέσματα

Ο επιπολασμός της αναιμίας σε αυτή την ομάδα ασθενών με ΙΦΕΝ ήταν 42% (41.2% για την ΕΚ και 42.9% για τη ΝC). 3 ασθενείς (3%) είχαν σοβαρή αναιμία ($Hgb < 8$ g/dL), 7 ασθενείς (7%) είχαν μέτρια αναιμία (Hgb μεταξύ 8-9.5 g/dL) και 32 ασθενείς (32%) είχαν ήπια αναιμία ($Hgb > 9.5$ g/dL). 30 ασθενείς (30%) είχαν ΣΠΑ (φερριτίνη < 30 μ g/L & $Tsat < 16\%$), 4 ασθενείς (4%) είχαν AXN (φερριτίνη > 100 μ g/L & $Tsat < 16\%$) και 8 ασθενείς (8%) είχαν μικτή ΣΠΑ/AXN (φερριτίνη = 30-100 μ g/L & $Tsat < 16\%$).

Οι εργαστηριακές παράμετροι των ασθενών με ΕΚ και ΝC, συγκριτικά με τους ΥΜ απεικονίζονται στον πίνακα 1. Παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στους ασθενείς και τους ΥΜ, όσον αφορά όλες τις παραμέτρους (αιμοσφαιρίνη, MCV, RDW, IRF, RDWR-CV, RDWR-SD, φερριτίνη, $Tsat$, $sTfR$, CRP, TKE), πλην του RSF. Δε βρέθηκαν διαφορές μεταξύ ΕΚ και ΝC.

Οι συσχετίσεις μεταξύ των διαφόρων δεικτών (RDW, RSF, IRF, RDWR-CV, RDWR-SD) και των δεικτών σιδηροπενίας (φερριτίνη, $Tsat$, $sTfR$) παρουσιάζονται στον πίνακα 2. Υπήρχε σημαντική συσχέτιση μεταξύ των RDW, RSF, RDWR-CV και των $Tsat$, $sTfR$.

Στον πίνακα 3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της σύγκρισης των ασθενών με ΣΠΑ και των ασθενών με αναιμία άλλου τύπου ή χωρίς αναιμία. Οι δείκτες RDW, RSF και RDWR-CV ήταν σημαντικά διαφορετικοί στους ασθενείς με ΣΠΑ, συγκριτικά με εκείνους χωρίς ΣΠΑ. Σύγκριση των ασθενών με ΙΦΕΝ+ΣΠΑ και των ασθενών με ΙΦΕΝ+AXN (ή μικτή ΣΠΑ/AXN) δεν ανέδειξε διαφορές στις εξετασθείσες παραμέτρους (πίνακας 4).

| Παράμετρος | EK | NC | YM | p |
|----------------------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------|
| Mean ± SD | | | | |
| Αιμοσφαιρίνη(g/dl) | 13.1 ± 2.0 | 12.6 ± 1.9 | 15.0 ± 1.2 | <0.0001 |
| MCV (fl) | 86.4 ± 8.1 | 87.6 ± 11.0 | 90.1 ± 5.5 | 0.01 |
| RDW (%) | 15.4 ± 2.3 | 15.9 ± 2.4 | 13.7 ± 1.1 | <0.0001 |
| RSF (fl) | 96.7 ± 7.6 | 97.4 ± 11.2 | 97.6 ± 5.3 | 0.82 |
| IRF | 0.35 ± 0.05 | 0.33 ± 0.06 | 0.29 ± 0.05 | <0.0001 |
| RDWR-CV | 27.2 ± 4.6 | 28.3 ± 5.5 | 25.4 ± 2.5 | <0.0001 |
| RDWR-SD | 29.3 ± 5.4 | 30.4 ± 4.9 | 26.8 ± 3.1 | <0.0001 |
| Φερριτίνη (μg/L, median, εύρος) | 42.1 (3.6-381.3) | 33.4 (2.2-514.0) | 71.0 (10.0-259.5) | 0.003 |
| Tsat (%) | 20.4 ± 10.6 | 16.9 ± 12.8 | 32.2 ± 15.1 | <0.0001 |
| sTfR (mg/L) | 1.6 ± 0.9 | 1.7 ± 0.9 | 1.1 ± 0.2 | <0.0001 |
| CRP(mg/dl, median, εύρος) | 0.37 (0.32-5.3) | 0.39 (0.32-10.7) | 0.29 (0.29-1.5) | <0.0001 |
| TKE (mm/h) | 22.8 ± 19.2 | 28.0 ± 16.2 | 6.9 ± 5.7 | <0.0001 |

Πίνακας 1. Εργαστηριακά δεδομένα ασθενών με ΙΦΕΝ, σε σύγκριση με τους YM.

Οι καλύτεροι δείκτες διάγνωσης ΣΠΑ ήταν οι υψηλές τιμές RDW και χαμηλές τιμές RSF. Η ευαισθησία του υψηλού RDW για τη διάγνωση ΣΠΑ με όριο αποκοπής το 14 (ανώτερο 95% όριο εμπιστοσύνης των YM) ήταν 93%, η ειδικότητα 81%, η ΘΠΑ 68% και η ΑΠΑ 96%. Παρομοίως, η ευαισθησία του χαμηλού RSF για τη διάγνωση της ΣΠΑ με όριο αποκοπής τα 98.6 fL (ανώτερο 95% όριο εμπιστοσύνης των YM) ήταν

83%, η ειδικότητα 82%, ενώ η ΘΠΑ ήταν 67% και η ΑΠΑ 92%. Η ευαισθησία των υψηλών τιμών του RDWR-CV για τη διάγνωση της ΣΠΑ, με όριο αποκοπής το 25.9 (ανώτερο 95% όριο εμπιστοσύνης των YM) ήταν 60%, η ειδικότητα 51%, η ΘΠΑ 35% και η ΑΠΑ 75%.

Αναφορικά με την ενεργότητα της νόσου, οι δείκτες RDW & RSF δεν ήταν σημαντικά διαφορετικοί μεταξύ ενεργού και μη ενεργού νόσου και δε βρέθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ RDW ή RSF και επιπέδων CRP ($r=0.16$, $p=0.12$ και $r=-0.16$, $p=0.12$, αντίστοιχα). Ανιχνεύθηκε μία τάση συσχέτισης μεταξύ επιπέδων IRF και CRP, αν και δεν ήταν στατιστικώς σημαντική ($r=0.18$, $p=0.06$). Τόσο για το RDWR-CV, όσο και για το RDWR-SD βρέθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ ενεργού και μη ενεργού νόσου ($p<0.05$). Επιπλέον, υπήρχε σημαντική συσχέτιση μεταξύ RDWR-CV ή RDWR-SD και CRP ($r=0.39$, $p<0.0001$ και $r=0.31$, $p=0.001$, αντίστοιχα).

Δεν υπήρξαν σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των ελεγχθέντων δεικτών και άλλων κλινικών χαρακτηριστικών των ασθενών (φύλο, ηλικία, κάπνισμα, διάρκεια νόσου, εξωεντερικές εκδηλώσεις και χρήση φαρμάκων).

| Παράμετρος | Φερριτίνη | | Tsats | | sTfR | |
|----------------|-----------|------|-------|---------|-------|---------|
| | r | p | r | p | r | p |
| RDW | -0.10 | 0.32 | -0.39 | <0.0001 | 0.54 | <0.0001 |
| RSF | 0.09 | 0.33 | 0.36 | 0.0002 | -0.54 | <0.0001 |
| IRF | 0.09 | 0.38 | -0.01 | 0.33 | 0.01 | 0.88 |
| RDWR-CV | 0.14 | 0.17 | -0.21 | 0.03 | 0.38 | <0.0001 |
| RDWR-SD | 0.14 | 0.15 | -0.02 | 0.80 | 0.11 | 0.26 |

Πίνακας 2. Συσχετίσεις μεταξύ διαφόρων παραμέτρων και δεικτών σιδηροπενίας (φερριτίνη, Tsats, sTfR), σε ασθενείς με ΙΦΕΝ.

| Παράμετρος | Ασθενείς με ΣΠΑ | Ασθενείς χωρίς ΣΠΑ | p |
|----------------|-----------------|--------------------|--------|
| RDW | 17.0 ± 2.1 | 15.1 ± 2.2 | 0.0002 |
| RSF | 91.9 ± 10.1 | 99.1 ± 8.5 | 0.0004 |
| IRF | 0.32 ± 0.06 | 0.34 ± 0.05 | 0.19 |
| RDWR-CV | 30.1 ± 7.2 | 26.7 ± 3.4 | 0.02 |
| RDWR-SD | 30.1 ± 4.2 | 29.7 ± 5.5 | 0.53 |

Πίνακας 3. Σύγκριση των υπό αξιολόγηση δεικτών σε ασθενείς με και χωρίς ΣΠΑ.

| Παράμετρος | Ασθενείς με ΣΠΑ | Ασθενείς με AXN | p |
|----------------|-----------------|-----------------|------|
| RDW | 17.0 ± 2.1 | 16.2 ± 1.5 | 0.30 |
| RSF | 91.9 ± 10.1 | 94.1 ± 9.1 | 0.43 |
| IRF | 0.32 ± 0.06 | 0.33 ± 0.05 | 0.54 |
| RDWR-CV | 30.1 ± 7.2 | 28.3 ± 7.1 | 0.37 |
| RDWR-SD | 30.1 ± 4.2 | 29.8 ± 5.5 | 0.59 |

Πίνακας 4. Σύγκριση των υπό αξιολόγηση δεικτών σε ασθενείς με ΣΠΑ και AXN (ή μεικτή ΣΠΑ/AXN).

2.5. Συζήτηση

Στη μελέτη αυτή διερευνήθηκε η χρησιμότητα ενός συμβατικού δείκτη (RDW) και τεσσάρων δεικτών νέας γενιάς (IRF, RSF, RDWR-CV, RDWR-SD) στην αξιολόγηση της αναιμίας των ασθενών με ΙΦΕΝ. Σχετικά με τους νέους δείκτες, αυτή είναι η πρώτη μελέτη αξιολόγησής στους σε αυτή την κατηγορία ασθενών. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι η διαθεσιμότητα νέων εργαστηριακών εργαλείων, εύκολα προσβάσιμων μέσα από μία γενική αίματος, θα είχε εξαιρετική χρησιμότητα για τον

κλινικό ιατρό και θα μπορούσε να υποστηρίξει την τελική θεραπευτική απόφαση. Η φερριτίνη, ο κορεσμός τρανσφερρίνης και οι διαλυτοί υποδοχείς τρανσφερρίνης είναι εδραιωμένοι δείκτες αξιολόγησης αναιμίας, με τα επίπεδα φερριτίνης να επηρεάζονται από τη συνύπαρξη φλεγμονής, ενώ ο sTfR δεν έχει σταθερή προτυποποίηση μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων και είναι μία παράμετρος όχι ευρέως διαθέσιμη^{17,18}.

Μία ποικιλία νέων δεικτών ερυθρών και ΔΕΚ, σχετιζόμενων με αναιμία, βρίσκεται υπό αξιολόγηση στη βιβλιογραφία^{19,20} και μία νέα γενιά αιματολογικών αναλυτών, όπως ο COULTER LH 780 στον οποίο βασίστηκε η μελέτη αυτή, προσφέρουν μέτρηση μερικών νέων παραμέτρων, οι οποίες βρίσκονται επίσης υπό αξιολόγηση, σε μία προσπάθεια δημιουργίας ενός «προφίλ αναιμίας» για κάθε ασθενή, στη βάση μίας απλής γενικής αίματος, μειώνοντας έτσι την ανάγκη για άλλους, πιο ακριβούς, δείκτες δεύτερης γραμμής, όπως η φερριτίνη, ο Tsat και ο sTfR.

Το RDW είναι μία ποσοτική έκφραση της διακύμανσης του μεγέθους των ερυθρών και είναι ισοδύναμο της ανισοκυττάρωσης. Χρησιμοποιείται ευρέως ως οδηγός στη διαφορική διάγνωση της αναιμίας, με υψηλές τιμές να συναντώνται σε ΣΠΑ. Στη μελέτη μας, το RDW ήταν σημαντικά αυξημένο στους ασθενείς με ΙΦΕΝ, συγκριτικά με τους ΥΜ, καθώς και σε ασθενείς με ΣΠΑ, σε σχέση με ασθενείς χωρίς ΣΠΑ. Οι Cakal και συν.²¹ αναφέρουν ότι τα επίπεδα RDW ήταν αυξημένα σε ασθενείς με ΙΦΕΝ και ενεργό νόσο, με σημαντική συσχέτιση με τη CRP. Στη μελέτη μας, το RDW δεν ήταν σημαντικά διαφορετικό μεταξύ ενεργού και μη ενεργού νόσου και δεν υπήρξε σημαντική συσχέτιση με τα επίπεδα CRP. Οι Clarke και συν.²² πρότειναν το RDW σαν ένα αποτελεσματικό δείκτη διαφοροποίησης μεταξύ NC και ΕΚ. Ωστόσο, στη μελέτη μας δε βρέθηκε διαφορά μεταξύ των δύο νόσων. Το εύρημα του υψηλού RDW στους ασθενείς με ΙΦΕΝ μπορεί να εξηγηθεί στη βάση της σιδηροπενίας που έχει η πλειοψηφία των ασθενών αυτών, δικαιολογώντας το υψηλό ποσοστό ανισοκυττάρωσης. Η ισχυρή αρνητική συσχέτιση του RDW με τον Tsat και η θετική του συσχέτιση με τον sTfR, όπως και το υψηλό RDW στην ομάδα με ΣΠΑ, δεν είναι μη αναμενόμενα ευρήματα, δεδομένου του χαμηλού ρυθμού παραγωγής ερυθρών και επακόλουθης ανισοκυττάρωσης σε καταστάσεις σιδηροπενίας. Η υψηλή ευαισθησία (93%) του υψηλού RDW για τη διάγνωση ΣΠΑ, με όριο αποκοπής το 14 είναι σε συμφωνία με άλλες μελέτες, που προτείνουν το δείκτη αυτό ως μεγάλης ευαισθησίας για τη σιδηροπενία²³. Από την άλλη πλευρά, φαίνεται ότι το RDW δεν επηρεάζεται σημαντικά από την ενεργότητα της νόσου, επειδή στηρίζεται κυρίως στην ερυθροποιητική δραστηριότητα του μυελού και όχι στο βαθμό φλεγμονής. Ως εκ τούτου, ο RDW μπορεί

να προταθεί ως ένας κατάλληλος δείκτης για το διαχωρισμό μεταξύ ΣΠΑ και ΑΧΝ, σε ασθενείς με ενεργό ΙΦΕΝ. Ωστόσο, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δεν κατάφεραν να επιβεβαιώσουν την υπόθεση αυτή λόγω του μικρού αριθμού ασθενών με ΑΧΝ που συμμετείχαν σε αυτήν, που καθιστά την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων επισφαλής.

Ο IRF αναφέρεται στα λιγότερο ώριμα ΔΕΚ, που περιέχουν περισσότερο mRNA²². Ο IRF είναι ο λόγος των ανώριμων ΔΕΚ προς το συνολικό αριθμό των ΔΕΚ. Ο IRF αυξάνεται πριν τον αριθμό των ΔΕΚ και είναι ένας πρώιμος και ευαίσθητος δείκτης ερυθροποίησης^{15,24}. Στη μελέτη μας, ο IRF ήταν σημαντικά αυξημένος στους ασθενείς, σε σχέση με τους ΥΜ, όμως και στις δύο ομάδες ήταν εντός των φυσιολογικών ορίων, βάσει του εύρους του κατασκευαστή (0.20-0.40). Το εύρημα φαίνεται λογικό, λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός της συνεχούς απώλειας αίματος σε ασθενείς με ΙΦΕΝ, συχνά υποκλινικής, σαν αποτέλεσμα της χρόνιας φλεγμονής στο έντερο, οδηγώντας έτσι σε αυξημένο οδηγό σήμα για ερυθροποίηση στο μυελό των οστών, ακόμα και υπό συνθήκες χαμηλής διαθεσιμότητας σιδήρου, λόγω μειωμένης απορρόφησής του. Ωστόσο, ο IRF είναι ένας μη προτυποποιημένος δείκτης, το εύρος αναφοράς εξαρτάται από τη μέθοδο και η ευαισθησία του είναι μικρότερη σε αναλυτές που δε βασίζονται σε φθορισμό, όπως ο COULTER LH 780¹⁵. Αυτό κάνει τον IRF ένα δείκτη μάλλον περιορισμένης χρησιμότητας στην αξιολόγηση της αναιμίας των ΙΦΕΝ, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και από τα αποτελέσματα της μελέτης μας, όπου δεν υπήρξε συσχέτιση του IRF με τη φερριτίνη, τον Tsat και τον sTfR, καθώς και καμία διαφορά μεταξύ ασθενών με και χωρίς ΣΠΑ.

Ο RSF συνδέει τον MCV με τον MRV. Η βιβλιογραφία περί αυτού είναι περιορισμένη. Σε μία μελέτη αξιολόγησης¹⁴, φάνηκε πολύ καλό επίπεδο συμφωνίας με την αιμοσφαιρίνη των ΔΕΚ. Η διαγνωστική απόδοση του RSF σε ασθενείς με περιορισμένη ερυθροποίηση (όπως ασθενείς με ΣΠΑ), σε σύγκριση με εκείνους με φυσιολογική ερυθροποίηση, ήταν άριστη, κάνοντας το δείκτη αυτό ένα αποτελεσματικό εργαλείο παροχής δεδομένων πραγματικού χρόνου σχετικά με την παροχή σιδήρου για ερυθροποίηση. Στη μελέτη μας, η ευαισθησία του RSF για τη διάγνωση ΣΠΑ ήταν 83% και η ειδικότητα 82%. Ανιχνεύθηκε σημαντική θετική συσχέτιση με τον Tsat και αρνητική με τον sTfR, ενώ ο RSF ήταν σημαντικά χαμηλότερος σε ασθενείς με ΣΠΑ, συγκριτικά με ασθενείς χωρίς ΣΠΑ. Δε βρέθηκε συσχέτιση με την ενεργότητα της νόσου ή τη CRP. Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν την υπόθεση ότι ο RSF φαίνεται να είναι μία ευαίσθητη παράμετρος πραγματικού χρόνου για την πρώιμη ανίχνευση

διαταραχών των ερυθροποιητικών μηχανισμών στη λειτουργική σιδηροπενία, σε ασθενείς με ΙΦΕΝ.

Τα δημοσιευμένα δεδομένα σχετικά με το εύρος κατανομής των ΔΕΚ είναι πολύ περιορισμένα¹⁶. Στη μελέτη μας το RDWR-SD ήταν σημαντικά αυξημένο στους ασθενείς, συγκριτικά με τους ΥΜ ($p < 0.0001$), και το RDWR-CV ήταν αυξημένο τόσο στους ασθενείς (σε σχέση με τους ΥΜ) όσο και στους ασθενείς με ΣΠΑ (σε σχέση με εκείνους με μη-ΣΠΑ). Λαμβάνοντας υπόψη την ισχυρή αρνητική συσχέτιση του τελευταίου με τον Tsat και τη θετική συσχέτιση με τον sTfR, φαίνεται ότι ο RDWR-CV είναι ένας ευαίσθητος δείκτης διασποράς του πληθυσμού των ΔΕΚ, αντανακλώντας μία παρακολούθηση πραγματικού χρόνου της παραγωγής των ΔΕΚ, πέρα από τον εδραιωμένο αριθμό των ΔΕΚ, που φαίνεται να αντιστοιχεί περισσότερο σε μία μεμονωμένη στιγμή του κύκλου ζωής των ΔΕΚ. Επιπλέον, τόσο ο RDWR-CV, όσο και ο RDWR-SD συσχετίστηκαν καλά με την ενεργότητα της νόσου και τη CRP, ένα εύρημα πολλά υποσχόμενο στη βάση ότι οι δείκτες αυτοί θα μπορούσαν να συνδυαστούν με άλλους (που αντιστοιχούν μόνο σε σιδηροπενία), ώστε να διαχωριστεί η υπο-ομάδα των ασθενών με καθαρή ΣΠΑ (και όχι μικτή με ΑΧΝ).

Συμπερασματικά, η μελέτη αυτή είναι η πρώτη που ανακοινώνει τη χρησιμότητα των δεικτών των ΔΕΚ στην αξιολόγηση της αναιμίας σε ασθενείς με ΙΦΕΝ. Ο RSF και ο RDWR, μόνοι ή σε συνδυασμό με το RDW και άλλους εδραιωμένους δείκτες αναιμίας και φλεγμονής (Tsat, sTfR, CRP), δείχνουν πολλά υποσχόμενοι σαν νέα ευαίσθητα εργαλεία, παρέχοντας στον κλινικό αρκετά δεδομένα από μία απλή και φθηνή γενική εξέταση αίματος. Έτσι, η απόφαση θεραπείας της αναιμίας γίνεται πιο τεκμηριωμένη, χωρίς την ανάγκη άλλων, δεύτερης γραμμής και ακριβότερων, παραμέτρων.

2.6. Βιβλιογραφία

1. Gasche C. Anemia in IBD: the overlooked villain. *Inflamm Bowel Dis.* 2000;6:142–150.
2. Cronin CC, Shanahan F. Anemia in patients with chronic inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 2001;96: 2296–2298.
3. Gasche C, Lomer MC, Cavill I, Weiss G. Iron, anaemia, and inflammatory bowel diseases. *Gut* 2004;53:1190-1197.

4. Wells CW, Lewis S, Barton JR, Corbett S. Effects of changes in hemoglobin level on quality of life and cognitive function in inflammatory bowel disease patients. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:123-130.
5. Bergamaschi G, Di Sabatino A, Albertini R, Ardizzone S, Biancheri P, Bonetti E, Cassinotti A, Cazzola P, Markopoulos K, Massari A, Rosti V, Porro GB, Corazza GR. Prevalence and pathogenesis of anemia in inflammatory bowel disease. Influence of anti-tumor necrosis factor-alpha treatment. *Haematologica* 2010;95:199-205.
6. Gomollón F, Gisbert JP. Anemia and inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*. 2009;15:4659-65.
7. Weiss G, Gasche C. Pathogenesis and treatment of anemia in inflammatory bowel disease. *Haematologica*. 2010;95:175-8.
8. Gisbert JP, Gomollón F. Common misconceptions in the diagnosis and management of anemia in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2008;103:1299-1307.
9. Gasche C, Berstad A, Befrits R, Beglinger C, Dignass A, Erichsen K, Gomollon F, Hjortswang H, Koutroubakis I, Kulnigg S, Oldenburg B, Rampton D, Schroeder O, Stein J, Travis S, Van Assche G. Guidelines on the diagnosis and management of iron deficiency and anemia in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13:1545-53.
10. Tsiolakidou G, Koutroubakis IE. Stimulating erythropoiesis in inflammatory bowel disease anemia. *World J Gastroenterol*. 2007;13:4798-806.
11. Zhu A, Kaneshiro M, Kaunitz J.D. Evaluation and treatment of iron deficiency anemia: a gastroenterological perspective. *Dig Dis Sci*. 2010;55:548-559.
12. Stein J, Hartmann F, Dignass A. Diagnosis and management of iron deficiency anemia in patients with IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. doi:10.1038/nrgastro.2010.151
13. Weiss G, Goodnough L.T. Anemia of chronic disease. *N Engl J Med* 2005;352:1011-1023.
14. Urrechaga E. Clinical utility of the new Beckman-coulter parameter red blood cell size factor in the study of erythropoiesis. *Int J Lab Hematol* 2009;31:623-629.
15. Buttarello M, Plebani M. Automated blood cell counts. *Am J Clin Pathol* 2008;130:104-116.

16. Beckman-Coulter bulletin 9618: Research use only (RUO) options for Coulter LH series hematology systems. Beckman Coulter Inc, 2006. www.beckmancoulter.com
17. Wish JB. Assessing iron status: beyond serum ferritin and transferrin saturation. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2006;1:S4–S8.
18. Zimmermann MB. Methods to assess iron and iodine status. *Br J Nutr.* 2008;99:S2–S9.
19. Kim JM, Ihm CH, Kim HJ. Evaluation of reticulocyte haemoglobin content as marker of iron deficiency and predictor of response to intravenous iron in haemodialysis patients. *Int J Lab Hematol* 2008;30:46-52.
20. David O, Grillo A, Ceoloni B, Cavallo F, Podda G, Biancotti P, Bergamo D, Canavese C. Analysis of red cell parameters on the Sysmex XE 2100 and ADVIA 120 in iron deficiency and in uraemic chronic disease. *Scand J Clin Lab Invest* 2006;66:113-120.
21. Cakal B, Akoz AG, Ustundag Y, Yalinkilic M, Ulker A, Ankarali H. Red cell distribution width for assessment of activity of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci.* 2009;54:842-847.
22. Clarke K, Sagunathy R, Kansal S. RDW as an additional marker in inflammatory bowel disease/undifferentiated colitis. *Dig Dis Sci* 2008;53:2521-2523.
23. van Zeben D, Bieger R, van Wermeskerken RK, Castel A, Hermans J. Evaluation of microcytosis using serum ferritin and red blood cell distribution width. *Eur J Haematol.* 1990;44:106–109.
24. Briggs C. Quality counts: new parameters in blood cell counting. *Int J Lab Hematol* 2009;31:277-297.

Κλινικές μελέτες

Μέρος 3ο

Ο ρόλος του δείκτη «διαλυτός υποδοχέας τρανσφερρίνης-φερριτίνη» στην αξιολόγηση της αναιμίας στις ΙΦΕΝ: μελέτη περιπτώσεων-μαρτύρων (case-control study)



3.1. Περίληψη

Εισαγωγή: Δεν υπάρχουν αξιόπιστοι βιοχημικοί δείκτες για το διαχωρισμό μεταξύ ΣΠΑ και AXN, σε έδαφος ΙΦΕΝ. Ο σκοπός της μελέτης αυτής ήταν η διερεύνηση της χρήσης του διαλυτού υποδοχέα τρανσφερρίνης (sTfR) και του δείκτη sTfR-ferritin (sTfR-F) στην αξιολόγηση της αναιμίας σε ασθενείς με ΙΦΕΝ.

Υλικό-μέθοδος: Στη μελέτη έλαβαν μέρος 100 ασθενείς με ΙΦΕΝ [49 με ΕΚ και 51 με ΝΚ] και 102 υγείς μάρτυρες (ΥΜ). Σε όλους τους ασθενείς και ΥΜ αναλύθηκαν τα επίπεδα στον ορό της φερριτίνης, του κορεσμού τρανσφερρίνης και του sTfR. Ο δείκτης sTfR-F υπολογίσθηκε σύμφωνα με το λόγο: sTfR/log₁₀ ferritin. Διερευνήθηκε η αξία των sTfR & sTfR-F στη διάγνωση ΣΠΑ.

Αποτελέσματα: 42 ασθενείς πληρούσαν τα κριτήρια διάγνωσης αναιμίας του ΠΟΥ. Μεταξύ αυτών, 30 (30%) είχαν ΣΠΑ, 4 (4%) είχαν AXN και 8 (8%) είχαν μικτή ΣΠΑ/AXN. Οι ασθενείς με ΣΠΑ είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα sTfR και sTfR-F, συγκριτικά με εκείνους χωρίς ΣΠΑ (P<0.0001). Κανείς εκ των δύο δεικτών δε εμφάνισε συσχέτιση με τα επίπεδα CRP ή την ενεργότητα της νόσου. Τα υψηλά επίπεδα sTfR (>1.8 mg/L) είχαν ευαισθησία 81% και ειδικότητα 80% για τη διάγνωση ΣΠΑ, ενώ ο υψηλός δείκτης sTfR-F (>1.4) είχε ευαισθησία 91% και ειδικότητα 92%.

Συμπέρασμα: Ο δείκτης sTfR-F φαίνεται να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικός στην ανίχνευση και διάγνωση της ΣΠΑ, σε ασθενείς με ΙΦΕΝ.

3.2. Εισαγωγή

Ο διαλυτός υποδοχέας τρανσφερρίνης (sTfR) είναι μία «κολοβή» μορφή του κυτταρικού υποδοχέα τρανσφερρίνης, χωρίς τους διαμεμβρανικούς και κυτταροπλασματικούς τομείς του, και κυκλοφορεί προσδεμένος στην τρανσφερρίνη¹. Ο αριθμός των sTfR αντανακλά τις κυτταρικές ανάγκες σε σίδηρο, και ποικίλει ανάλογα με τη λειτουργική και μορφολογική ανάπτυξη του κάθε κυτταρικού τύπου. Στη ΣΠΑ ο αριθμός των sTfR αυξάνεται σημαντικά, ενώ η συγκέντρωσή τους στον ορό είναι δείκτης της παροχής σιδήρου, διαθέσιμου για ερυθροποίηση. Ο sTfR αντανακλά την ερυθροποίηση και συσχετίζεται αντίστροφα με το διαθέσιμο ποσό σιδήρου για ερυθροποίηση²⁻⁴. Φαίνεται ότι ο sTfR δεν επηρεάζεται από τη χρόνια ή οξεία φλεγμονή, γι' αυτό θα μπορούσε να είναι ένας αξιόπιστος δείκτης διάγνωσης ΣΠΑ σε ασθενείς με ΙΦΕΝ^{2,5}. Υπάρχει ολοένα και αυξανόμενη βιβλιογραφία σχετικά με το ρόλο του λόγου sTfR/ferritin ή sTfR/log ferritin (sTfR-F index) στην αξιολόγηση αναιμίας σε ασθενείς με χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα, ειδικά στη διάγνωση ΣΠΑ σε έδαφος χρόνιας φλεγμονής ή στην ανίχνευση σιδηροπενίας επί απουσίας αναιμίας^{4,6}. Φαίνεται ότι ο δείκτης sTfR-F έχει μεγαλύτερη διαγνωστική δύναμη απ' ό,τι ο sTfR ή η φερριτίνη μόνος/η του/ης⁷. Εξ' όσων γνωρίζουμε, δεν υπάρχει έως τώρα άλλη μελέτη στη βιβλιογραφία που να αξιολογεί το δείκτη sTfR-F σε ασθενείς με ΙΦΕΝ.

Ο σκοπός της μελέτης αυτής ήταν η διερεύνηση της κλινικής χρησιμότητας του sTfR-F στην αξιολόγηση της αναιμίας σε ασθενείς με ΙΦΕΝ, και ειδικά στη διάκριση μεταξύ ΣΠΑ και ΑΧΝ.

3.3. Υλικό-Μεθοδολογία

Ασθενείς

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιοι ασθενείς και ΥΜ της παραγράφου 1.3.

Εργαστηριακές μετρήσεις

Από ασθενείς και ΥΜ συλλέχθηκαν δείγματα ολικού αίματος για γενική αίματος και μέτρηση της Ταχύτητας Καθίζησης Ερυθρών (ΤΚΕ), άμεσα με τη λήψη τους. Όλες οι γενικές αίματος διενεργήθηκαν στον αιματολογικό αναλυτή Coulter® LH 780 (Beckman Coulter, Inc., California, USA), βάσει των οδηγιών του κατασκευαστή. Τα δείγματα ορού συλλέχθηκαν μετά από άμεση φυγοκέντρηση των δειγμάτων ολικού αίματος, σε θερμοκρασία δωματίου, προς προσδιορισμό των ακόλουθων

εργαστηριακών παραμέτρων: C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP), σίδηρος (Fe), φερριτίνη, τρανσφερρίνη, διαλυτός υποδοχέας τρανσφερρίνης (sTfR) και κορεσμός τρανσφερρίνης (Tsat). Όλες οι μετρήσεις διεξήχθησαν βάσει της κοινής κλινικής πρακτικής. Η μέτρηση του sTfR έγινε με εμπορικώς διαθέσιμο κιτ ELISA (R&D Systems, Minneapolis, USA). Ο δείκτης sTfR-F υπολογίσθηκε με βάση το λόγο:

$$sTfR-F = \frac{sTfR}{\log ferritin}$$

Στατιστική ανάλυση

Όλα τα αποτελέσματα εκφράζονται ως [μέση τιμή ± τυπική απόκλιση] ή ως τιμή median με το εύρος μεταξύ 25^{ης} και 75^{ης} εκατοστιαίας θέσης. Οι συγκρίσεις μεταξύ των 3 διαγνωστικών ομάδων, αναφορικά με τις συνεχείς μετρήσεις, έγιναν με το τεστ Kruskal-Wallis (μη παραμετρική ANOVA). Οι post hoc πολλαπλές δοκιμασίες σύγκρισης έγιναν με το τεστ Dunn. Οι συγκρίσεις ανάμεσα σε δύο ομάδες έγιναν είτε με το Student's t-test, είτε με το Mann-Whitney U test. Το Kolmogorov & Smirnov test χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της παραδοχής ότι τα δεδομένα εξήχθησαν από πληθυσμούς που ακολουθούν την κατανομή Gauss. Οι συσχετίσεις μεταξύ των δεικτών sTfR & sTfR-F και άλλων δεικτών ορού καθώς και κλινικών παραμέτρων αναλύθηκαν με μη-παραμετρική συσχέτιση (Spearman's r). Για την εκτίμηση της αξιοπιστίας των δεικτών στη διάγνωση ΣΠΑ, υπολογίσθηκαν η ευαισθησία, η ειδικότητα και η ΘΠΑ και ΑΠΑ. Ως στατιστικά σημαντικό επίπεδο θεωρήθηκε τιμή P < 0.05. Όλες οι αναλύσεις διενεργήθηκαν με χρήση του στατιστικού προγράμματος MedCalc (MedCalc software, Belgium).

3.4. Αποτελέσματα

Οι εργαστηριακές παράμετροι των ασθενών με ΕΚ και ΝC, συγκριτικά με τους ΥΜ απεικονίζονται στον πίνακα 1. Παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στους ασθενείς και τους ΥΜ, όσον αφορά όλες τις παραμέτρους (αιμοσφαιρίνη, MCV, φερριτίνη, Tsat, sTfR, sTfR-F, CRP, ΤΚΕ). Δε βρέθηκαν διαφορές μεταξύ ΕΚ και ΝC. Τα επίπεδα φερριτίνης συσχετίζονταν σημαντικά με τα επίπεδα CRP (r=0.19, P=0.04) αλλά όχι με κλινικούς δείκτες ενεργότητας της νόσου.

| Παράμετρος | EK | NC | YM | p |
|-----------------------------------------|------------------|------------------|-------------------|----------|
| Mean ± SD | | | | |
| Αιμοσφαιρίνη(g/dl) | 13.1 ± 2.0 | 12.6 ± 1.9 | 15.0 ± 1.2 | <0.0001 |
| MCV (fl) | 86.4 ± 8.1 | 87.6 ± 11.0 | 90.1 ± 5.5 | 0.01 |
| Φερριτίνη* (μg/L, median, εύρος) | 42.1 (3.6-381.3) | 33.4 (2.2-514.0) | 71.0 (10.0-259.5) | 0.003 |
| Tsat (%) | 20.4 ± 10.6 | 16.9 ± 12.8 | 32.2 ± 15.1 | <0.0001 |
| sTfR (mg/L) | 1.6 ± 0.9 | 1.7 ± 0.9 | 1.1 ± 0.2 | <0.0001 |
| sTfR-F* (median, εύρος) | 0.9 (0.4-10.7) | 0.9 (0.4-11.8) | 0.6 (0.3-1.5) | <0.0001 |
| CRP*(mg/dl, median, εύρος) | 0.37 (0.32-5.3) | 0.39 (0.32-10.7) | 0.29 (0.29-1.5) | <0.0001 |
| TKE (mm/h) | 22.8 ± 19.2 | 28.0 ± 16.2 | 6.9 ± 5.7 | <0.0001 |

Πίνακας 1. Εργαστηριακά δεδομένα ασθενών με ΙΦΕΝ, σε σύγκριση με τους YM.

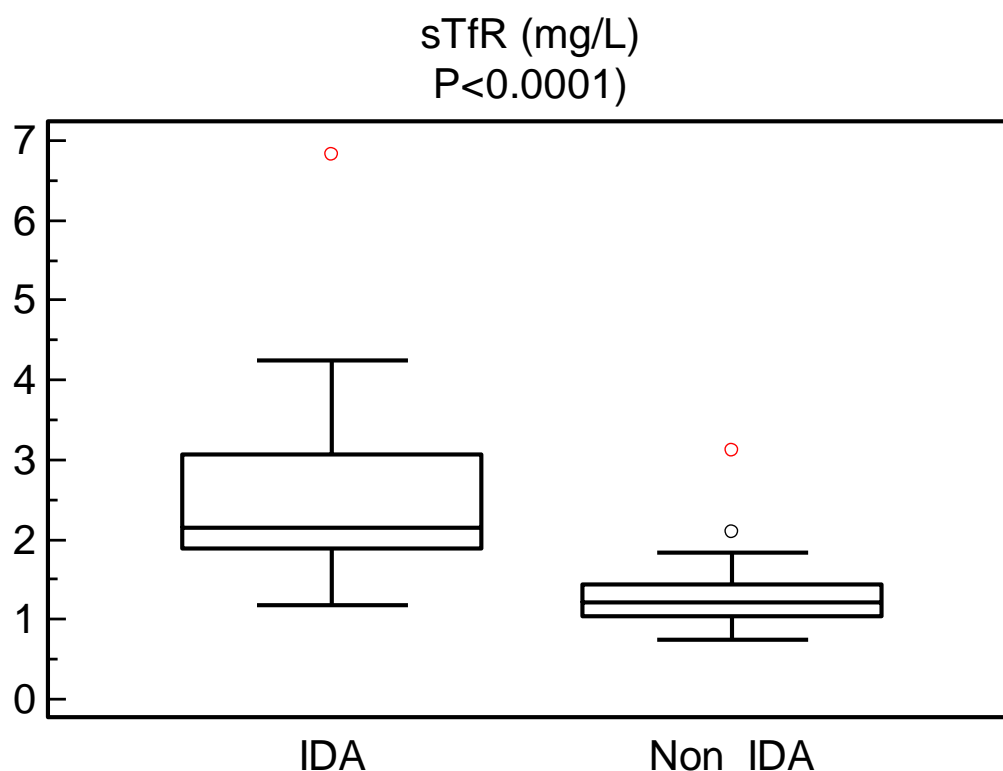
*Μη κανονική κατανομή

Ασθενείς με ΣΠΑ είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα sTfR, συγκριτικά με εκείνους χωρίς ΣΠΑ (δηλ. με άλλου τύπου αναιμία ή χωρίς αναιμία) [median=2.6 mg/L (εύρος 1.2-6.8 mg/L) έναντι 1.2 mg/L (0.7-3.1 mg/L), P<0.0001] (εικόνα 1). Παρομοίως, οι ασθενείς με ΣΠΑ είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα sTfR-F, συγκριτικά με εκείνους χωρίς ΣΠΑ [2.9 (1.0-11.8) έναντι 0.7 (0.4-2.8), P<0.0001] (εικόνα 2). Επιπλέον, οι ασθενείς με ΣΠΑ είχαν σημαντικά υψηλότερους δείκτες sTfR & sTfR-F, σε σχέση με τους ασθενείς με AXN (συμπεριλαμβανομένης της μικτής ΣΠΑ/AXN) (P<0.0001).

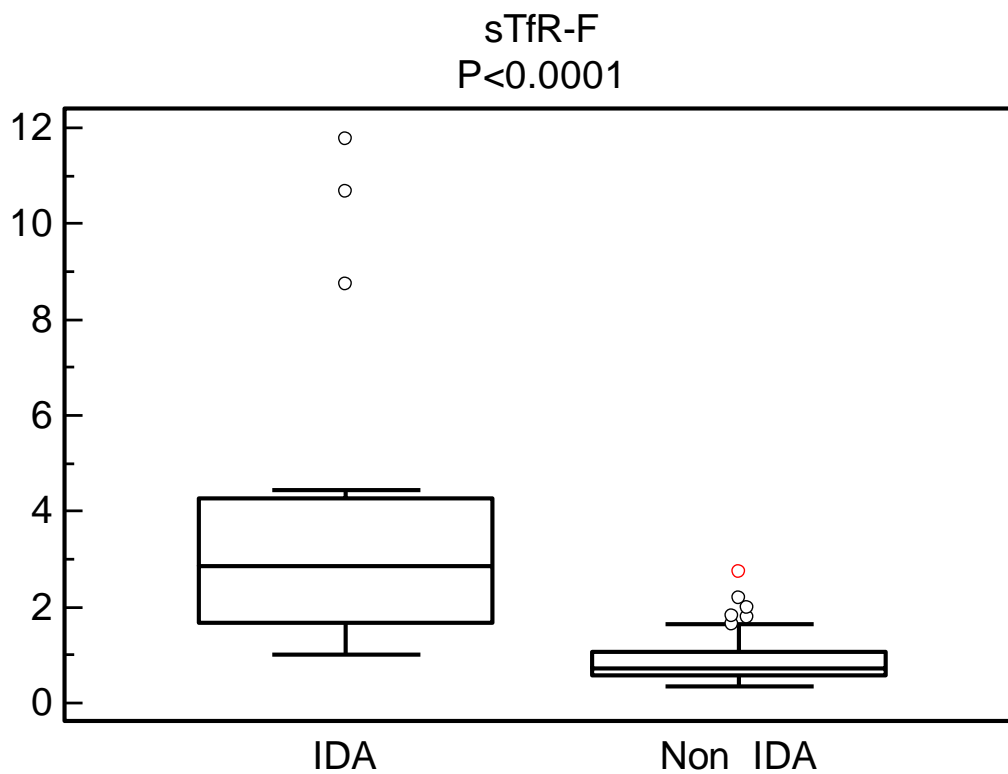
Η ικανότητα των δεικτών sTfR & sTfR-F να ανιχνεύουν τη ΣΠΑ μεταξύ ασθενών με αναιμία, συγκριτικά με ασθενείς χωρίς αναιμία, εξετάστηκε με ανάλυση ROC (receiver operating characteristic) (εικόνα 3). Η ευαισθησία του υψηλού sTfR για τη διάγνωση ΣΠΑ με όριο αποκοπής 1.8 mg/L ήταν 81%, η ειδικότητα 80%, η ΘΠΑ 63% και η ΑΠΑ 91%. Παρομοίως, η ευαισθησία του υψηλού sTfR-F για τη διάγνωση

της ΣΠΑ με όριο αποκοπής το 1.4 ήταν 91%, η ειδικότητα 92%, ενώ η ΘΠΑ ήταν 83% και η ΑΠΑ 96%.

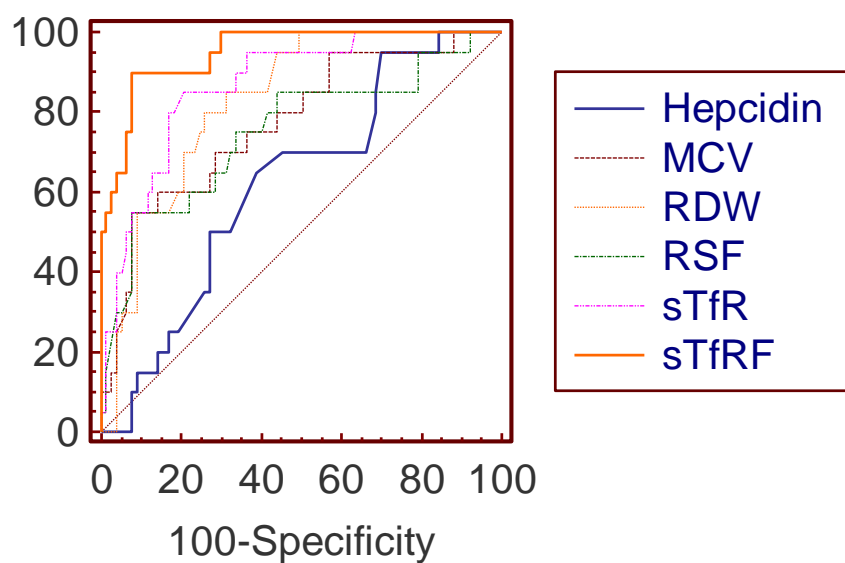
Δε βρέθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ sTfR ή sTfR-F και επιπέδων CRP ($r=0.03$, $p=0.77$ και $r=0.01$, $p=0.28$, αντίστοιχα). Επιπλέον, δεν υπήρξαν σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των ελεγχθέντων δεικτών και άλλων κλινικών χαρακτηριστικών των ασθενών (φύλο, ηλικία, κάπνισμα, διάρκεια νόσου, ενεργότητα νόσου, εξωεντερικές εκδηλώσεις και χρήση φαρμάκων, συμπεριλαμβανομένων των βιολογικών παραγόντων).



Εικόνα1. Κατανομή των επιπέδων sTfR σε ασθενείς με ΙΦΕΝ και ΣΠΑ (IDA, n=30) και ασθενείς χωρίς ΣΠΑ (Non IDA, n=70). Τα ορθογώνια αναπαριστούν την τιμή median με το εύρος 25-75%. Οι άξονες δείχνουν το εύρος 5-95%.



Εικόνα 2. Κατανομή του δείκτη sTfR-F σε ασθενείς με ΙΦΕΝ και ΣΠΑ (IDA, n=30) και ασθενείς χωρίς ΣΠΑ (Non IDA, n=70). Τα ορθογώνια αναπαριστούν την τιμή median με το εύρος 25-75%. Οι άξονες δείχνουν το εύρος 5-95%.



| | Cut-off value | Sensitivity (%) | Specificity (%) | PPV (%) | NPV (%) | AUC |
|----------|---------------|-----------------|-----------------|---------|---------|------|
| Hepcidin | <79.4 ng/ml | 81 | 45 | 52 | 76 | 0.62 |
| MCV | <76.2 | 52 | 92 | 64 | 86 | 0.74 |
| RDW | >14% | 93 | 81 | 68 | 96 | 0.82 |
| RSF | <98.6 fl | 83 | 82 | 67 | 92 | 0.87 |
| sTfR | >1.8 mg/L | 81 | 80 | 63 | 91 | 0.86 |
| sTfR-F | >1.4 | 91 | 92 | 83 | 96 | 0.95 |

Εικόνα 3. Καμπύλες ανάλυσης ROC και τιμές ευαισθησίας, ειδικότητας, ΘΠΑ, ΑΠΑ και AUC των δεικτών sTfR & sTfR-F, σε σύγκριση με τις παραμέτρους hepcidin, MCV, RDW, RSF, αναφορικά με την ανίχνευση ΣΠΑ σε ασθενείς με ΙΦΕΝ και αναιμία, συγκριτικά με εκείνους χωρίς αναιμία.

3.5. Συζήτηση

Ο sTfR φαίνεται να είναι ιδιαίτερα χρήσιμος για τη διάγνωση ΣΠΑ σε ασθενείς με λοίμωξη, φλεγμονή ή κακοήθεια, όπου η φερριτίνη ορού δεν είναι καλός δείκτης σιδηροπενίας⁸. Αντίθετα με τη φερριτίνη και την τρανσφερρίνη, η χρόνια φλεγμονή και η ηπατική βλάβη δεν έχουν επίδραση στον sTfR, γεγονός που τον καθιστά μία αξιόπιστη παράμετρο για τη διάγνωση ΣΠΑ, σε ασθενείς με ΙΦΕΝ^{2,5}.

Αυτή είναι η πρώτη μελέτη αξιολόγησης του sTfR-F σε ασθενείς με ΙΦΕΝ. Ο υψηλός sTfR-F (>1.4) είχε καλύτερη διακριτική ικανότητα (ευαισθησία 91%, ειδικότητα 92%) από τα υψηλά επίπεδα sTfR (>1.8 mg/L) (81% και 80%, αντίστοιχα) στη διάγνωση ΣΠΑ. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται να βρίσκονται σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία σχετικά με τον sTfR-F, αν και περιορισμένη. Από διάφορες μελέτες, σε διάφορες ομάδες ασθενών, έχει προταθεί η υψηλή διαγνωστική ικανότητα των sTfR & sTfR-F, στο διαχωρισμό ΣΠΑ από AXN^{5,7,9-11}. Ο sTfR-F έχει προταθεί ως ικανός να διαφοροδιαγνώσει με μεγαλύτερη ακρίβεια μεταξύ ΣΠΑ και AXN ή να εκτιμήσει το προφίλ σιδήρου σε ασθενείς με αναιμία μικτού τύπου⁴. Σε μία μελέτη με 96 ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα¹², ο sTfR-F μπορούσε να ξεχωρίσει τη συνυπάρχουσα ΣΠΑ, σε ασθενείς με AXN. Η ανάλυση ROC έδειξε μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα του sTfR-F, έναντι του sTfR, στη διάγνωση ΣΠΑ, καθώς και στη διαφορική διάγνωση μεταξύ ΣΠΑ και AXN. Οι Vazquez Lopez και συν.¹³ ανακοίνωσαν σημαντικά αυξημένο sTfR-F σε παιδιά με σιδηροπενία αποθηκών, συγκριτικά με υγιή παιδιά με φυσιολογικό προφίλ σιδήρου, παρουσιάζοντας μία AUC (area under curve) 0.96 για το δείκτη αυτό και ευαισθησία και ειδικότητα 89% και 96%, αντίστοιχα, με 90% ΘΠΑ και 94% ΑΠΑ, για τη διάκριση ΣΠΑ, όταν ο δείκτης ήταν >2. Σε μία άλλη μελέτη¹⁴, το ανωτέρω όριο προτείνεται ως χρήσιμο εναλλακτικό στην εκτίμηση του προφίλ σιδήρου σε ασθενείς με μικτή αναιμία. Σε μία μελέτη 177 ασθενών με επιλεγμένες χρόνιες παθήσεις¹⁵, ο sTfR-F έδειξε ευαισθησία και ειδικότητα 100%, με όριο αποκοπής >1.62, στην ανίχνευση ΣΠΑ. Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν αναφορές που δείχνουν ότι ο δείκτης sTfR-F δε βελτίωσε τη διαγνωστική ακρίβεια του sTfR^{16,17}. Σε μία άλλη μεγάλη μελέτη με 337 αναιμικούς ασθενείς, το όριο αποκοπής 2.5 για τον sTfR-F, έδειξε 87% ευαισθησία και 96% ειδικότητα στην ανίχνευση ΣΠΑ, με AUC 0.97, ενώ ο συνδυασμός του με το ισοδύναμο αιμοσφαιρίνης των ΔΕΚ παρουσίασε την υψηλότερη ευαισθησία και ειδικότητα¹⁸. Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα 3 μελετών, φαίνεται ότι ο sTfR-F έχει εύρος ευαισθησίας 50-94% και ειδικότητας 96.1-100%, με όρια αποκοπής από 1.2 έως 2.5^{7,12,19}.

Ένα από τα μεγαλύτερα πλεονεκτήματα του sTfR-F είναι ότι είναι ανεξάρτητος από τη φλεγμονώδη κατάσταση, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και από αυτή τη μελέτη, λαμβάνοντας υπόψη ότι δε βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ αυτού και της CRP ή της ενεργότητας της νόσου. Αυτό είναι αναμενόμενο, καθώς στη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν διαφορές στο δείκτη sTfR-F μεταξύ ασθενών με AXN και YM, ενώ οι διαφορές μεταξύ ασθενών με ΣΠΑ και YM είναι στατιστικά σημαντικές.

Ένας περιορισμός της μελέτης αυτής είναι ο μάλλον μικρός αριθμός των ασθενών με AXN (4%) και μικτή αναιμία ΣΠΑ/AXN (8%), που θα μπορούσε να ελαττώσει το ποσοστό ανίχνευσης αυτών των ασθενών, αναφορικά με τους δείκτες της μελέτης. Επιπλέον, η ομάδα των YM είχε σημαντικά υψηλότερο λόγο ανδρών/γυναικών, συγκριτικά με την ομάδα των ασθενών με ΙΦΕΝ. Ο υψηλότερος αριθμός των γυναικών στην ομάδα με ΙΦΕΝ θα μπορούσε να επηρεάσει τα αποτελέσματα, εξαιτίας της πιθανής επίδρασης της εμμήνου ρύσεως στις παραμέτρους σιδηροπενίας. Ένας άλλος περιορισμός είναι ο μάλλον μικρός αριθμός ασθενών με ενεργό νόσο, που δεν επιτρέπει ασφαλή συμπεράσματα, αναφορικά με το ρόλο της ενεργότητας της νόσου στο δείκτη sTfR-F.

Όσον αφορά τη μέτρηση του sTfR, πρέπει να αναφερθεί ότι υπάρχουν συγκεκριμένα μειονεκτήματα. Η μέθοδος δεν είναι ευρέως διαθέσιμη, παραμένει ακριβή και δεν είναι προτυποποιημένη μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων²⁰.

Συμπερασματικά, ο sTfR-F φαίνεται αρκετά αποτελεσματικός στην ανίχνευση και διάγνωση της ΣΠΑ, σε ασθενείς με ΙΦΕΝ. Το ποσοστό ανίχνευσης είναι υψηλότερο από του sTfR και οπωσδήποτε υψηλότερο των άλλων υπάρχοντων δεικτών. Είναι σημαντικό να προστεθεί ότι η κλινική χρήση αυτού του δείκτη μάλλον προσθέτει στην αξία άλλων εδραιωμένων δεικτών, όπως η φερριτίνη, η τρανσφερρίνη και ο Tsat, παρά τους αναπληρώνει στη διάγνωση της ΣΠΑ. Ως εκ τούτου, ο sTfR-F μπορεί να προταθεί ως μία επιπρόσθετη παράμετρος, η οποία μπορεί να βελτιώσει τη διάγνωση της ΣΠΑ σε ασθενείς με ΙΦΕΝ.

3.6. Βιβλιογραφία

1. Iron metabolism: biologic and molecular aspects. In: Crichton RR, Danielson BG, Geisser P. Iron therapy with special emphasis on intravenous administration, 2nd edn. Bremen: UNI-MED, 2005: 16-17.
2. Stein J, Hartmann F, Dignass AU. Diagnosis and management of iron deficiency anemia in patients with IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010;7:599-610.
3. Clark SF. Iron deficiency anemia: diagnosis and management. *Curr. Opin. Gastroenterol*. 2009;25:122–128.
4. Thomas L, Thomas C. Anemia in iron deficiency and disorders of iron metabolism. *Dtsch Med Wochenschr* 2002;127:1591–1594.
5. Wish JB. Assessing iron status: beyond serum ferritin and transferrin saturation. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2006;1:S4-8.
6. Weiss G, Goodnough LT. Anemia of chronic disease. *N Engl J Med*. 2005;352:1011–1023.
7. Punnonen K, Irjala K, Rajamaki A. Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency. *Blood* 1997;89:1052–1057.
8. Laboratory evaluation of iron status. In: Crichton RR, Danielson BG, Geisser P. Iron therapy with special emphasis on intravenous administration, 2nd edn. Bremen: UNI-MED, 2005: 29.
9. Genc S, Erten N, Karan MA, Besisik SK, Saka B, Tascioglu C, Sivas A. Soluble transferrin receptor and soluble transferrin receptor-ferritin index for evaluation of the iron status in elderly patients. *Tohoku J Exp Med*. 2004;202:135-142.
10. Matsuda A, Bessho M, Mori S, Takeuchi T, Abe T, Yawata Y, Mori H, Omine M, Nakamura Y, Furusawa S, Maeda T, Haginosa S, Hirasawa Y, Kinugasa E, Akizawa T, Kawakami N, Nagata A, Hirashima K. Diagnostic significance of serum soluble transferrin receptors in various anemic diseases: the first multi-institutional joint study in Japan. *Haematologia (Budap)*. 2002;32:225-238.
11. Lee EJ, Oh EJ, Park YJ, Lee HK, Kim BK. Soluble transferrin receptor (sTfR), ferritin, and sTfR/log ferritin index in anemic patients with nonhematologic malignancy and chronic inflammation. *Clin Chem*. 2002;48:1118-1121.
12. Margetic S, Topic E, Ruzic DF, Kvaternik M. Soluble transferrin receptor and transferrin receptor-ferritin index in iron deficiency anemia and anemia in rheumatoid arthritis. *Clin Chem Lab Med*. 2005;43:326-331.

13. Vázquez Lopez MA, Carracedo A, Lendinez F, Muñoz FJ, López J, Muñoz A. The usefulness of serum transferrin receptor for discriminating iron deficiency without anemia in children. *Haematologica*. 2006;91:264-265.
14. Koulaouzidis A, Said E, Cottier R, Saeed AA. Soluble transferrin receptors and iron deficiency, a step beyond ferritin. A systematic review. *J Gastrointest Liver Dis*. 2009;18:345-52.
15. Park G, Park CY, Jang SJ, Moon DS, Park SM, Park YJ. Soluble transferrin receptor-ferritin index and estimated body iron in iron-deficiency anemia in "select" chronic diseases. *Ann Hematol*. 2009;88:913-915.
16. Marković M, Majkić-Singh N, Ignjatović S, Singh S. Reticulocyte haemoglobin content vs. soluble transferrin receptor and ferritin index in iron deficiency anaemia accompanied with inflammation. *Int J Lab Hematol*. 2007;29:341-346.
17. Marković M, Majkić-Singh N, Subota V. Usefulness of soluble transferrin receptor and ferritin in iron deficiency and chronic disease. *Scand J Clin Lab Invest*. 2005;65:571-576.
18. Leers MP, Keuren JF, Oosterhuis WP. The value of the Thomas-plot in the diagnostic work up of anemic patients referred by general practitioners. *Int J Lab Hematol*. 2010;32:572-581.
19. Chang J, Bird R, Clague A, Carter A. Clinical utility of serum soluble transferrin receptor levels and comparison with bone marrow iron stores as an index for iron-deficient erythropoiesis in a heterogeneous group of patients. *Pathology*. 2007;39:349-353.
20. Beguin Y. Soluble transferrin receptor for the evaluation of erythropoiesis and iron status. *Clin Chim Acta* 2003;329:9–22.

Κλινικές μελέτες

Μέρος 3ο

Ασφάλεια και αποτελεσματικότητα της έγχυσης ολικής δόσης δεξτρανικού σιδήρου χαμηλού μοριακού βάρους για την αντιμετώπιση σιδηροπενικής αναιμίας σε ασθενείς με ΙΦΕΝ



4.1. Περίληψη

Εισαγωγή: Διάφορες ελεγχόμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η θεραπεία της αναιμίας με ενδοφλέβια χορήγηση σιδήρου είναι αποτελεσματική και ασφαλής σε ασθενείς με ΙΦΕΝ. Η αυξημένη σταθερότητα και βραδύτερη αποδόμηση του μακρομορίου της σιδηροδεξτράνης επιτρέπει την ασφαλή χορήγηση μεγάλων δόσεων σε μία συνεδρία. Σκοπός της μελέτης ήταν ο έλεγχος της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας της ολικής δόσης έγχυσης δεξτρανικού σιδήρου χαμηλού ΜΒ σε ασθενείς με αναιμία σε έδαφος ΙΦΕΝ.

Υλικό-μέθοδος: Στη μελέτη συμμετείχαν 50 ασθενείς με ΙΦΕΝ (27 γυναίκες, 35 με ΝC, 15 με ΕΚ). Η [μέση τιμή±τυπική απόκλιση] της αιμοσφαιρίνης και φερριτίνης προ της έγχυσης ήταν 9.88 ± 1.42 g/dL και 13.9 ± 10.9 ng/ml, αντίστοιχα. Μετά από χορήγηση δοκιμαστικής δόσης 25 mg, έλαβαν δεξτρανικό σίδηρο χαμηλού μοριακού βάρους, ενδοφλέβια σε μία συνεδρία και δόση υπολογισθείσα ανάλογα με το έλλειμμα σιδήρου. Σε όλους τους ασθενείς έγινε καταγραφή κλινικών και εργαστηριακών παραμέτρων προ και 4 εβδομάδες μετά τη θεραπεία.

Αποτελέσματα: 4 ασθενείς (8%) παρουσίασαν ανεπιθύμητες ενέργειες κατά τη διάρκεια της δοκιμαστικής δόσης και δεν έλαβαν ολική δόση. μόνο ένας ασθενής παρουσίασε αλλεργική αντίδραση κατά την έγχυση ολικής δόσης. Στους υπόλοιπους 45 ασθενείς, η μέση δόση σιδήρου που χορηγήθηκε ήταν 1075 ± 269 mg. Η μέση άνοδος του αιματοκρίτη και της αιμοσφαιρίνης την εβδομάδα 4 ήταν $4.9\pm 1.9\%$ και 1.7 ± 0.8 g/dL, αντίστοιχα. Αιμοποιητική ανταπόκριση παρατηρήθηκε σε 23 από τους 45 ασθενείς (51.1%).

Συμπέρασμα: Η θεραπεία υποκατάστασης με ΕΦ χορήγηση ολικής δόσης δεξτρανικού σιδήρου χαμηλού ΜΒ είναι μία απλή, ασφαλής και αποτελεσματική εναλλακτική μέθοδος για την αντιμετώπιση της ΣΠΑ σε έδαφος ΙΦΕΝ. Σε μία μειοψηφία ασθενών, μπορεί να εμφανισθούν ήπιες ανεπιθύμητες ενέργειες.

4.2. Εισαγωγή

Ο δεξτρανικός σίδηρος χαμηλού MB (ΔΣΧΜΒ) είναι ένα σύμπλοκο σιδήρου υψηλής σταθερότητας και έχει την ιδιότητα να καλύπτει τις συνολικές ανάγκες σιδήρου σε μία ΕΦ χορήγηση (έγχυση ολικής δόσης, ΕΟΔ). Η ΕΟΔ ΔΣΧΜΒ έχει αξιολογηθεί στη ΣΠΑ¹, καθώς και στην αναιμία της χρόνιας νεφρικής νόσου²⁻⁵ και της κύησης⁶. Τα αποτελέσματα των μελετών αυτών έδειξαν σημαντική αύξηση των επιπέδων αιμοσφαιρίνης μετά τη θεραπεία με ΕΟΔ ΔΣΧΜΒ, χωρίς σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες. Επιπλέον, οι Auerbach και συν. συγκρίνοντας προοπτικά 3 τρόπους ΕΦ χορήγησης ΔΣ σε αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς, βρήκαν ότι η ΕΟΔ ΔΣ είναι ασφαλής, αξιόπιστη, φθηνότερη και εξίσου αποτελεσματική με τις εγχύσεις διαιρεμένων δόσεων². Σε παιδιατρικούς ασθενείς με ΙΦΕΝ, η ΕΟΔ ΔΣ έχει προταθεί ως αποτελεσματική και ασφαλής θεραπεία⁷, αν και χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές μορφές ΔΣ, χαμηλού και υψηλού MB. Η ΕΟΔ ΔΣΧΜΒ δεν έχει μέχρι τώρα διερευνηθεί σε ενήλικες ασθενείς με ΙΦΕΝ και αναιμία.

Ο σκοπός της μελέτης αυτής ήταν η αξιολόγηση της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας της ΕΟΔ ΔΣΧΜΒ στην αντιμετώπιση της ΣΠΑ σε ενήλικες ασθενείς με ΙΦΕΝ.

4.3. Υλικό-Μεθοδολογία

Ασθενείς

Διερευνήθηκαν 50 ασθενείς με ΙΦΕΝ, σε δύο κέντρα στην Ελλάδα. Όλοι οι ασθενείς είχαν επιβεβαιωμένη διάγνωση ΕΚ ή ΝC, βάσει των διεθνώς καθιερωμένων κριτηρίων⁸. Επιπλέον, είχαν αξιολογηθεί από το θεράποντα ιατρό τους ως έχοντες ανθεκτική αναιμία σε προηγούμενες θεραπείες. Τα κριτήρια εισαγωγής στη μελέτη περιελάμβαναν ασθενείς ηλικίας 14-69 ετών, με αναιμία και δυσανεξία ή μη ανταπόκριση σε από του στόματος σίδηρο, με αιμοσφαιρίνη <10 ή 11 g/dL για γυναίκες ή άνδρες αντίστοιχα, ή με ενεργό νόσο και απώλεια αίματος από το έντερο. Η μέση (median) ηλικία των ασθενών ήταν 33 έτη. 36 (72%) ασθενείς είχαν πτωχή ανταπόκριση ή δυσανεξία σε προηγούμενη θεραπεία με από του στόματος σίδηρο. 9 (18%) ασθενείς είχαν ιστορικό μετάγγισης αίματος για θεραπεία αναιμίας. Τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης παρουσιάζονται στον πίνακα 1. Η ενεργότητα της νόσου αξιολογήθηκε στην αρχή και στο τέλος της θεραπείας

| | ΕΚ | NC | ΙΦΕΝ |
|----------------------------------------|-----------|-----------|-------------|
| Αριθμός | 15 | 35 | 50 |
| Άνδρες | 8 | 15 | 23 |
| Γυναίκες | 7 | 20 | 27 |
| Ενεργότητα νόσου | | | |
| Ενεργή | 6 | 16 | 22 |
| Μη ενεργή | 9 | 19 | 28 |
| Μέση διάρκεια νόσου (έτη) | 8.4 | 7.9 | |
| Εντόπιση νόσου | | | |
| Ορθίτις(ΕΚ)/Ειλεός(NC) | 1 | 9 | |
| Αριστερή(ΕΚ)/Π.Ε.(NC) | 6 | 8 | |
| Εκτεταμένη(ΕΚ)/Ειλεοκολίτις(NC) | 8 | 18 | |
| Μορφή νόσου (NC) | | | |
| Στενωτική | | 10 | |
| Διαττραίνουσα | | 9 | |
| Φλεγμονώδης | | 16 | |
| Τρέχουσα θεραπεία | | | |
| Κορτικοστεροειδή | 4 | 8 | 12 |
| Azathioprine | 1 | 8 | 9 |
| Infliximab | 1 | 5 | 6 |
| Adalimumab | 0 | 3 | 3 |
| Salazopyrine ή 5-ASA | 13 | 12 | 25 |

Πίνακας 1. Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης.

με το δείκτη CDAI (Crohn's Disease Activity Index) για τη NC⁹, και το δείκτη SCCAI (Simple Clinical Colitis Activity Index) για την ΕΚ¹⁰. Τα κριτήρια αποκλεισμού από τη μελέτη περιελάμβαναν μη θεραπευθείσα ανεπάρκεια βιταμίνης Β₁₂ ή φυλικού οξέος, αναιμία άλλου τύπου, μετάγγιση αίματος ή θεραπεία με ΕΡΟ εντός 12 εβδομάδων προ της εισαγωγής στη μελέτη, άσθμα ή έκζεμα, οξεία ή χρόνια λοίμωξη, κλινικώς εκδηλωμένη συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια ή ισχαιμική καρδιοπάθεια, ιστορικό λοίμωξης από τον ιό HIV ή ηπατίτιδας Β και τρέχουσα κακοήθεια.

Όλοι οι ασθενείς έδωσαν έγγραφη συγκατάθεση μετά από ενημέρωση (informed consent) για τη συμμετοχή στη μελέτη. Το πρωτόκολλο της μελέτης εγκρίθηκε από την Επιτροπή Ηθικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Χορήγηση σιδήρου και πρωτόκολλο μετρήσεων

Προ της ΕΟΔ, σε όλους τους ασθενείς χορηγήθηκε δοκιμαστική δόση 25 mg, σε διάστημα 15 λεπτών. Σε περίπτωση αρνητικής δοκιμασίας ελέγχου, ακολουθούσε η ΕΟΔ ΔΣΧΜΒ, σε μέγιστη δόση 20 mg/Kg, με ΕΦ χορήγηση διάρκειας 4-6 ωρών. Το έλλειμμα σιδήρου υπολογίστηκε με βάση την εξίσωση Ganzoni¹¹. Ως αιμοποιητική ανταπόκριση καθορίστηκε η αύξηση της αιμοσφαιρίνης κατά 2 g/dL ή περισσότερο. Προ της έγχυσης καθώς και την εβδομάδα 4 έγινε κλινική αξιολόγηση, έλεγχος ανεπιθύμητων ενεργειών και μέτρηση αιματολογικών και άλλων εργαστηριακών παραμέτρων, όπως φερριτίνη, Tsat και CRP.

Στατιστική ανάλυση

Η σύγκριση εργαστηριακών δεδομένων προ και μετά θεραπείας έγινε με συζευγμένα (paired) t-tests. Το Kolmogorov & Smirnov test χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της παραδοχής ότι τα δεδομένα εξήχθησαν από πληθυσμούς που ακολουθούν την κατανομή Gauss. Ως στατιστικά σημαντικό επίπεδο θεωρήθηκε τιμή $P < 0.05$. Το Fisher's exact test χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση διαφορών μεταξύ ανταποκριθέντων και μη-ανταποκριθέντων, αναφορικά με πιθανούς προγνωστικούς παράγοντες. Όλες οι αναλύσεις ήταν τύπου two-tailed και διενεργήθηκαν με χρήση του στατιστικού προγράμματος InStat, version 3.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, USA).

4.4. Αποτελέσματα

Οι ενδείξεις χορήγησης ΕΦ ΔΣΧΜΒ ήταν οι εξής: πτωχή ανταπόκριση (11) ή/και δυσανεξία (7) σε από του στόματος σίδηρο, δυσαπορρόφηση (4), ενεργός νόσος, εντερική απώλεια αίματος (8), ή συνδυασμός ενδείξεων (20). Σε 10 περιπτώσεις (20%), προηγήθηκε ΕΦ χορήγηση 125 mg μεθυλ-πρεδνιζολόνης. Οι ασθενείς έλαβαν ολική δόση που κυμάνθηκε από 800 έως 1600 mg.

Τα εργαστηριακά δεδομένα των ασθενών προ και μετά θεραπείας με ΔΣΧΜΒ παρουσιάζονται στον πίνακα 2. Οι μέσες συγκεντρώσεις αιμοσφαιρίνης αυξήθηκαν από 9.88 ± 1.42 σε 11.60 ± 1.29 g/dL. Σε όλους τους ασθενείς παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση της αιμοσφαιρίνης προ και μετά θεραπείας ($P < 0.0001$). Ωστόσο, αιμοποιητική ανταπόκριση παρατηρήθηκε μόνο σε 23 από 45 ασθενείς (51.1%), την εβδομάδα 4.

| | Προ θεραπείας | Μετά θεραπεία |
|--------------------------|---------------|---------------|
| Μέση αιμοσφαιρίνη (g/dL) | 9.88±1.42 | 11.60±1.29 |
| MCV (fL) | 74.6±9.9 | 79.9±8.7 |
| Φερριτίνη (ng/ml) | 13.9±10.9 | 145.6±112.7 |
| Tsat (%) | 11.2±9.0 | 24.5±11.6 |
| CRP (mg/dL) | 1.74±3.2 | 1.43±1.93 |
| TKE (mm/h) | 37.4±28.5 | 25.9±19.1 |

Πίνακας 2. Εργαστηριακά δεδομένα των ασθενών, προ και μετά θεραπείας.

Η θεραπεία οδήγησε σε σημαντική αύξηση του μέσου όγκου ερυθρών (MCV) από 74.6±9.9 fl προ θεραπείας σε 79.9±8.7 fl μετά θεραπεία (P=0.008). Τα μέσα επίπεδα φερριτίνης και Tsat αυξήθηκαν επίσης σημαντικά από 13.9±10.9 ng/ml και 11.2±9.0% προ θεραπείας σε 145.6±112.7 ng/ml και 24.5±11.6% μετά θεραπεία, αντίστοιχα (P<0.0001). Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα CRP & TKE, προ και μετά θεραπείας (P=0.65 και P=0.09, αντίστοιχα).

Από την ανάλυση των χαρακτηριστικών προ θεραπείας μεταξύ ανταποκριθέντων και μη-ανταποκριθέντων δεν προέκυψαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές. Ωστόσο, υπήρχε μία τάση καλύτερης ανταπόκρισης σε ενεργό νόσο, σε ασθενείς με υψηλότερα επίπεδα CRP και σε ασθενείς υπό θεραπεία με infliximab ή adalimumab.

Σε 4 περιπτώσεις (8%) εμφανίσθηκαν ανεπιθύμητες ενέργειες, όπως ναυτία (3), δύσπνοια (2), θωρακικό άλγος (1) και ταχυκαρδία (1), κατά τη χορήγηση της δοκιμαστικής δόσης ΔΣΧΜΒ και έτσι δεν ακολούθησε ΕΟΔ. Σε ένα ασθενή με αρνητική δοκιμαστική χορήγηση, παρουσιάστηκε αναφυλακτική αντίδραση (κνησμός και κνίδωση) κατά τη διάρκεια της ΕΟΔ. Καμία από τις ανεπιθύμητες ενέργειες δεν ήταν απειλητική για τη ζωή, ενώ τα συμπτώματα αντιμετωπίστηκαν συμπτωματικά με αντι-ισταμινικά ή στεροειδή. 2 επιπλέον ασθενείς εμφάνισαν ήπιες ανεπιθύμητες ενέργειες μετά την ΕΟΔ, όπως μυαλγίες, αρθραλγίες και ναυτία, οι οποίες υποχώρησαν εντός 72 ωρών μετά την έγχυση. Κανένας από τους ασθενείς που έλαβαν προ-θεραπεία με κορτικοστεροειδή δεν εμφάνισε ανεπιθύμητες ενέργειες.

4.5. Συζήτηση

Η μελέτη αυτή σχεδιάστηκε για την αξιολόγηση της ασφάλειας και αποτελεσματικότητας της ΕΟΔ ΔΣΧΜΒ για την αντιμετώπιση της ΣΠΑ των ΙΦΕΝ. Ο ΔΣΧΜΒ έχει την ιδιότητα δυνατότητας χορήγησης σε μία δόση όλης της ποσότητας

σιδήρου που έχει ανάγκη ο ασθενής (ΕΟΔ) και έχει αποδειχθεί ασφαλής και αποτελεσματική θεραπεία της ΣΠΑ¹⁻⁷. Δεδομένου ότι η ΕΟΔ είναι απλούστερη και πιο φιλική για τους ασθενείς, προσπαθήσαμε να αξιολογήσουμε την αποτελεσματικότητά της σε ασθενείς με ΙΦΕΝ και ανθεκτική αναιμία. Βρήκαμε ότι η ΕΟΔ με ΔΣΧΜΒ είναι ασφαλής και αποτελεσματική θεραπεία, χωρίς σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες. Επιπλέον, αυξήθηκαν σημαντικά τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης και βελτιώθηκαν οι αιματολογικές παράμετροι (MCV, Tsat και φερριτίνη ορού). Αναφορικά με την αιμοποιητική ανταπόκριση, το ποσοστό ήταν 51.1% στις 4 εβδομάδες.

Οι ανεπιθύμητες ενέργειες (ΑΕ) του ΔΣΧΜΒ είναι άμεσες αναφυλακτικές αντιδράσεις (αδιαθεσία, κνησμός, κνίδωση, εφίδρωση, μυαλγίες, αρθραλγίες, εμπύρετο) και καθυστερημένες αντιδράσεις (λεμφαδενοπάθεια, μυαλγίες, αρθραλγίες, άλγος ράχης, κεφαλαλγία, εμπύρετο, ναυτία, έμετος, ζάλη και έντονη εφίδρωση), οι οποίες συνήθως υποχωρούν εντός 72 ωρών από την έγχυση. Σοβαρές ΑΕ και απειλητικές για τη ζωή αναφυλακτικές αντιδράσεις είναι σπάνιες με τον ΔΣΧΜΒ (<1/200000)^{12,13}. Στη μελέτη αυτή, το 8% των ασθενών είχαν θετική δοκιμασία ελέγχου και δεν έλαβαν ΕΟΔ. Μολονότι έχει προταθεί ότι μερικές από τις ήπιες αντιδράσεις δεν επανεμφανίζονται με επαναπρόκληση¹³, και είναι πιθανό ότι οι 4 αυτοί ασθενείς θα είχαν ανεχθεί καλά την ΕΟΔ, ελήφθη μία συντηρητική απόφαση κατά τη διάρκεια της μελέτης, αποφυγής της ΕΟΔ, για λόγους ασφαλείας. Ένας ασθενής εμφάνισε επίσης αλλεργική αντίδραση κατά την ΕΟΔ, που δεν ήταν απειλητική για τη ζωή, και αντιμετωπίστηκε συμπτωματικά. Επιπλέον, 2 ασθενείς (4%) εμφάνισαν καθυστερημένες αντιδράσεις, που υποχώρησαν εντός 72 ωρών. Ο επιπολασμός αντιδράσεων υπερευαισθησίας στη μελέτη αυτή ήταν υψηλότερος από εκείνο σε ασθενείς με αναιμία, αλλά όχι ΙΦΕΝ¹⁻⁶, όμως είναι παρόμοιος με εκείνο του 9% των παιδιατρικών ασθενών με ΙΦΕΝ⁷. Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στο γνωστό υψηλότερο ποσοστό ανοσολογικών φαρμακευτικών αντιδράσεων των φλεγμονωδών νοσημάτων, έναντι των μη-φλεγμονωδών νοσημάτων, και στον υψηλό επιπολασμό αλλεργίας στους ασθενείς με ΙΦΕΝ^{14,15}. Ένα άλλο σημείο είναι ότι μόνο στο 20% των ασθενών χορηγήθηκε προ-θεραπεία με μεθυλπρεδνιζολόνη, αλλά σχετικά με την ΕΟΔ, ίσως θα ήταν σκόπιμο να συμπεριληφθεί η προ-θεραπεία στην καθημερινή κλινική πρακτική¹³.

Η μελέτη έχει ορισμένους περιορισμούς, όπως η σύντομη περίοδος παρακολούθησης και η απουσία ομάδας ελέγχου με σίδηρο από το στόμα. Ωστόσο, η πλειοψηφία των ασθενών είχε ήδη εμφανίσει δυσανεξία ή/και μη-αποτελεσματικότητα

σε από του στόματος σιδηροθεραπεία υποκατάστασης και έτσι θεωρήθηκε μη ηθικό να συμπεριληφθεί στη μελέτη ομάδα με αυτή τη θεραπεία.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής υποδηλώνουν ότι η ΕΦ χορήγηση ΔΣΧΜΒ μπορεί να είναι χρήσιμη στη θεραπεία της ΣΠΑ σε έδαφος ΙΦΕΝ. Η προσέγγιση αυτή είναι αποτελεσματική, απλή, καλά αποδεκτή και φιλική προς τους ασθενείς. Μία μειοψηφία ασθενών (περίπου 10%) αναπτύσσουν αλλεργικές αντιδράσεις και αποκλείονται από την ΕΟΔ. Βάσει των αποτελεσμάτων αυτών και των δεδομένων επιταχυμένης χορήγησης υψηλών δόσεων ΕΦ σουκροζικού σιδήρου¹⁶⁻¹⁹, η αναιμία σε ασθενείς με ΙΦΕΝ μπορεί να αντιμετωπισθεί είτε με εγχύσεις υψηλής δόσης σουκροζικού σιδήρου σε 2-3 συνεδρίες την εβδομάδα, είτε με ΕΟΔ ΔΣΧΜΒ.

4.6. Βιβλιογραφία

1. Reddy CM, Kathula SK, Ali SA, Bekal R, Walsh M. Safety and efficacy of total dose infusion of iron dextran in iron deficiency anaemia. *Int J Clin Pract.* 2008;62:413–415.
2. Auerbach M, Winchester J, Wahab A, Richards K, McGinley M, Hall F, et al. A randomized trial of three iron dextran infusion methods for anemia in EPO-treated dialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 1998;31:81–86.
3. Anuradha S, Singh NP, Agarwal SK. Total dose infusion iron dextran therapy in predialysis chronic renal failure patients. *Ren Fail.* 2002;24:307–313.
4. Sinha S, Chiu DY, Peebles G, Kolakkat S, Lamerton E, Fenwick S, et al. Comparison of intravenous iron sucrose versus low molecular-weight iron dextran in chronic kidney disease. *J Ren Care.* 2009;35:67–73.
5. Bhandari S, Naudeer S. Improving efficiency and value in health care. Intravenous iron management for anaemia associated with chronic kidney disease: linking treatment to an outpatient clinic, optimizing service provision and patient choice. *J Eval Clin Pract.* 2008;14:996–1001.
6. Ayub R, Tariq N, Adil MM, Iqbal M, Junaid A, Jaferry T. Efficacy and safety of total dose infusion of low molecular weight iron dextran in the treatment of iron deficiency anemia during pregnancy. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2008;18:424–427.
7. Mamula P, Piccoli DA, Peck SN, Markowitz JE, Baldassano RN. Total dose intravenous infusion of iron dextran for iron-deficiency anemia in children with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2002;34:286–290.

8. Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1989;24:2–6.
9. Best WR, Bechtel JM, Singleton JW, Kern F Jr. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology.* 1976;70:439–444.
10. Walmsley RS, Ayres RC, Pounder RE, Allan RN. A simple clinical colitis activity index. *Gut.* 1998;43:29–32.
11. Ganzoni AM. Intravenous iron-dextran: therapeutic and experimental possibilities. *Schweiz Med Wochenschr.* 1970;100:301–303.
12. Chertow GM, Mason PD, Vaage-Nilsen O, Ahlme'n J. On the relative safety of parenteral iron formulations. *Nephrol Dial Transplant.* 2004;19:1571–1575.
13. Auerbach M, Ballard H, Glaspy J. Clinical update: intravenous iron for anaemia. *Lancet.* 2007;369:1502–1504.
14. D'Arienzo A, Manguso F, Astarita C, D'Armiento FP, Scarpa R, Gargano D, et al. Allergy and mucosal eosinophil infiltrate in ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol.* 2000;35:624–631.
15. Engkilde K, Menne' T, Johansen JD. Inflammatory bowel disease in relation to contact allergy: a patient-based study. *Scand J Gastroenterol.* 2007;42:572–576.
16. Blaustein DA, Schwenk MH, Chattopadhyay J, Singh H, Daoui R, Gadh R, et al. The safety and efficacy of an accelerated iron sucrose dosing regimen in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl.* 2003;87:S72–S77.
17. Hollands JM, Foote EF, Rodriguez A, Rothschild J, Young S. Safety of high-dose iron sucrose infusion in hospitalized patients with chronic kidney disease. *Am J Health Syst Pharm.* 2006;63:731–734.
18. Wall GC, Pauly RA. Evaluation of total-dose iron sucrose infusions in patients with iron deficiency anemia. *Am J Health Syst Pharm.* 2008;65:150–153.
19. Koutroubakis IE, Karmiris K, Makreas S, Xidakis C, Niniraki M, Kouroumalis EA. Effectiveness of darbepoetin-alfa in combination with intravenous iron sucrose in patients with inflammatory bowel disease and refractory anaemia: a pilot study. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2006;18:421–425.

ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ

Μέρος 4ο

Συμπλήρωμα

Μέρος 4ο

Δημοσιεύσεις κλινικών μελετών



Serum hepcidin and prohepcidin concentrations in inflammatory bowel disease

Pantelis Oustamanolakis^a, Ioannis E. Koutroubakis^a, Ippokratis Messaritakis^b, Niki Malliaraki^b, Aekaterini Sfiridaki^c and Elias A. Kouroumalis^a

Background Anemia is an important complication of inflammatory bowel disease (IBD). Recent data suggest that hepcidin is a major mediator of anemia with a central role in iron homeostasis and metabolism. The aim of this study was to evaluate the serum levels of hepcidin and its prohormone, prohepcidin, in patients with IBD in comparison with healthy controls.

Methods One hundred patients with IBD [49 ulcerative colitis (UC), 51 Crohn's disease (CD)] and 102 healthy controls were enrolled. Serum hepcidin and prohepcidin levels were measured by commercially available enzyme-linked immunosorbent assays kits. Their relationship with clinical and laboratory parameters of UC and CD was assessed.

Results Median hepcidin levels were significantly higher in both patients with UC and patients with CD compared with healthy controls ($P < 0.0001$). Median prohepcidin levels were significantly lower in patients with IBD compared with healthy controls ($P = 0.03$). In the univariate analysis, serum hepcidin was significantly negatively correlated ($r = -0.36$, $P = 0.0003$), whereas serum prohepcidin was positively correlated ($r = 0.65$, $P < 0.0001$) with the hemoglobin levels. Significant correlations of both hepcidin ($r = 0.34$, $P = 0.0007$) and prohepcidin ($r = -0.21$,

$P = 0.04$) with ferritin levels were found in patients with IBD. Serum hepcidin was also correlated with disease activity (for UC, $r = 0.36$, $P = 0.009$) and C-reactive protein ($r = 0.29$, $P = 0.004$). After multivariate analysis serum hepcidin levels remained significantly correlated with ferritin ($P = 0.0008$) and disease activity (for UC, $P = 0.004$).

Conclusion Serum hepcidin and prohepcidin levels are significantly altered in patients with IBD compared with healthy controls. This finding suggests a substantial role of these two hormones in the development of anemia in IBD. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 00:000–000 © 2011 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

European Journal of Gastroenterology & Hepatology 2011, 00:000–000

Keywords: anemia, Crohn's disease, hepcidin, iron deficiency, prohepcidin, ulcerative colitis

^aDepartment of Gastroenterology, ^bLaboratory of Biochemistry, University Hospital Heraklion and ^cRegional Blood Bank Center, Venizelos Hospital Heraklion, Crete, Greece

Correspondence to Ioannis E. Koutroubakis MD, PhD, Department of Gastroenterology, University Hospital Heraklion, PO Box 1352, 71110 Heraklion, Crete, Greece
Tel: +302810392253; fax: +302810542085;
e-mail: ikoutroub@med.uoi.gr

Received 8 November 2010 Accepted 13 December 2010

Introduction

Anemia is the most common systemic complication of inflammatory bowel disease (IBD), affecting about one-third of patients [1], with a great impact on their quality of life and cognitive functions [2]. Several studies have recently provided a thoughtful insight into the mechanisms and the impact of anemia on patients with IBD [3–5]. Furthermore, guidelines for the diagnosis and treatment of anemia in such patients have been developed [6]. The most common type of anemia in IBD is the iron deficiency anemia (IDA), resulting in reduced iron uptake by the level of the intestinal cell, because of the inflammation and an increased iron loss, due to blood loss. Other less common causes of anemia in IBD are anemia of chronic disease as well as vitamin B12 and/or folate deficiency, or drug-induced anemia [6,7].

Last decade, our knowledge on the role of hepcidin in iron homeostasis and metabolism has increased considerably [8–10]. The protein is produced mainly in the liver, where expression of hepcidin mRNA leads to a precursor protein of 84 amino acids (prohepcidin). Hepcidin has been

found to reduce the amount of circulating iron by preventing its exit from the cells, by binding to ferroportin, thereby inducing its internalization and degradation [11,12]. Hepcidin production is regulated by iron and inflammation [13]. Iron upregulates hepcidin *in vivo*, thus limiting iron excess and preventing tissues from intoxication by free radicals. In contrast, iron deficiency results in the reduction of the production of hepcidin, which ensures a better availability of iron to the developing erythrocytes in the bone marrow [14,15]. Anemia and hypoxia also inhibit the synthesis of hepcidin [16].

Till date, there was no reliable laboratory method available for quantitative measurement of hepcidin and prohepcidin in serum, whereas nowadays these proteins can be measured by means of a commercially available method. Recent data suggest that serum hepcidin, but not prohepcidin, levels are correlated with inflammation [17].

Little is known about the role of hepcidin and its prohormone in the mechanisms of anemia in patients with IBD. In Crohn's disease (CD), urinary hepcidin levels

were found to be increased mainly in the active phase of the disease [18]. In contrast, a significant decrease in serum hepcidin levels in patients with IBD, with or without anemia, compared with healthy controls has been reported [19]. The data with regard to serum prohepcidin levels in IBD are also limited and conflicting [20,21].

The aim of this study was to evaluate serum hepcidin and prohepcidin levels in patients with IBD compared with healthy controls, and to correlate the results with established parameters involved in anemia assessment as well as with the inflammation status of each patient.

Materials and methods

Patients

One hundred consecutive patients with IBD, followed at the Gastroenterology Department of the University Hospital of Heraklion, were included in the study (Table 1). They were compared with 102 healthy controls, matched for age and sex. Healthy controls were all recruited from healthy blood donors, with no family history of IBD. Patients with a history of gastrointestinal bleeding, malignancy, chemotherapy or radiotherapy, renal insufficiency or hematologic, liver and autoimmune disorders were excluded from the study. Female patients with a history of ongoing pregnancy or recent (<12 months from the study initiation) delivery were also excluded from the study.

The diagnosis of ulcerative colitis (UC) and CD was based on standard criteria [22,23]. Disease phenotyping

was based on Montreal classification [24]. All patients and controls were of Caucasian origin. Disease activity in patients with CD was evaluated using the Crohn's disease activity index (CDAI) score and they were divided into two groups: 'active' with a CDAI score of more than 150 and 'inactive' with a CDAI score of less than 150. In patients UC, the Simple Clinical Colitis Activity Index (SCCAI) was used for evaluation of disease activity. 'Active' disease was considered with a score of 3 or more points. Disease activity was calculated at the time of blood collection. Smoking status was also evaluated at the same time and patients were classified into three groups, as 'current', 'former,' or 'non' smokers. Definition of anemia in our study was based on the established World Health Organization criteria of less than 12 g/dl of hemoglobin for nonpregnant women and less than 13 g/dl of hemoglobin for men [25].

Informed consent was obtained from all patients. The study protocol conformed to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki (sixth revision, 2008), and was approved by the Ethics Committee of the Medical Faculty of Crete.

Laboratory studies

Whole blood samples were collected from patients and healthy controls for a full blood count and erythrocyte sedimentation rate measurement at the time of collection. All the full blood counts were processed using the Coulter LH780 Hematology Analyzer (Beckman Coulter, Inc., California, USA) according to the manufacturer's

Table 1 Demographical and clinical parameters of the patients and controls included in the study

| | UC | CD | IBD total | HC |
|-----------------------------------------|------------|------------|------------|------------|
| Number | 49 | 51 | 100 | 102 |
| Age (years, median, range) | 53 (15-78) | 45 (16-79) | 49 (15-79) | 44 (19-61) |
| Male | 32 | 26 | 58 | 82 |
| Female | 17 | 25 | 42 | 20 |
| Current smokers | 9 | 21 | 30 | 58 |
| Disease activity | | | | |
| Active | 11 | 9 | 20 | |
| Inactive | 38 | 42 | 80 | |
| Disease duration (years, median, range) | 9 (1-31) | 7 (1-35) | 8 (1-35) | |
| Disease localization | | | | |
| Proctitis (UC)/ileum (CD) | 14 | 21 | | |
| Left sided (UC)/colon (CD) | 23 | 13 | | |
| Extensive (UC)/ileum + colon (CD) | 12 | 16 | | |
| Upper GI involvement | | 1 | | |
| Disease type (CD) | | | | |
| Stenotic | | 11 | | |
| Fistulizing | | 8 | | |
| Inflammatory | | 32 | | |
| Perianal disease | | 6 | | |
| Extraintestinal manifestations | 7 | 26 | 33 | |
| Current treatment | | | | |
| Salazopyrine | 7 | 9 | 16 | |
| 5-ASA | 41 | 19 | 60 | |
| Oral steroids | 2 | 16 | 18 | |
| Azathioprine | 10 | 21 | 31 | |
| Methotrexate | 3 | 4 | 7 | |
| Infliximab | 2 | 10 | 12 | |
| Metronidazole | 0 | 6 | 6 | |

5-ASA, 5-amino salicylic acid; CD, Crohn's disease; GI, gastrointestinal; HC, healthy control; IBD, inflammatory bowel disease; UC, ulcerative colitis.

instructions. Serum samples were separated at the same time by centrifugation at room temperature for measurement of the following laboratory parameters: C-reactive protein (CRP), iron (Fe), ferritin, vitamin B12, folic acid, transferrin, soluble transferrin receptor (sTfR) and transferrin saturation (Tsat). All measurements were processed according to standard laboratory practice.

Serum samples, from patients and healthy controls, were also collected at the same time and were frozen only once at -80°C until assayed. Serum concentrations of hepcidin-25 and prohepcidin were measured using commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (DRG International, Inc., New Jersey, USA, catalog numbers EIA-4705 and EIA-4644, respectively) according to the manufacturer's instructions, in a blinded fashion without earlier knowledge of diagnosis or other clinical information. The expected range of normal values for hepcidin and prohepcidin, according to the manufacturer, was 13.3–54.4 ng/ml (5–95% percentile) and 58.9–158.1 ng/ml (5–95% percentile), respectively. Assay dynamic range for hepcidin and prohepcidin was 0.9–140 ng/ml and 0–1000 ng/ml, respectively. The analytical sensitivity of the assay for hepcidin and prohepcidin was 0.9 ng/ml and less than 3.95 ng/ml, respectively. Intra-assay and interassay variations were calculated based on the results of the measurement of three different samples of given concentrations, for each assay. For hepcidin, the intra-assay coefficient of variation was calculated between 4.10 and 4.86%, whereas the interassay variability (coefficient of variation) was between 7.37 and 11.42%. For prohepcidin, the intra-assay variation was between 4.07 and 4.69%, whereas the interassay variation was between 4.82 and 9.76%.

Statistical analysis

The Kolmogorov–Smirnov test was used to assess the normality of the data. As serum hepcidin and prohepcidin values were not normally distributed, results were presented as median values and their ranges. Box and Whisker plots were used to summarize and display data. Comparisons between the two groups were made by using the Mann–Whitney *U*-test. Comparisons between the three patient groups were made by using the

Kruskal–Wallis test (nonparametric analysis of variance). The association between serum hepcidin and prohepcidin and other serum markers as well as with clinical parameters was examined by linear regression. A multiple regression analysis (stepwise method) was used to adjust for confounders. In the final model, the dependent variables were serum hepcidin and prohepcidin, and the covariates were those with a significance value of less than 0.1 in the univariate analysis. The sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) were estimated to assess the validity of serum hepcidin in diagnosing active disease, anemia, or IDA.

A level of *P* less than 0.05 was considered statistically significant. All analyses were two-tailed and conducted using the computer-based statistics software program InStat version 3.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, USA).

Results

The prevalence of anemia in this group of patients with IBD was 42% (41.2% for UC and 42.9% for CD). Table 2 shows the measured laboratory parameters of patients with UC and CD compared with healthy controls. Significant differences with regard to all examined parameters (hemoglobin, ferritin, Tsat, sTfR, mean corpuscular volume, CRP, hepcidin, and prohepcidin) between both patients with UC and CD and healthy controls were observed. No differences between UC and CD were found. Thirty patients with IBD (30%) had IDA, defined as ferritin less than $30\ \mu\text{g/l}$ and Tsat less than 16%. Ferritin levels were significantly correlated with CRP levels ($P = 0.04$), but were not correlated with clinical indices of disease activity.

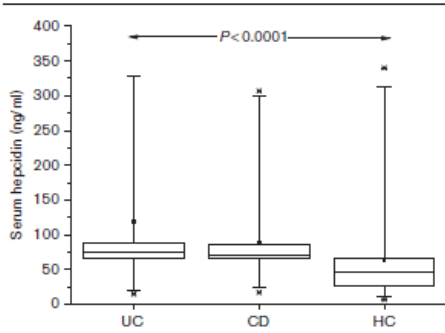
The distributions of serum hepcidin and prohepcidin in patients with UC and CD as well as in healthy controls are presented in Figs 1 and 2. Median hepcidin levels were significantly higher in both patients with UC and in patients with CD compared with healthy controls ($P < 0.0001$). Patients with IBD and with nonactive disease also had significantly higher serum hepcidin levels compared with healthy controls ($P < 0.0001$). Patients

Table 2 Laboratory data of inflammatory bowel disease patients included in the study compared with healthy controls

| Parameter median (range) | UC | CD | HC | <i>P</i> |
|------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|----------|
| Hemoglobin (g/dl) | 13.3 (9.5–16.6) | 12.8 (8.6–15.7) | 15.2 (12.1–18.0) | <0.0001 |
| Ferritin ($\mu\text{g/l}$) | 42.1 (3.6–381.3) | 33.4 (2.2–514.0) | 71.0 (10.0–259.5) | 0.003 |
| Tsat (%) | 19.4 (2.2–47.8) | 14.1 (2.6–52.2) | 28.9 (8.0–91.8) | <0.0001 |
| sTfR (mg/l) | 1.3 (0.7–6.8) | 1.5 (0.8–4.4) | 1.1 (0.5–1.7) | <0.0001 |
| MCV (fl) | 86.2 (66.9–102.9) | 89.2 (61.8–110.1) | 90.7 (69.0–100.9) | 0.01 |
| CRP (mg/dl) | 0.37 (0.32–5.3) | 0.39 (0.32–10.7) | 0.29 (0.29–1.5) | <0.0001 |
| ESR (mm/h) | 17 (1–80) | 28 (3–84) | 5.5 (1–38) | <0.0001 |
| Hepcidin (ng/ml) | 76.3 (16.5–736) | 70.9 (16.7–306.9) | 47.0 (8.6–340.2) | <0.0001 |
| Prohepcidin (ng/ml) | 89.1 (13.8–158.3) | 97.2 (20.1–162.8) | 121.4 (9.1–265.5) | 0.03 |

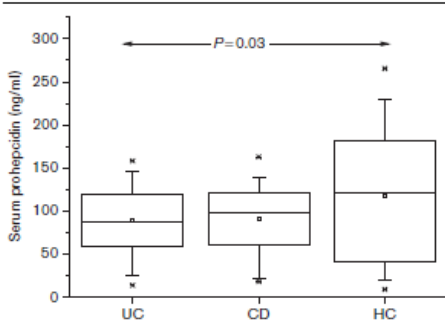
CD, Crohn's disease; CRP, C-reactive protein; ESR, erythrocyte sedimentation rate; HC, healthy control; MCV, mean corpuscular volume; sTfR, soluble transferrin receptor; Tsat, transferrin saturation; UC, ulcerative colitis.

Fig. 1



Distribution of serum hepcidin levels in patients with ulcerative colitis (UC, $n=49$), patients with Crohn's disease (CD, $n=51$), and healthy controls (HC, $n=102$). Boxes indicate the interquartile range with median value. Bars show the fifth and 95th percentiles and data points representing the first and 99th percentile are shown as x .

Fig. 2



Distribution of serum prohepcidin levels in patients with ulcerative colitis (UC, $n=49$), patients with Crohn's disease (CD, $n=51$), and healthy controls (HC, $n=102$). Boxes indicate the interquartile range with median value. Bars show the fifth and 95th percentiles and data points representing the first and 99th percentile are shown as x .

with IBD and with IDA had lower hepcidin levels compared with those without iron deficiency, although the difference was not statistically significant ($P=0.09$). Median prohepcidin levels were significantly lower in patients with IBD compared with healthy controls ($P=0.03$), but when patients with active disease were excluded the difference was not statistically significant ($P=0.06$). Patients with IBD and with iron deficiency had lower prohepcidin levels compared with those without iron deficiency, although the difference was not statistically significant ($P=0.17$).

Table 3 Correlation between serum hepcidin levels and selected characteristics

| Characteristic | Serum hepcidin | | |
|---------------------------|----------------|-----------------------|----------|
| | <i>r</i> | <i>r</i> ² | <i>P</i> |
| Hemoglobin (g/dl) | -0.36 | 0.13 | 0.0003 |
| Ferritin (μg/l) | 0.34 | 0.11 | 0.0007 |
| Tsat (‰) | 0.13 | 0.02 | 0.19 |
| sTfR (mg/l) | -0.09 | 0.008 | 0.39 |
| SCCAI (UC) | 0.36 | 0.13 | 0.009 |
| CDAI (CD) | 0.24 | 0.06 | 0.09 |
| C-reactive protein (mg/l) | 0.29 | 0.08 | 0.004 |
| Serum prohepcidin (ng/ml) | -0.33 | 0.11 | 0.0009 |

CD, Crohn's disease; CDAI, Crohn's disease activity index; SCCAI, simple clinical colitis activity index; sTfR, soluble transferrin receptor; Tsat, transferrin saturation; UC, ulcerative colitis.

Table 4 Correlation between serum prohepcidin levels and selected characteristics

| Characteristic | Serum prohepcidin | | |
|---------------------------|-------------------|-----------------------|----------|
| | <i>r</i> | <i>r</i> ² | <i>P</i> |
| Hemoglobin (g/dl) | 0.65 | 0.42 | <0.0001 |
| Ferritin (μg/l) | -0.21 | 0.04 | 0.04 |
| Tsat (‰) | -0.12 | 0.01 | 0.24 |
| sTfR (mg/l) | 0.14 | 0.02 | 0.18 |
| SCCAI (UC) | -0.02 | 0.0005 | 0.87 |
| CDAI (CD) | 0.12 | 0.01 | 0.44 |
| C-reactive protein (mg/l) | -0.11 | 0.01 | 0.29 |
| Serum hepcidin (ng/ml) | -0.33 | 0.11 | 0.0009 |

CD, Crohn's disease; CDAI, Crohn's disease activity index; SCCAI, simple clinical colitis activity index; sTfR, soluble transferrin receptor; Tsat, transferrin saturation; UC, ulcerative colitis.

Table 5 Factors associated with serum hepcidin levels in the multivariate analysis

| Variable | Serum hepcidin | | |
|-------------------|----------------|----------|----------|
| | Coefficient | <i>r</i> | <i>P</i> |
| Hemoglobin | -4.1 | -0.003 | 0.33 |
| Ferritin | 0.43 | 0.34 | 0.0008 |
| CRP | 8.38 | 0.12 | 0.21 |
| SCCAI (UC) | 18.1 | 0.37 | 0.004 |
| CDAI (CD) | -0.09 | -0.13 | 0.47 |
| Serum prohepcidin | 0.09 | 0.04 | 0.73 |

CD, Crohn's disease; CDAI, Crohn's disease activity index; CRP, C-reactive protein; SCCAI, simple clinical colitis activity index; UC, ulcerative colitis.

Table 3 shows the correlations between serum hepcidin levels and selected laboratory markers. Hepcidin was significantly negatively correlated with hemoglobin levels and positively correlated with ferritin, CRP, and SCCAI (for UC). Serum prohepcidin levels were significantly positively correlated with hemoglobin levels and negatively correlated with ferritin levels (Table 4). Significant negative correlation between serum hepcidin and prohepcidin levels was also found in patients with IBD.

Table 5 shows the factors associated with serum hepcidin in the multivariate analysis. After adjustment with other covariates, the parameters that were found to be associated with serum hepcidin in the final model were serum ferritin ($P=0.0008$) and SCCAI (for UC) ($P=0.004$).

Table 6 Factors associated with serum prohepcidin levels in the multivariate analysis

| Variable | Serum prohepcidin | | |
|----------------|-------------------|--------|------|
| | Coefficient | r | P |
| Hemoglobin | 0.23 | 0.0005 | 0.91 |
| Ferritin | 0.03 | 0.06 | 0.63 |
| Serum hepcidin | 0.008 | 0.04 | 0.86 |

Serum prohepcidin levels after adjustment with other covariates showed no correlations with other parameters (Table 6).

The sensitivity of low hepcidin for diagnosis of anemia using a cut-off of 79.4 ng/ml (upper 95% confidence limit of healthy controls) was 71%, the specificity was 43%, whereas PPV was 48%, and NPV was 68%. Similarly, the sensitivity of low hepcidin for diagnosis of IDA was 81%, the specificity was 45%, whereas PPV was 52% and NPV was 76%. In contrast, high hepcidin levels (> 79.4 ng/ml) had a sensitivity of 65%, specificity of 7%, PPV of 39%, and NPV of 89% for diagnosis of active disease.

There were no significant associations between serum hepcidin or prohepcidin levels and other clinical characteristics of the patients (sex, age, smoking status, disease duration, extraintestinal manifestations, and use of medications). Patients with IBD receiving infliximab had no significant difference in the levels of hepcidin or prohepcidin compared with patients without this treatment ($P = 0.34$).

Discussion

In this study, we found significantly increased hepcidin level and decreased prohepcidin level in both patients with UC and patients with CD compared with healthy controls. In addition, in the univariate analysis there was a significant negative correlation between hepcidin and hemoglobin, whereas prohepcidin was positively correlated with hemoglobin levels in patients with IBD. Moreover, both hepcidin and prohepcidin were significantly correlated with ferritin levels and hepcidin only with disease activity (for UC) and CRP levels. No significant association with iron deficiency of both peptides was found. In the multivariate analysis, hepcidin was significantly correlated only with ferritin and SCCAI, while prohepcidin did not retain any association. Our study is the first one that measures both serum hepcidin and prohepcidin, at the same time, in patients with IBD.

There is a substantial difficulty in the interpretation of serum hepcidin and prohepcidin levels in patients with IBD, on the basis of the dual role these hormones play, as they are implicated in both iron homeostasis and the mechanisms of inflammation. Therefore, more complex pathways of upregulation or downregulation of these proteins are involved, depending on the balance between grade of iron deficiency and grade of anemia of chronic

disease in each patient. There is a growing body of evidence presenting interleukin-6 (IL-6) as the predominant inflammatory mediator of hepcidin expression [13,16,26,27]. It has been shown that administration of IL-6 or bacterial lipopolysaccharide in mice and humans induces hepcidin production [27,28]. The extent to which hepcidin may be induced by other inflammatory agents, such as lipopolysaccharide, IL-1, or tumor necrosis factor- α , likely depends on their ability to secondarily promote IL-6 expression [27].

Various assays have been developed on mass spectrometry platforms for the evaluation of hepcidin, including surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, and liquid chromatography tandem-MS techniques. Recently, immunochemical assays for hepcidin-25 have also been developed, which consists of competitive radioimmunoassays and ELISA. Currently there is no reference method for hepcidin measurements. In a recent multicenter study [29], hepcidin levels reported by the various methods vary considerably but analytical variance is generally low and similar for all methods.

The literature with regard to the roles of hepcidin and prohepcidin in the mechanisms of anemia in IBD pathophysiologic pathways is rather limited and controversial. Urinary hepcidin levels have been found to be increased in CD, mainly in active disease [18]. Arnold *et al.* [19] using radioimmunoassay measured serum hepcidin in 61 patients with IBD (51 with UC and 20 with anemia) and 25 healthy controls. They found that serum hepcidin levels were significantly decreased in patients with IBD compared with healthy controls, but positively correlated with IL-6. Our larger study, with one hundred patients, showed significantly increased hepcidin levels in patients with IBD compared with healthy controls and positively correlated with disease activity, only in patients with UC. In a Hungarian study of 102 patients with IBD, serum prohepcidin levels showed no significant differences compared with those in the control group [21]. In a small number of pediatric patients with IBD ($n = 15$), serum prohepcidin was found to be significantly increased in patients with IBD and positively correlated with CRP [20]. In this study, we found significantly lower prohepcidin levels in patients with IBD compared with healthy controls, not correlated with disease activity. Recent studies have also shown clearly reduced serum prohepcidin levels in uncomplicated IDA [30]. In addition, no association between serum prohepcidin levels and anemia of inflammation has been reported [17].

Higher hepcidin and lower prohepcidin levels in patients with IBD compared with healthy controls indicate a key role of these two hormones in IBD. The strong correlation (negative of hepcidin and positive of prohepcidin)

with hemoglobin in the univariate analysis suggests that they offer a major contribution in the development of anemia, but multivariate analysis shows that their levels alone seem inadequate for use in distinguishing IDA from anemia of inflammation. This is supported by the absence of correlation of hepcidin and prohepcidin with T_sat and sTfR, which are rather established markers of anemia classification. In contrast, we found a positive correlation between hepcidin and ferritin, a finding that should be expected as both are acute phase proteins and their levels rise during active inflammation processes.

In our study, multivariate analysis showed that only hepcidin retains a strong positive correlation with ferritin and disease activity mainly in patients with UC, and that prohepcidin does not correlate with any of the examined parameters. The controversial literature with regard to the role of prohepcidin in IBD could be explained by the complicated biochemical pathways for hepcidin production. It seems that prohepcidin simply acts as a proform of hepcidin and it cannot be used as a reliable marker of IDA or anemia of inflammation. Although no significant correlations have been described between serum prohepcidin and hepcidin-25 [31,32], and taking into account that no studies have addressed so far the question if prohepcidin is further processed and matured either in circulation or in the extracellular matrix after being released from hepatocytes or other cells [33], the negative correlation in the univariate analysis seems to provide evidence, although not so strong, which favors the existence of a common biochemical pathway, at least to a degree, responsible for the balance between prohepcidin transformation and hepcidin production in the liver.

Our finding of the surprisingly stronger correlation of hepcidin with disease activity in patients with UC than in patients with CD does not have a clear explanation. It could be attributed to the known great variation of the values of clinical indices of activity and especially of CDAI. Moreover, treatment with infliximab, which leads to reduction of disease activity and improvement of anemia [3], was also surprisingly not associated with hepcidin levels. However, our study was cross-sectional, and the number of patients with IBD under this treatment was rather small to draw any firm conclusions. The finding of a rather satisfactory sensitivity of low hepcidin in diagnosis of IDA (81%) indicates a possible role of hepcidin in our armamentarium of anemia markers, especially in collaboration with other markers, established or of new generation.

Our study has several limitations, including its cross-sectional design, making it unable to determine whether serum levels of the examined parameters influence future changes in hemoglobin levels (positively or negatively). The number of patients with IBD and with anemia was rather small for subgroup analysis with regard to the cause

of anemia. Moreover, there are some concerns about the ELISA assay for prohepcidin measurement, because prohepcidin may be an unstable analyte in serum [17].

In conclusion, our study showed that serum hepcidin and prohepcidin levels are significantly altered in patients with IBD compared with healthy controls. This finding seems to be based on the substantial role of these two hormones in the process of inflammation. Their correlation and combination with other iron and inflammation indices in IBD population remains to be investigated in further studies.

Acknowledgement

There are no conflicts of interest to declare.

References

- 1 Gasche C, Lomer MCE, Cavill I, Weiss G. Iron, anemia, and inflammatory bowel diseases. *Gut* 2004; **53**:1190–1197.
- 2 Wells CW, Lewis S, Barton JR, Corbett S. Effects of changes in hemoglobin level on quality of life and cognitive function in inflammatory bowel disease patients. *Inflamm Bowel Dis* 2006; **12**:123–130.
- 3 Bergamaschi G, Di Sabatino A, Albertini R, Ardizzone S, Biancheri P, Bonetti E, et al. Prevalence and pathogenesis of anemia in inflammatory bowel disease. Influence of anti-tumor necrosis factor- α treatment. *Haematologica* 2010; **95**:199–205.
- 4 Gomollón F, Gisbert JP. Anemia and inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2009; **15**:4659–4665.
- 5 Weiss G, Gasche C. Pathogenesis and treatment of anemia in inflammatory bowel disease. *Haematologica* 2010; **95**:175–178.
- 6 Gasche C, Berstad A, Befrits R, Beglinger C, Dignass A, Eichen K, et al. Guidelines on the diagnosis and management of iron deficiency and anemia in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2007; **13**:1545–1553.
- 7 Tsolakidou G, Koutroubakis IE. Stimulating erythropoiesis in inflammatory bowel disease anemia. *World J Gastroenterol* 2007; **13**:4798–4806.
- 8 Hugman A. Hepcidin: an important new regulator of iron homeostasis. *Clin Lab Haematol* 2006; **28**:75–83.
- 9 Park CH, Valore EV, Wang AJ, Ganz T. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 2001; **276**:7806–7810.
- 10 Krause A, Neitz S, Mägert HJ, Schulz A, Forsmann WG, Schulz-Knappe P, et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett* 2000; **480**:147–150.
- 11 Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 2004; **306**:2090–2093.
- 12 Delaby C, Pflard N, Gonçalves AS, Beaumont C, Canonne-Hergaux F. Presence of the iron exporter ferroportin at the plasma membrane of macrophages is enhanced by iron loading and down-regulated by hepcidin. *Blood* 2005; **106**:3979–3984.
- 13 Ganz T. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood* 2003; **102**:783–788.
- 14 Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroy P, Turin B, Brissot P, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 2001; **276**:7811–7819.
- 15 Kemna E, Tjalsma H, Laamliks C, Nemeth E, Willems H, Swinkels D. Novel urine hepcidin assay by mass spectrometry. *Blood* 2005; **106**:3268–3270.
- 16 Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan JL, Bigard X, Dewaux L, et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest* 2002; **110**:1037–1044.
- 17 Sasu BJ, Li H, Rose MJ, Arvedson TL, Doelligast G, Molineux G. Serum hepcidin but not prohepcidin may be an effective marker for anemia of inflammation (A). *Blood Cells Mol Dis* 2010; **45**:238–245.
- 18 Semrin G, Fishman DS, Bouvaros A, Zholudev A, Saunders AC, Correia CE, et al. Impaired intestinal iron absorption in Crohn's disease correlates with disease activity and markers of inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 2008; **12**:1101–1106.
- 19 Arnold J, Sangwaisa A, Bhaikali B, Geoghegan F, Busbridge M. Hepcidin and inflammatory bowel disease: dual role in host defence and iron homeostasis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009; **21**:425–429.

- 20 Kaya Z, Yıldız E, Gursel T, Albayrak M, Kocak U, Karaderiz C, et al. Serum Prohepcidin levels in children with solid tumors, inflammatory bowel disease and iron deficiency anaemia. *J Trop Pediatr* 2010. [Epub ahead of print]
- 21 Nagy J, Lakner L, Poor V, Pandur E, Muzsik G, Miseta A, et al. Serum prohepcidin levels in chronic inflammatory bowel diseases. *J Crohns Colitis* 2010; **4**:849–853.
- 22 Stange EF, Travis SP, Vermeire S, Boglinger C, Kupcinkas L, Geboes K, et al. European Crohn's and Colitis Organisation. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut* 2008; **55**:1–15.
- 23 Stange EF, Travis SPL, Vermeire S, Reinisch W, Geboes K, Barakauskiene R, et al. European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO). European evidence based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis* 2008; **2**:1–23.
- 24 Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Annett ID, Bernstein CN, Brant SR, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol* 2005; **19** (Suppl A):5–36.
- 25 WHO, UNICEF, UNU. *Iron Deficiency Anemia: Assessment, Prevention and Control. A guide for programme managers*. Geneva: WHO reference number: WHO/NHD/01.3, WHO publications; 2001. p. 33.
- 26 Garz T. Hepcidin and its role in regulating systemic iron metabolism. In: *Hematology 2008. The American Society of Hematology (ASH) Education Program Book*. Washington, DC: ASH publications; 2008. pp. 29–35.
- 27 Fleming MD. The regulation of hepcidin and its effects on systemic and cellular iron metabolism. In: *Hematology 2008. The American Society of Hematology (ASH) Education Program Book*. Washington, DC: ASH publications; 2008. pp. 151–158.
- 28 Kemna E, Pickkers P, Nemeth E, Van der Hoeven H, Swinkels D. Time-course analysis of hepcidin, serum iron, and plasma cytokine levels in humans injected with LPS. *Blood* 2005; **106**:1864–1866.
- 29 Krof JJC, Kemna EHM, Bansal SS, Busbridge M, Camprostrini N, Girelli D, et al. Results of the first international round robin for the quantification of urinary and plasma hepcidin assays: need for standardization. *Haematologica* 2009; **94**:1748–1752.
- 30 Jayaram S, Sthaneshwar P, Sokkalingam S. Serum prohepcidin concentrations in rheumatoid arthritis. *Pathology* 2009; **41**:178–182.
- 31 Kemna EH, Kartikasari AE, Van Tits LJ, Pickkers P, Tjalsma H, Swinkels DW. Regulation of hepcidin: insights from biochemical analyses on human serum samples. *Blood Cells Mol Dis* 2008; **40**: 339–346.
- 32 Valore E, Garz T. Posttranslational processing of hepcidin in human hepatocytes is mediated by the prohormone convertase furin. *Blood Cells Mol Dis* 2008; **40**:132–138.
- 33 Beirão I, Almeida S, Swinkels D, Costa PM, Moreira L, Fonseca I, et al. Low serum levels of prohepcidin, but not hepcidin-25, are related to anemia in familial amyloidosis TTR V30M. *Blood Cells Mol Dis* 2008; **41**:175–178.



Measurement of reticulocyte and red blood cell indices in the evaluation of anemia in inflammatory bowel disease

Pantelis Oustamanolakis^a, Ioannis E. Koutroubakis^{a,*}, Ippokratis Messaritakis^b, Georgios Kefalogiannis^b, Maria Niniraki^c, Elias A. Kouroumalis^a

^a Department of Gastroenterology, University Hospital Heraklion, Crete, Greece

^b Laboratory of Hematology, University Hospital Heraklion, Crete, Greece

^c Laboratory of Immunology, University Hospital Heraklion, Crete, Greece

Received 27 November 2010; received in revised form 10 January 2011; accepted 1 February 2011

KEYWORDS

Anemia;
Crohn's disease;
Ferritin;
Iron deficiency;
Ulcerative colitis

Abstract

Background: The commonest types of anemia in inflammatory bowel disease (IBD) are iron deficiency (IDA) and anemia of chronic disease. The differentiation between these two conditions is important for the management of the patient. The aim of this study was to investigate the usefulness of reticulocyte and red blood cell indices in the evaluation of anemia in IBD.

Methods: One hundred IBD patients [49 ulcerative colitis (UC), 51 Crohn's disease (CD)] and 102 healthy controls were enrolled. Measurement of reticulocyte and red blood cell indices was performed using the Coulter LH780 Hematology Analyzer (Beckman Coulter). Additionally, serum levels of ferritin, transferrin saturation (Tsat) and soluble transferrin receptor (sTfR) were analyzed in all patients and controls.

Results: The prevalence of anemia was 41.2% for UC and 42.9% for CD, whereas 30 IBD patients (30%) had IDA. Red cell Distribution Width (RDW), Red blood cell Size Factor (RSF), and Reticulocyte Distribution Width-Coefficient of Variation (RDWR-CV) were found significantly correlated with both Tsat and sTfR but not with ferritin levels. Patients with IDA had significantly higher RDW and RDWR-CV and significantly lower RSF levels compared with those without IDA. High values of RDW (sensitivity 93%, specificity 81%) and low values of RSF (sensitivity 83%, specificity 82%) were the best markers for the diagnosis of IDA. Both RDWR-CV and RDWR-SD were significantly correlated with disease activity and CRP levels.

Abbreviations: UC, Ulcerative Colitis; CD, Crohn's Disease; HC, Healthy Controls; IDA, iron deficiency anemia; ACD, anemia of chronic disease; MCV, Mean corpuscular volume; RDW, Red cell distribution width; RSF, Red blood cell Size Factor; IRF, Immature Reticulocyte Fraction; RDWR-CV, Reticulocyte Distribution Width-Coefficient of Variation; RDWR-SD, Reticulocyte Distribution Width-Standard Deviation; Tsat, transferrin saturation; sTfR, Soluble transferrin receptor.

* Corresponding author at: Dept. of Gastroenterology, University Hospital Heraklion P.O. Box 1352, 71110 Heraklion, Crete, Greece. Tel.: +30 2810392253; fax: +30 2810542085.

E-mail address: ikoutroub@med.uoc.gr (I.E. Koutroubakis).

Conclusion: RDW, RSF and RDWR, could be useful markers for the evaluation of anemia and disease activity in IBD.

© 2011 European Crohn's and Colitis Organisation. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Anemia is one of the commonest extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease (IBD)^{1–3} with significant impact on the patients quality of life. The most common types of anemia in IBD are iron deficiency anemia (IDA, up to 90% of patients) and anemia of inflammation or anemia of chronic disease (ACD, prevalence 11–42%).^{5–8} Other rare causes of anemia are vitamin B12 or folic acid deficiency, hemolysis and drug-induced anemia.^{9,10}

One common and complicated problem which a clinician faces when taking care of IBD patients is to diagnose the type of anemia in an individual and to determine the degree of iron deficiency and the degree of inflammation in each patient, in order to decide, in an evidence-based manner, for the best management of anemia, tailored for each individual.¹¹ The evaluation of anemia requires a determination of body iron status. Serum ferritin is an indicator of the storage iron content, but during inflammatory conditions may not exactly reflect iron stores as its expression is affected by cytokines.¹² Serum iron concentration and transferrin saturation (Tsat) are low in both conditions (IDA and ACD), so they are not useful in differential diagnosis.¹² Soluble transferrin receptor (sTfR) serum levels are increased in conditions of low iron availability for erythropoiesis but in ACD are normal, due to the fact that transferrin receptor expression is negatively affected by inflammatory cytokines.¹³ It seems that conventional markers of iron status cannot safely define IDA in a chronic inflammatory setting.

During the last decade, several new parameters have been introduced to our armamentarium for the diagnosis of ACD or IDA as a result of the development of more sophisticated and technologically advanced automated blood cell counters. COULTER[®] LH780 Hematology Analyzer (Beckman Coulter, Inc., CA, USA) is a last generation hematology analyzer providing automated measurements of a variety of new red cells and reticulocytes parameters. Red blood cell Size Factor (RSF) is the square root of the product of Mean Corpuscular Volume (MCV) multiplied by the Mean Reticulocyte Volume (MRV) and seems to be a suitable parameter for the study of bone marrow erythropoietic activity, as it provides a very good level of agreement with reticulocyte hemoglobin content (CHR).¹⁴ The Immature Reticulocyte Fraction (IRF) is an early and sensitive index of erythropoiesis and is useful in distinguishing anemias characterized by increased marrow erythropoiesis from anemias due to reduced marrow activity and from situations such as acute infections and myelodysplastic syndromes.¹⁵ Reticulocyte Distribution Width-Standard Deviation (RDWR-SD) is the standard deviation of the retic volume multiplied by the volume factor. Reticulocyte Distribution Width-Coefficient of Variation (RDWR-CV) is the ratio of RDWR-SD and the retic volume mean multiplied by 100. Both RDWR-SD and RDWR-CV are derived from the reticulocyte histogram. RDWR is an indication of the size dispersion within the reticulocyte population.¹⁶

The aim of this study was to investigate the usefulness of reticulocyte and red blood cell indices in the evaluation of anemia in inflammatory bowel disease.

2. Materials and Methods

2.1. Patients

One hundred consecutive IBD patients followed up at the Gastroenterology Department of the University Hospital of Heraklion were

included in the study. They were compared with 102 matched for age healthy controls (HC). The main demographic and clinical parameters of the patients and HC are shown in Table 1. Individuals considered HC were all healthy blood donors, with no family history of IBD or any other significant medical history. All patients and controls were of Caucasian origin. Exclusion criteria for the study were hemoglobinopathy or thalassemia trait, history of GI bleeding, malignancy, chemotherapy or radiotherapy, renal insufficiency or hematologic, liver and autoimmune disorders, as well as female patients with history of ongoing pregnancy or recent delivery (< 12 months from the study initiation). Moreover, none patient or control had received blood transfusion or treatment with iron or erythropoietin during the last three months, from the study initiation.

Diagnosis of ulcerative colitis (UC) and Crohn's Disease (CD) was based on the European Crohn's and Colitis Organization (ECCO) evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease and Ulcerative Colitis,^{17,18} while disease phenotyping was based on Montreal classification.¹⁹ As far as the disease activity is concerned, it was calculated at the time of blood collection and in CD patients was measured based on the CDAI score²⁰; they were divided in two groups: "Active" with CDAI > 150 and "Inactive" with CDAI < 150. In UC patients, the Simple Clinical Colitis Activity Index (SCCAI)²¹ was used for the evaluation of disease activity and "Active" disease was considered with a score of 3 or more points. Serum CRP levels were also used as a marker of evaluation of the disease activity. Definition of anemia in our study was based on the established WHO criteria of hemoglobin < 13 g/dl and < 12 g/dl, for men and women respectively.²² None of the healthy controls had anemia.

Informed consent was obtained from all patients. The study protocol conformed to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki (6th revision, 2008) and was approved by the Ethics Committee of the Medical Faculty of Crete.

2.2. Laboratory Studies

Whole blood samples were collected from patients and HC for a full blood count and erythrocyte sedimentation rate (ESR) measurement at the time of collection. All full blood counts were processed using the COULTER[®] LH780 Hematology Analyzer (Beckman Coulter, Inc., CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Besides full blood count, RSF, IRF, RDWR-SD and RDWR-CV were measured and reported for every patient and HC. Serum samples were separated at the same time by centrifugation at room temperature for measurement of the following laboratory parameters: C-reactive protein (CRP), iron (Fe), ferritin (Fer), transferrin (TRF), soluble transferrin receptor (sTfR) and Transferrin saturation (Tsat). All measurements were processed according to standard laboratory practice.

2.3. Statistical Analysis

All results are expressed as means \pm standard deviation. Comparisons among the three diagnostic groups in terms of continuous measurements were made by the Kruskal–Wallis test (nonparametric ANOVA). Post hoc multiple comparisons tests were made by Dunn's test. Comparisons between two groups were made by either the Student's *t*-test or Mann–Whitney *U* test. Kolmogorov and Smirnov test was used to assess the assumption that data were sampled from populations that follow the Gaussian distributions. Correlations

Table 1 Demographic and clinical parameters of the patients and controls included in the study.

| | UC | CD | IBD total | HC |
|---------------------------------|-----------|-----------|-----------|--------------------------|
| Number | 49(49%) | 51(51%) | 100 | 102 |
| Mean age (years) | 50.1 | 48.2 | 49.1 | 45.5 |
| Male | 32(65.3%) | 26(51%) | 58(58%) | 82(80.4%) [*] |
| Female | 17(34.7%) | 25(49%) | 42(42%) | 20(19.6%) ^{**} |
| Current smokers | 9(18.4%) | 21(41.2%) | 30(30%) | 58(56.9%) ^{***} |
| Disease activity | | | | |
| Active | 11(22.4%) | 9(17.6%) | 20(20%) | |
| Inactive | 38(77.6%) | 42(82.4%) | 80(80%) | |
| Mean disease duration (years) | 8.8 | 7.3 | 8.1 | |
| Disease localization | | | | |
| Proctitis(UC)/ Ileum(CD) | 14(28.6%) | 21(41.2%) | | |
| Left-sided(UC)/ Colon(CD) | 23(46.9%) | 13(25.5%) | | |
| Extensive(UC)/Ileum + Colon(CD) | 12(24.5%) | 16(31.4%) | | |
| Upper GI involvement | | 1(1.9%) | | |
| Disease type (CD) | | | | |
| Stenotic | | 11(21.6%) | | |
| Fistulizing | | 8(15.7%) | | |
| Inflammatory | | 32(62.7%) | | |
| Perianal disease | | 6(11.8%) | | |
| Extraintestinal manifestations | 7(14.3%) | 26(51%) | 33(33%) | |
| Current treatment | | | | |
| Salazopyrine | 7 | 9 | 16 | |
| 5-ASA | 41 | 19 | 60 | |
| Oral steroids | 2 | 16 | 18 | |
| Azathioprine | 10 | 21 | 31 | |
| Methotrexate | 3 | 4 | 7 | |
| Infliximab | 2 | 10 | 12 | |
| Metronidazole | 0 | 6 | 6 | |

* p=0.15.

** p=0.01.

*** p=0.02.

between the examined reticulocyte and red blood cell parameters and indices of iron deficiency or disease activity were analyzed with the Pearson's correlation method. The sensitivity, specificity and positive and negative predictive values were estimated to assess the validity of these markers in diagnosing IDA. All analyses were two-tailed and conducted using the computer-based statistics software program Instat version 3.0 (GraphPad Software, Inc.). A level of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

Forty two IBD patients were classified as anemic using the WHO criteria. The prevalence of anemia was 41.2% for UC and 42.9% for CD. Three patients (3%) had severe ($Hb < 8$), 7 (7%) had moderate ($8 < Hb < 9.5$) and 32 (32%) had mild ($Hb > 9.5$) anemia. Thirty IBD patients (30%) had IDA (ferritin $< 30 \mu\text{g/l}$ and $Tsat < 16\%$), 4 (4%) had ACD (ferritin $> 100 \mu\text{g/l}$ and $Tsat < 16\%$) and 8 (8%) mixed IDA/ACD (ferritin: $30-100 \mu\text{g/l}$ and $Tsat < 16\%$).

Table 2 shows the measured laboratory parameters of UC and CD patients compared with healthy controls. Significant differences concerning all examined parameters (hemoglobin, MCV, RDW, IRF, RDWR-CV, RDWR-SD, ferritin, $Tsat$, $sTfR$, MCV, CRP and ESR), except RSF, between both UC and CD patients and healthy controls were observed. No differences between UC and CD were found.

The correlations between the examined markers (RDW, RSF, IRF, RDWR-CV, and RDWR-SD) and the markers of iron deficiency (ferritin,

$Tsat$, $sTfR$) are presented in Table 3. RDW, RSF and RDWR-CV were found significantly correlated with both $Tsat$ and $sTfR$.

Patients with iron deficiency anemia were compared with those without IDA (patients with other causes of anemia and patients without anemia) and the results are presented in Table 4. RDW, RSF and RDWR-CV were found significantly different in patients with IDA compared with those without IDA. Comparison of IBD patients with IDA and IBD patients with ACD (including mixed IDA/ACD) showed no difference concerning the examined parameters (Table 5).

The best markers for the diagnosis of IDA were high values of RDW and low values of RSF. The sensitivity of high RDW for the diagnosis of IDA using a cutoff of 14 (upper 95% confidence limit of HC), was 93%, the specificity was 81%, whereas positive predictive value was 68% and negative predictive value was 96%. Similarly the sensitivity of low RSF for the diagnosis of IDA using a cutoff point of 98.6 fl (upper 95% confidence limit of HC), was 83%, the specificity was 82% whereas the positive predictive value was 67% and the negative predictive value was 92%. The sensitivity of high values of RDWR-CV for diagnosis of IDA, using a cutoff point of 25.9 (upper 95% confidence limit of HC), was 60%, the specificity was 51% whereas the positive predictive value was 35% and the negative predictive value was 75%.

Concerning disease activity, RDW and RSF were not significantly different between active and non active disease and no significant correlation between RDW or RSF and CRP levels was found ($r = 0.16$, $p = 0.12$ and $r = -0.16$, $p = 0.12$ respectively). A trend of correlation between IRF and CRP levels was detected, although not statistically significant ($r = 0.18$, $p = 0.06$). A significant difference between active and non active disease was found for both RDWR-CV and

Table 2 Laboratory data of IBD patients included in the study compared with healthy controls.

| Parameter | UC | CD | HC | p |
|---------------------------------|------------------|------------------|-------------------|---------|
| Mean ± SD | | | | |
| Hemoglobin (g/dl) | 13.1 ± 2.0 | 12.6 ± 1.9 | 15.0 ± 1.2 | <0.0001 |
| MCV (fl) | 86.4 ± 8.1 | 87.6 ± 11.0 | 90.1 ± 5.5 | 0.01 |
| RDW (%) | 15.4 ± 2.3 | 15.9 ± 2.4 | 13.7 ± 1.1 | <0.0001 |
| RSF (fl) | 96.7 ± 7.6 | 97.4 ± 11.2 | 97.6 ± 5.3 | 0.82 |
| IRF | 0.35 ± 0.05 | 0.33 ± 0.06 | 0.29 ± 0.05 | <0.0001 |
| RDWR-CV | 27.2 ± 4.6 | 28.3 ± 5.5 | 25.4 ± 2.5 | <0.0001 |
| RDWR-SD | 29.3 ± 5.4 | 30.4 ± 4.9 | 26.8 ± 3.1 | <0.0001 |
| Ferritin* (µg/l, median, range) | 42.1 (3.6–381.3) | 33.4 (2.2–514.0) | 71.0 (10.0–259.5) | 0.003 |
| Tsat (%) | 20.4 ± 10.6 | 16.9 ± 12.8 | 32.2 ± 15.1 | <0.0001 |
| sTfR (mg/l) | 1.6 ± 0.9 | 1.7 ± 0.9 | 1.1 ± 0.2 | <0.0001 |
| CRP* (mg/dl, median, range) | 0.37 (0.32–5.3) | 0.39 (0.32–10.7) | 0.29 (0.29–1.5) | <0.0001 |
| ESR (mm/h) | 22.8 ± 19.2 | 28.0 ± 16.2 | 6.9 ± 5.7 | <0.0001 |

RSF, Red blood cell Size Factor; IRF, Immature Reticulocyte Fraction; RDWR-CV, Reticulocyte Distribution Width-Coefficient of Variation; RDWR-SD, Reticulocyte Distribution Width-Standard Deviation; Tsat, Transferrin Saturation; sTfR, soluble transferrin receptor; CRP, C-reactive protein; ESR, Erythrocyte Sedimentation Rate.

* Not normally distributed.

RDWR-SD ($p < 0.05$). Moreover, there was a significant correlation between RDWR-CV or RDWR-SD and CRP ($r = 0.39$, $p < 0.0001$ and $r = 0.31$, $p = 0.001$ respectively).

There were no significant associations between the examined parameters and other clinical characteristics of the patients (sex, age, smoking status, disease duration, extraintestinal manifestations and use of medications).

4. Discussion

In this study we investigated the usefulness of a conventional (RDW) and four new generation (IRF, RSF, RDWR-CV and RDWR-SD) markers in the evaluation of anemia in patients with IBD. It is widely accepted that anemia of IBD is rather mixed, with a portion of iron deficiency and a portion of anemia of chronic disease, making it difficult to recognize the contribution of each individual fraction to the final clinical setting in each patient. Ferritin, Tsat and sTfR are well established parameters of evaluation of anemia, with ferritin levels being altered by the co-existence of inflammation while sTfR lacks stable standardization among different laboratories and it is a parameter not widely available.^{23,24}

A variety of new red cell and reticulocyte indices related to anemia is currently under investigation^{25,26} and a new generation of blood analyzers, like the Coulter LH 780 on which this study was based, offers measurement of some new parameters, which are also under evaluation in an effort to create an "anemia profile" for every

patient on the basis of a simple full blood count, thereby reducing the need for other second line and more expensive markers, such as ferritin, Tsat and sTfR.

Red cell Distribution Width (RDW) is a quantitative measurement of variation in red cell size and is equivalent to anisocytosis. It is widely used as a guide for the differential diagnosis of anemia, with high values found in IDA. In our study, RDW was significantly increased in UC and CD patients compared to HC group. It was also significantly increased in patients with IDA, compared to patients without IDA. Cakal et al.²⁷ reported that RDW levels were elevated in patients with active IBD with a significant correlation with CRP. In our study, RDW was not significantly different between active and non active disease and no significant correlation between RDW and CRP levels was found. Clarke et al.²⁸ suggested RDW as an effective marker in differentiating CD from UC. However, in our study no difference of RDW between CD and UC was found. Our finding of high RDW in IBD patients can be explained on the basis of the iron deficiency that the majority of these patients have, reflecting the high proportion of anisocytosis. The strong correlation of RDW with Tsat (negative correlation) and sTfR (positive correlation) as well as the high RDW measurement in IDA group are not unexpected findings, given the low rate of red cells production and consequent anisocytosis in iron deficiency situations. The high sensitivity (93%) of high RDW for diagnosis IDA is in agreement with other studies, which propose RDW as a high sensitivity marker of iron deficiency.²⁹ On the other hand, it seems that RDW is not significantly influenced by disease activity, because it mostly depends on bone marrow erythropoietic activity and not on the degree of inflammation.

Table 3 Correlations between the examined markers (RDW, RSF, IRF, RDWR-CV, and RDWR-SD) and the markers of iron deficiency (ferritin, Tsat, sTfR) in IBD patients.

| Parameter | Ferritin | | Tsat | | sTfR | |
|-----------|----------|------|-------|---------|-------|---------|
| | r | p | r | p | r | p |
| RDW | -0.10 | 0.32 | -0.39 | <0.0001 | 0.54 | <0.0001 |
| RSF | 0.09 | 0.33 | 0.36 | 0.0002 | -0.54 | <0.0001 |
| IRF | 0.09 | 0.38 | -0.01 | 0.33 | 0.01 | 0.88 |
| RDWR-CV | 0.14 | 0.17 | -0.21 | 0.03 | 0.38 | <0.0001 |
| RDWR-SD | 0.14 | 0.15 | -0.02 | 0.80 | 0.11 | 0.26 |

RSF, Red blood cell Size Factor; IRF, Immature Reticulocyte Fraction; RDWR-CV, Reticulocyte Distribution Width-Coefficient of Variation; RDWR-SD, Reticulocyte Distribution Width-Standard Deviation.

Table 4 Comparison of the examined markers (RDW, RSF, IRF, RDWR-CV, and RDWR-SD) in patients with and without iron deficiency anemia (IDA).

| Parameter | Patients with IDA | Patients without IDA | p |
|-----------|-------------------|----------------------|--------|
| RDW | 17.0 ± 2.1 | 15.1 ± 2.2 | 0.0002 |
| RSF | 91.9 ± 10.1 | 99.1 ± 8.5 | 0.0004 |
| IRF | 0.32 ± 0.06 | 0.34 ± 0.05 | 0.19 |
| RDWR-CV | 30.1 ± 7.2 | 26.7 ± 3.4 | 0.02 |
| RDWR-SD | 30.1 ± 4.2 | 29.7 ± 5.5 | 0.53 |

RSF, Red blood cell Size Factor; IRF, Immature Reticulocyte Fraction; RDWR-CV, Reticulocyte Distribution Width-Coefficient of Variation; RDWR-SD, Reticulocyte Distribution Width-Standard Deviation.

Table 5 Comparison of the examined markers (RDW, RSF, IRF, RDW-CV, and RDW-SD) in patients with iron deficiency anemia (IDA) and anemia of chronic disease (or mixed IDA/ACD).

| Parameter | Patients with IDA | Patients with ACD | p |
|-----------|-------------------|-------------------|------|
| RDW | 17.0±2.1 | 16.2±1.5 | 0.30 |
| RSF | 91.9±10.1 | 94.1±9.1 | 0.43 |
| IRF | 0.32±0.06 | 0.33±0.05 | 0.54 |
| RDWR-CV | 30.1±7.2 | 28.3±7.1 | 0.37 |
| RDWR-SD | 30.1±4.2 | 29.8±5.5 | 0.59 |

RSF, Red blood cell Size Factor; IRF, Immature Reticulocyte Fraction; RDWR-CV, Reticulocyte Distribution Width-Coefficient of Variation; RDWR-SD, Reticulocyte Distribution Width-Standard Deviation.

Therefore, RDW could be suggested as a suitable marker to distinguish between IDA and ACD in patients with active IBD. However, the results of the present study failed to confirm this hypothesis maybe because the number of patients with ACD included in the study was rather small to draw firm conclusions.

Immature Reticulocyte Fraction (IRF) is the ratio of immature reticulocytes to the total number of reticulocytes.²⁸ IRF increases before the total reticulocyte count and it is an early and sensitive index of erythropoiesis. IRF is high in increased marrow erythropoiesis (acquired hemolytic anemias, blood loss) and in situations such as acute infections or myelodysplastic syndromes, while it is low in reduced marrow activity (i.e., chronic renal disease).^{25,30} In our study, IRF was found significantly higher in IBD patients, compared to HC, but in both groups IRF levels were found to be within the normal limits, according to the manufacturer's normal range (0.20–0.40). This finding seems logical, taking into account the fact that there is an ongoing blood loss in IBD patients, often subclinical, as a result of chronic inflammation in the gut, thus leading to an increased "drive" for erythropoiesis in the bone marrow, even in low iron availability conditions, due to impaired iron absorption. It is worth mentioning that there are some limitations in the use of IRF; it is a non-standardized index, the reference intervals are method dependent and sensitivity is lower in non-fluorescence-based analyzers, such as the Coulter LH 780.¹⁵ This makes IRF a marker of rather limited use in anemia evaluation in IBD and this was verified by the present study.

Red blood cell Size Factor (RSF) is a parameter which connects the mean corpuscular volume (MCV) and the volume of reticulocytes (MRV), both related to erythropoietic activity and hemoglobinization. Literature about RSF is rather limited. A significant agreement between RSF and reticulocyte Hb content (ChR) has been found,¹⁴ with an excellent diagnostic performance of RSF in patients with restricted erythropoiesis, such as IDA patients, compared with those with normal erythropoiesis. In our study, the sensitivity of low RSF for diagnosis of IDA was 83% and the specificity was 82%. A strong correlation was detected between RSF and Tsat (positive correlation) and sTfR (negative correlation), while RSF was significantly lower in IDA patients, compared to non-IDA patients. We did not find any correlation between RSF and disease activity or CRP. Our data support the hypothesis that RSF seems to be a sensitive real time parameter for the early detection of the impaired erythropoietic mechanisms of functional iron deficiency, in IBD patients.

Reticulocyte distribution width (RDWR) is a new generation index which can be presented in two forms; RDWR-CV (Coefficient of Variation) and RDWR-SD (Standard Deviation).¹⁵ In our study RDWR-SD was significantly increased in IBD patients, compared to HC ($p < 0.0001$) and that was the only significant finding about this parameter, whereas RDWR-CV was significantly increased in IBD patients (compared to HC) as well as in IDA patients (compared to non-IDA group). Taking into account the strong correlation of the latter with Tsat (negative) and sTfR (positive), it seems that RDWR-CV is a sensitive index of

reticulocyte population dispersion, reflecting a "real-time" monitor of reticulocyte production, beyond the established reticulocyte count, which seems to stand for a single moment in the lifetime of reticulocytes. In a way, RDWR and reticulocyte number play a similar role for reticulocytes, as RBC count and RDW play for red blood cells. Moreover, both RDWR-SD and RDWR-CV correlated with disease activity and CRP, suggesting that they could be used in combination with others in the evaluation of anemia in IBD.

Our study has several limitations, including its cross-sectional design and the rather small number of IBD patients with anemia especially for subgroup analysis regarding the cause of anemia. For example the number of IBD patients with definite ACD was only four cases.

In conclusion, RSF and RDWR, alone or in combination with RDW and other established parameters of anemia and inflammation (Tsat, sTfR, CRP) seem very promising as new sensitive tools, providing a clinician with many data from a simple and costless full blood count. The decision to treat anemia therefore becomes more evidence based without the need for other, second line and more expensive parameters. Larger studies are needed for evaluation and standardization of these markers in order to be established in everyday clinical practice.

References

1. Gasche C. Anemia in IBD: the overlooked villain. *Inflamm Bowel Dis* 2000;6:142–50.
2. Cronin CC, Shanahan F. Anemia in patients with chronic inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2296–8.
3. Gasche C, Lomer MC, Cavill I, Weiss G. Iron, anaemia, and inflammatory bowel diseases. *Gut* 2004;53:1190–7.
4. Wells CW, Lewis S, Barton JR, Corbett S. Effects of changes in hemoglobin level on quality of life and cognitive function in inflammatory bowel disease patients. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:123–30.
5. Bergamaschi G, Di Sabatino A, Albertini R, Ardizzone S, Biancheri P, Bonetti E, et al. Prevalence and pathogenesis of anemia in inflammatory bowel disease. Influence of anti-tumor necrosis factor-alpha treatment. *Haematologica* 2010;95:199–205.
6. Gomollón F, Gibert JP. Anemia and inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2009;15:4659–65.
7. Weiss G, Gasche C. Pathogenesis and treatment of anemia in inflammatory bowel disease. *Haematologica* 2010;95:175–8.
8. Gibert JP, Gomollón F. Common misconceptions in the diagnosis and management of anemia in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2008;103:1299–307.
9. Gasche C, Berstad A, Befrits R, Beglinger C, Dignass A, Erichsen K, et al. Guidelines on the diagnosis and management of iron deficiency and anemia in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:1545–53.
10. Tsiolakidou G, Koutroubakis IE. Stimulating erythropoiesis in inflammatory bowel disease anemia. *World J Gastroenterol* 2007;13:4798–806.
11. Zhu A, Kaneshiro M, Kaunitz JD. Evaluation and treatment of iron deficiency anemia: a gastroenterological perspective. *Dig Dis Sci* 2010;55:548–59.
12. Stein J, Hartmann F, Dignass A. Diagnosis and management of iron deficiency anemia in patients with IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;7:599–610.
13. Weiss G, Goodnough LT. Anemia of chronic disease. *N Engl J Med* 2005;352:1011–23.
14. Urrechaga E. Clinical utility of the new Beckman-coulter parameter red blood cell size factor in the study of erythropoiesis. *Int J Lab Hematol* 2009;31:623–9.
15. Buttarello M, Plebani M. Automated blood cell counts. *Am J Clin Pathol* 2008;130:104–16.
16. Beckman-Coulter bulletin 9618: research use only (RUO) options for Coulter LH series hematology systems. Beckman Coulter Inc; 2006. www.beckmancoulter.com.

17. Stange EF, Travis SP, Vermeire S, Beglinger C, Kupcinkas L, Geboes K, et al. European Crohn's and Colitis Organisation. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut* 2006;55:11–15.
18. Stange EF, Travis SP, Vermeire S, Reinisch W, Geboes K, Barakauskiene A, et al. European evidence based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: definitions and diagnosis. *J Crohn's Colitis* 2008;2:1–23.
19. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, Brant SR, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a working party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol* 2005;19(Suppl A):5–36.
20. Best WR, Becktel JM, Singleton JW, Kern Jr F. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* 1976;70:439–44.
21. Walmsley RS, Ayres RC, Pounder RE, Allan RN. A simple clinical colitis activity index. *Gut* 1998;43:29–32.
22. WHO, UNICEF, UNU. Iron deficiency anemia: assessment, prevention and control. A guide for programme managers. WHO reference number: WHO/NHD/01.3 WHO publications; 2001. p. 33.
23. Wish JB. Assessing iron status: beyond serum ferritin and transferrin saturation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006;1:54–8.
24. Zimmermann MB. Methods to assess iron and iodine status. *Br J Nutr* 2008;99:52–9.
25. Kim JM, Ihm CH, Kim HJ. Evaluation of reticulocyte haemoglobin content as marker of iron deficiency and predictor of response to intravenous iron in haemodialysis patients. *Int J Lab Hematol* 2008;30:46–52.
26. David O, Grillo A, Ceoloni B, Cavallo F, Podda G, Biancotti P, et al. Analysis of red cell parameters on the Sysmex XE 2100 and ADVIA 120 in iron deficiency and in uremic chronic disease. *Scand J Clin Lab Invest* 2006;66:113–20.
27. Cakal B, Akoz AG, Ustundag Y, Yalinkilic M, Ulker A, Ankarali H. Red cell distribution width for assessment of activity of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2009;54:842–7.
28. Clarke K, Sagunathy R, Kansal S. RDW as an additional marker in inflammatory bowel disease/undifferentiated colitis. *Dig Dis Sci* 2008;53:2521–3.
29. van Zeben D, Bieger R, van Wermeskerken RK, Castel A, Hermans J. Evaluation of microcytosis using serum ferritin and red blood cell distribution width. *Eur J Haematol* 1990;44:106–9.
30. Briggs C. Quality counts: new parameters in blood cell counting. *Int J Lab Hematol* 2009;31:277–97.

Soluble transferrin receptor-ferritin index in the evaluation of anemia in inflammatory bowel disease: a case-control study

Pantelis Oustamanolakis^a, Ioannis E. Koutroubakis^a, Ippokratis Messaritakis^b, Maria Niniraki^c, Elias A. Kouroumalis^a

University Hospital Heraklion, Crete, Greece

Abstract

Background No reliable biochemical markers exist for the differentiation between iron deficiency anemia (IDA) and anemia of chronic disease (ACD) in the setting of inflammatory bowel disease (IBD). The aim of this study was to investigate the use of soluble transferrin receptor (sTfR) and sTfR-ferritin (sTfR-F) index in the evaluation of anemia in patients with IBD.

Methods One hundred IBD patients [49 ulcerative colitis (UC), 51 Crohn's disease (CD)] and 102 healthy controls were enrolled. Serum levels of ferritin, transferrin saturation and sTfR were analyzed in all patients and controls. sTfR-F index was calculated based on the ratio: sTfR/ \log_{10} ferritin. The value of sTfR and sTfR-F for diagnosis of IDA was assessed.

Results Forty two IBD patients (41% of UC and 42.9% of CD) fulfilled the WHO criteria for the diagnosis of anemia. Among them thirty (30%) had IDA, four (4%) had ACD and eight (8%) had mixed IDA/ACD. Patients with IDA had significantly higher sTfR and sTfR-F index levels compared with those without IDA ($P < 0.0001$). Both sTfR and sTfR-F index were not correlated with CRP levels or disease activity. High sTfR levels (> 1.8 mg/L) had sensitivity 81% and specificity 80%, whereas high sTfR-F index (> 1.4) had sensitivity 91% and specificity 92% for the diagnosis of IDA.

Conclusion These results suggest that the sTfR-F index seems to be very efficient in the detection and diagnosis of IDA, among patients with IBD.

Keywords anemia, Crohn's disease, ferritin, iron deficiency, ulcerative colitis

Ann Gastroenterol 2011; 24 (2): 108-114

Introduction

The pathophysiological background of anemia in patients with inflammatory bowel disease (IBD) has been established to represent two main types: iron deficiency anemia (IDA) and anemia of inflammation, or anemia of chronic disease (ACD), with the former being the most prevalent and common [1,2].

Many IBD patients present with a mixed-type anemia, where both types participate to a variable extent, due to the ongoing inflammation which takes place in the level of enterocyte, even in patients in clinical and biochemical remission [3,4]. This mixed-type anemia is one of the most frequent and difficult clinical problems to diagnose and treat for the IBD practitioner, due to the difficulty to determine the extent to which each type is responsible for the final clinical setting in the individual patient [5]. Unfortunately, conventional biochemical markers for the evaluation of iron status, such as ferritin and transferrin, in these patients are frequently unreliable, because they are influenced by the presence of inflammation and therefore not useful in the diagnosis of anemia in the case of IBD. On the other hand, a variety of new generation indices (hepcidin, percentage of hypochromic red cells, reticulocyte hemoglobin concentration, immature reticulocyte fraction, red blood cell size factor and reticulocyte distribution width) are under investigation in the literature and some of them seem very promising in the evaluation of anemia in patients with IBD [6,7].

^aDepartment of Gastroenterology (Pantelis Oustamanolakis, Ioannis E. Koutroubakis, Elias A. Kouroumalis);

^bLaboratory of Hematology (Ippokratis Messaritakis);

^cLaboratory of Immunology (Maria Niniraki); University Hospital Heraklion, Crete, Greece

Conflict of Interest: None

Correspondence to: Ioannis E. Koutroubakis MD, PhD
Assistant Professor of Medicine Dept of Gastroenterology,
University Hospital Heraklion P.O. BOX 1352, 71110 Heraklion,
Crete, Greece; Tel: +302810392253; Fax: +302810542085;
e-mail: ikoutroub@med.uoc.gr

Received 28 February 2011; accepted 6 April 2011

Soluble transferrin receptor (sTfR) is a truncated form of the cellular transferrin receptor, without its transmembrane and cytoplasmic domains, and circulates bound to transferrin [8]. The number of sTfR reflects the cellular requirements for iron, and varies with the function and the morphological development of each cell type. In IDA the numbers of sTfR increase significantly, whereas the serum concentration of sTfR is an indicator of the iron supply available for erythropoiesis; sTfR reflects erythropoiesis and inversely correlates with the amount of iron available for erythropoiesis [9-11]. It seems that sTfR is not influenced by chronic or acute inflammation; therefore it could be a more reliable index in diagnosing IDA in patients with IBD [9,12]. There is a growing amount of literature concerning the role of the sTfR/ferritin or sTfR/log ferritin ratio (sTfR-F index) in the evaluation of anemia in patients with chronic inflammatory diseases, especially diagnosing IDA in the setting of chronic inflammation or discriminating iron deficiency in the absence of anemia [11,13]. It seems that the sTfR-F index has a higher diagnostic power than either sTfR or ferritin alone [14]. To the best of our knowledge, there is as yet no study in the literature evaluating the sTfR-F index in patients with IBD.

The aim of this study was to investigate the clinical usefulness of the sTfR-F index in the evaluation of anemia in patients with IBD and especially for differentiation between IDA and ACD.

Materials and Methods

Patients

One hundred consecutive IBD patients followed up at the Gastroenterology Department of the University Hospital of Heraklion were included in the study. They were compared with 102 healthy controls (HC) of similar age. The main demographic and clinical parameters of the patients and HC are shown in Table 1. HC were all recruited from healthy blood donors, with no significant medical history or family history of IBD. All patients and controls were of Caucasian origin. Patients with hemoglobinopathy or thalassemia trait, history of GI bleeding, renal insufficiency or hematologic, liver and autoimmune disorders, malignancy, chemotherapy or radiotherapy, as well as females with ongoing pregnancy or recent delivery (<12 months from the study initiation) were excluded from the study. Finally, none of the patients or HC had received blood transfusion or treatment with iron or erythropoietin during the last three months, before the study initiation.

Diagnosis of ulcerative colitis (UC) and Crohn's Disease (CD) was based on latest European Crohn's and Colitis Organization (ECCO) criteria [15,16], while the Montreal classification [17] was used for disease phenotyping. Disease activity was calculated at the time of blood collection; for CD patients, the CDAI score [18] was used for dividing them into two groups: "Active" with CDAI>150 and "Inactive" with CDAI<150. In UC patients, the Simple Clinical Colitis Activity Index (SCCAI) [19] was used for evaluation of disease

activity and "Active" disease was considered with a score of 3 or more. Serum CRP levels were also used as a marker of evaluation of disease activity. Definition of anemia was based on the established WHO criteria of hemoglobin <12 g/dL and <13 g/dL, for non-pregnant women and for men respectively [20]. None of the healthy controls was anemic.

Informed consent was obtained from all patients, the study protocol conformed to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki (6th revision, 2008) and was approved by the Ethics Committee of the Medical Faculty of Crete.

Laboratory studies

Whole blood samples were collected from patients and HC for a full blood count and erythrocyte sedimentation rate (ESR) measurement at the time of collection. All full blood counts were processed using the COULTER[®] LH780 Hematology Analyzer (Beckman Coulter, Inc., CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Serum samples were separated at the same time by centrifugation at room temperature for measurement of the following laboratory parameters: C-reactive protein (CRP), iron (Fe), ferritin (Fer), transferrin (TRF), and transferrin saturation (Tsat). All measurements were processed according to standard laboratory practice. sTfR was measured by commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (R&D Systems, Minneapolis, USA). sTfR-F index was calculated based on the ratio: sTfR/log₁₀ ferritin.

Statistical analysis

All results are expressed as means ± standard deviation or median presented together with the interquartile range (IQR: 25th percentile, 75th percentile). Comparisons among the three diagnostic groups in terms of continuous measurements were made by the Kruskal-Wallis test (nonparametric ANOVA). Post hoc multiple comparisons tests were made by Dunnett's test. Comparisons between two groups were made by either the Student's t-test or Mann-Whitney U test. Kolmogorov and Smirnov test was used to assess the assumption that data were sampled from populations that follow the Gaussian distributions. The association between sTfR or sTfR-F index and other serum markers as well as with clinical parameters was examined by non parametric correlation (Spearman's *r*). The sensitivity, specificity and positive and negative predictive values were estimated to assess the validity of these markers in diagnosing IDA. All statistical calculations were processed using the MedCalc software package (MedCalc software, Belgium). A level of P <0.05 was considered statistically significant.

Results

Forty-two IBD patients (41% of UC and 42.9% of CD) fulfilled the WHO criteria for the diagnosis of anemia. Among

Table 1 Demographic and clinical characteristics of the patients and controls included in the study

| | UC | CD | IBD total | HC |
|---------------------------------------|--------------|---------------|------------|------------|
| Number | 49 (49%) | 51 (51%) | 100 | 102 |
| Mean age (years SD) | 50.1±14.9 | 48.2± 16.9 | 49.1± 15.9 | 45.5 ±10.1 |
| Male | 32 (65.3%) | 26 (51%) | 58 (58%) | 82 (80.4%) |
| Female | 17 (34.7%) | 25 (49%) | 42 (42%) | 20 (19.6%) |
| Current smokers | 9 (18.4%) | 21 (41.2%) | 30 (30%) | 58 (56.9%) |
| Disease activity | | | | |
| Active | 11 (22.4%) | 9 (17.6%) | 20 (20%) | |
| Inactive | 38 (77.6%) | 42 (82.4%) | 80 (80%) | |
| Median disease duration* (years, IQR) | 8.0 (5-15.7) | 10.0 (4-16.3) | 9.0 (4-16) | |
| Disease localization | | | | |
| Proctitis(UC)/Ileum(CD) | 14 (28.6%) | 21 (41.2%) | | |
| Left-sided(UC)/Colon(CD) | 23 (46.9%) | 13 (25.5%) | | |
| Extensive(UC)/Ileum+Colon(CD) | 12 (24.5%) | 16 (31.4%) | | |
| Upper GI involvement | | 1 (1.9%) | | |
| Disease type (CD) | | | | |
| Stenotic | | 11 (21.6%) | | |
| Fistulizing | | 8 (15.7%) | | |
| Inflammatory | | 32 (62.7%) | | |
| Perianal disease | | 6 (11.8%) | | |
| Extraintestinal manifestations | 7 (14.3%) | 26 (51%) | 33 (33%) | |
| Current treatment | | | | |
| Salazopyrine | 7 | 9 | 16 | |
| 5-ASA | 41 | 19 | 60 | |
| Oral steroids | 2 | 16 | 18 | |
| Azathioprine | 10 | 21 | 31 | |
| Methotrexate | 3 | 4 | 7 | |
| Infliximab | 2 | 10 | 12 | |
| Metronidazole | 0 | 6 | 6 | |

*not normally distributed

CD, Crohn's disease; HC, healthy controls; UC, ulcerative colitis; 5-ASA, 5-amino salicylic acid; SD, standard deviation; IQR, Interquartile range

them thirty (30%) had IDA (ferritin<30 µg/L and Tsat<16%), 4 (4%) had ACD (ferritin >100 µg/L and Tsat<16%) and 8 (8%) mixed IDA/ACD (ferritin: 30-100 µg/L and Tsat<16%).

Table 2 shows the measured laboratory parameters of UC and CD patients compared with healthy controls. Significant differences concerning all examined parameters (hemoglobin, MCV, ferritin, Tsat, sTfR, sTfR-F index, CRP and ESR) between both UC and CD patients and healthy controls were observed.

No differences between UC and CD were found. Ferritin levels significantly correlated with CRP levels ($r=0.19$, $P=0.04$) but did not correlate with clinical indices of disease activity.

Patients with IDA had significantly higher sTfR levels compared with those without IDA (patients with other causes of anemia and patients without anemia) [median 2.6 mg/L (range 1.2-6.8 mg/L) vs. 1.2 mg/L (0.7-3.1 mg/L), $P<0.0001$] (Fig. 1). Similarly, patients with IDA had significantly higher

Table 2 Laboratory data of IBD patients included in the study compared with healthy controls

| Parameter | UC | CD | HC | p |
|-------------------------------|-------------------|------------------|-------------------|---------|
| Mean ± SD | | | | |
| Hemoglobin (g/dL) | 13.1 ± 2.0 | 12.6 ± 1.9 | 15.0 ± 1.2 | <0.0001 |
| MCV (fl) | 86.4 ± 8.1 | 87.6 ± 11.0 | 90.1 ± 5.5 | 0.01 |
| Ferritin* (µg/L, median, IQR) | 42.1 (22.1-106.4) | 33.4 (14.4-80.8) | 71.0 (36.2-121.1) | 0.003 |
| Tsat (%) | 20.4 ± 10.6 | 16.9 ± 12.8 | 32.2 ± 15.1 | <0.0001 |
| sTfR* (mg/L, median, IQR) | 1.3 (1.1-2.0) | 1.4 (1.1-1.9) | 1.1 (0.9-1.2) | <0.0001 |
| sTfR-F* (median, IQR) | 0.9 (0.6-1.3) | 0.9 (0.6-1.7) | 0.6 (0.5-0.8) | <0.0001 |
| CRP* (mg/dL, median, IQR) | 0.37 (0.32-0.77) | 0.39 (0.32-1.4) | 0.29 (0.29-0.32) | <0.0001 |
| ESR (mm/h) | 22.8 ± 19.2 | 28.0 ± 16.2 | 6.9 ± 5.7 | <0.0001 |

*not normally distributed

CD, Crohn's disease; HC, healthy controls; UC, ulcerative colitis; MCV, Mean corpuscular volume; Tsat, transferrin saturation; sTfR, soluble transferrin receptor; sTfR-F, soluble transferrin receptor-ferritin index; CRP, C-reactive protein; IQR, interquartile range; ESR, Erythrocyte Sedimentation Rate.

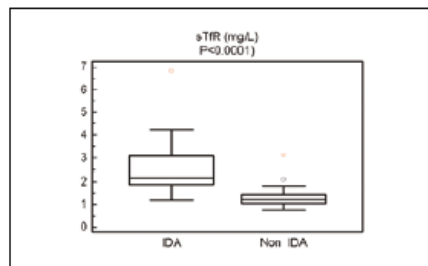


Figure 1 Distribution of soluble transferrin receptor (sTfR) levels in patients with inflammatory bowel disease (IBD) and iron deficiency anemia (IDA, n=30) and IBD patients without IDA (Non IDA, n=70). Boxes indicate the interquartile range with median value. Bars show the 5th and 95th percentiles.

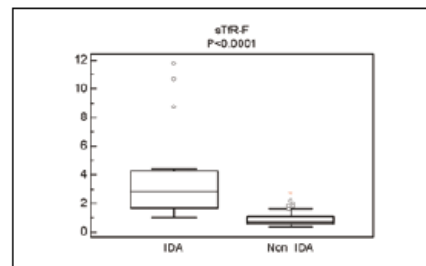


Figure 2 Distribution of soluble transferrin receptor-ferritin (sTfR-F) index in patients with inflammatory bowel disease (IBD) and iron deficiency anemia (IDA, n=30) and IBD patients without IDA (Non IDA, n=70). Boxes indicate the interquartile range with median value. Bars show the 5th and 95th percentiles.

sTfR-F index compared with those without IDA [2.9 (1.0-11.8) vs. 0.7 (0.4-2.8), $P < 0.0001$] (Fig. 2). Moreover, IBD patients with IDA had significantly higher sTfR and sTfR-F index levels compared with IBD patients with ACD (including mixed IDA/ACD) ($P < 0.0001$).

The ability of sTfR and sTfR-F index to identify IDA among IBD patients with anemia compared to IBD patients without anemia was examined by means of receiver operating characteristic (ROC) analysis (Fig. 3). The sensitivity of high sTfR levels for diagnosis IDA using a cutoff of 1.8 mg/L was 81%, the specificity was 80%, whereas positive predictive value was 63% and negative predictive value was 91%. The sensitivity of high sTfR-F index for diagnosis IDA using a cutoff of 1.4 was 91% and the specificity was 92%, whereas positive predictive value was 83% and negative predictive value was 96%.

No correlation between sTfR or sTfR-F index and CRP levels was found ($r = 0.03$, $P = 0.77$ and $r = 0.01$, $P = 0.28$ respectively). Moreover, there were no significant associations between

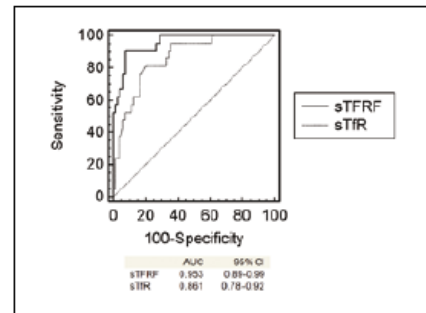


Figure 3 Receiver operating characteristic (ROC) curves for soluble transferrin receptor (sTfR) and sTfR-ferritin (sTfR-F) index, in the diagnosis of iron deficiency anemia in patients with inflammatory bowel disease

sTfR or sTfR-F index and other clinical characteristics of the patients (sex, age, smoking status, disease duration, disease activity, extraintestinal manifestations and use of medications including biological therapy).

Discussion

There is a substantial difficulty in the interpretation of the iron status indices in patients with IBD, because of the presence of a continuous inflammatory process, which interferes with the value of some established markers, such as ferritin and transferrin. Therefore, the need for more convenient markers, which could more reliably differentiate the group of patients with IDA, has made researchers develop new parameters for this purpose. sTfR seems particularly useful for diagnosis of IDA in patients with infection, inflammation or malignancy where serum ferritin is not a good indicator of iron deficiency [21]. Unlike ferritin and transferrin, chronic inflammation and hepatic damage have no effect on sTfR, which should make them a more reliable parameter than serum ferritin for diagnosing IDA in patients with IBD [9,12].

In this study we evaluated the accuracy of the sTfR-F index in diagnosing IDA in patients with IBD. This is the first study evaluating the sTfR-F index in this group of patients. We found that both sTfR and sTfR-F index were significantly increased in patients with CD and UC, compared with HC. Patients with IDA had significantly higher sTfR and sTfR-F index levels compared with those without IDA (patients with other causes of anemia and patients without anemia). Moreover, IBD patients with IDA had significantly higher sTfR and sTfR-F index levels compared with IBD patients with ACD (including mixed IDA/ACD). High sTfR-F index (>1.4) had a better discriminating power (sensitivity 91%, specificity 92%) than high sTfR levels (>1.8 mg/L) (81% & 80% respectively) in the diagnosis of IDA.

Our results seem to be in accordance with the literature about sTfR-F index, although there are few published reports. A high diagnostic power of sTfR or sTfR-F index for differentiating IDA from ACD and mixed anemia has been suggested by several studies in various groups of patients [12, 14, 22-24]. The sTfR-F index has been suggested to be able to differentiate more accurately between IDA and ACD or to assess the iron status in patients with mixed type anemia [11]. In a study with 96 patients with rheumatoid arthritis [25], the results indicated that sTfR-F index could be used to help differentiate coexisting IDA in patients with ACD. ROC analysis showed a higher discriminating power of sTfR-F index vs. sTfR in the diagnosis of iron deficiency anemia, as well as in the differential diagnosis between IDA and ACD. Vazquez Lopez *et al* [26] reported a significantly increased sTfR-F index in children with storage iron deficiency, compared to healthy children with normal iron

status, presenting an AUC of 0,96 for this index and sensitivity and specificity of 89% and 96% respectively, with 90% PPV and 94% NPV for discriminating IDA, when the index was >2. In another study [27] the above ratio is suggested as a useful alternative in assessment of the iron status in patients with mixed type anemia. In a study of 177 patients with selected chronic diseases [28], sTfR-F index showed 100% sensitivity and specificity, at a cutoff value of >1.62, to detect IDA. On the other hand there are reports showing that the calculation of the index did not improve the diagnostic accuracy of sTfR alone [29, 30]. In another large study with 337 anemic patients, a cutoff value of 2.5 for the sTfR-F index, showed 87% sensitivity and 96% specificity for predicting IDA, with an AUC 0.97, whereas the combination of this index with the reticulocyte hemoglobin equivalent provided the highest sensitivity and specificity [31]. Summarizing the results from three previous studies, it seems that sTfR-F has a sensitivity range from 50 to 94% and specificity range from 96.1 to 100%, with cutoff values from 1.2 to 2.5 [14,25,32].

One of the most important advantages of the sTfR-F index is that it is independent of the inflammatory status, also confirmed by our study, taking into account that no correlation was found between this index and CRP levels or disease activity. This is not unexpected, since in the literature there are no differences in the sTfR-F index between patients with ACD and HC, whereas differences between IDA groups and HC are statistically significant.

One limitation of our study is the rather small number of patients with ACD (4%) and mixed IDA/ACD (8%), which could decrease the detection rate of these patients, as far as all the indices are concerned. Moreover, the group of HC had a significantly higher ratio of male/female compared with the group of IBD patients. The higher number of females in IBD group could influence the results due to the possible influence of menstruation on the parameters of iron deficiency. Another limitation is the rather small number of patients with active disease not allowing for firm conclusions with respect to the role of disease activity on sTfR-F index.

Regarding sTfR measurement, it should be mentioned that there are certain disadvantages. The assay is not widely available; it remains expensive and is not standardized among different laboratories [33].

In conclusion, our results suggest that the sTfR-F index seems to be very efficient in the detection and diagnosis of IDA, among patients with IBD. Its detection rate is higher than sTfR alone and of course higher than the other existing markers. It is essential to mention that the clinical use of this index rather adds to the value of other established markers, such as ferritin, transferrin and Tsat, than replaces them in the diagnosis of IDA. Therefore, sTfR-F index could be proposed as an additional parameter, which can improve the diagnosis of iron deficiency anemia in patients with IBD. This remains to be confirmed with other larger studies.

Summary Box:**What is already known:**

- No reliable biochemical markers exist for the differentiation between iron deficiency anemia (IDA) and anemia of chronic disease (ACD) in the setting of inflammatory bowel disease (IBD).
- There is evidence that soluble transferrin receptor (sTfR) is not influenced by chronic or acute inflammation.
- Literature data suggest that sTfR-ferritin (sTfR-F) index has a high diagnostic power in the diagnosis of IDA.

What the new findings are:

- High sTfR-F index has a better discriminating power than high sTfR levels in the diagnosis of IDA.
- sTfR-F index is a very efficient marker for the detection and diagnosis of IDA among patients with IBD
- sTfR-F index could be proposed as an addition to the established markers for the diagnosis of IDA in patients with IBD.

Acknowledgement

We would like to thank Prof. J. Damilakis for his help in the statistical analysis of the data.

References

1. Gasche C, Lomer M C E, Cavill I, Weiss G. Iron, anemia, and inflammatory bowel diseases. *Gut* 2004;53:1190-1197.
2. Bergamaschi G, Di Sabatino A, Albertini R, et al. Prevalence and pathogenesis of anemia in inflammatory bowel disease. Influence of anti-tumor necrosis factor- α treatment. *Haematologica* 2010;95:199-205.
3. Gomollón F, Gisbert JP. Anaemia and inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2009;15:4659-4665.
4. Weiss G, Gasche C. Pathogenesis and treatment of anemia in inflammatory bowel disease. *Haematologica* 2010;95:175-178.
5. Gasche C, Berstad A, Befrits R, et al. Guidelines on the diagnosis and management of iron deficiency and anemia in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:1545-1553.
6. Oustamanolakis P, Koutroubakis IE, Messaritakis I, Malliaraki N, Sfridakis A, Kouroumalis EA. Serum hepcidin and prohepcidin concentrations in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011;23:262-268.
7. Oustamanolakis P, Koutroubakis IE, Messaritakis I, Kefalogiannis G, Nimiraki M, Kouroumalis EA. Measurement of reticulocyte and red blood cell indices in the evaluation of anemia in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis*, in press.
8. Shih YJ, Baynes RD, Hudson BG, Flowers CH, Skikne BS, Cook JD. Serum transferrin receptor is a truncated form of tissue receptor. *J Biol Chem* 1990;265:19077-19081.
9. Stein J, Hartmann F, Dignass AU. Diagnosis and management of iron deficiency anemia in patients with IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;7:599-610.
10. Clark SF. Iron deficiency anemia: diagnosis and management. *Curr Opin Gastroenterol* 2009;25:122-128.
11. Thomas L, Thomas C. Anemia in iron deficiency and disorders of iron metabolism. *Dtsch Med Wochenschr* 2002;127:1591-1594.
12. Wish JB. Assessing iron status: beyond serum ferritin and transferrin saturation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006;1:S4-S8.
13. Weiss G, Goodnough LT. Anemia of chronic disease. *N Engl J Med* 2005;352:1011-1023.
14. Punnonen K, Irfala K, Rajamaki A. Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency. *Blood* 1997;89:1052-1057.
15. Stange EF, Travis SP, Vermeire S, et al; European Crohn's and Colitis Organisation. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut* 2006;55:1-15.
16. Stange EF, Travis SP, Vermeire S, et al for the European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO). European evidence based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: Definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis* 2008;2:1-23.
17. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol* 2005;19 (Suppl A):5-36.
18. Best WR, Becktel JM, Singleton JW, Kern F, Jr. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* 1976;70:439-444.
19. Walmsley RS, Ayres RC, Pounder RE, Allan RN. A simple clinical colitis activity index. *Gut* 1998;43:29-32.
20. WHO, UNICEF, UNU. Iron Deficiency Anemia: Assessment, Prevention and Control. A guide for programme managers. WHO reference number: WHO/NHD/01.3, WHO publications, 2001, p33.
21. Jayarane S, Sthaneshwar P. Serum soluble transferrin receptor in hypochromic microcytic anaemia. *Singapore Med J* 2006;47:138-142.
22. Genc S, Erten N, Karan MA, et al. Soluble transferrin receptor and soluble transferrin receptor-ferritin index for evaluation of the iron status in elderly patients. *Tohoku J Exp Med* 2004;202:135-142.
23. Matsuda A, Bessho M, Mori S, et al. Diagnostic significance of serum soluble transferrin receptors in various anemic diseases: the first multi-institutional joint study in Japan. *Haematologica* (Budap) 2002;32:225-238.
24. Lee EJ, Oh EJ, Park YJ, Lee HK, Kim BK. Soluble transferrin receptor (sTfR), ferritin, and sTfR/log ferritin index in anemic patients with nonhematologic malignancy and chronic inflammation. *Clin Chem* 2002;48:1118-1121.
25. Margetic S, Topic E, Ruzic DF, Kvaternik M. Soluble transferrin receptor and transferrin receptor-ferritin index in iron deficiency anemia and anemia in rheumatoid arthritis. *Clin Chem Lab Med* 2005;43:326-331.
26. Vázquez-López MA, Carracedo A, Lendinez F, Muñoz FJ, López J, Muñoz A. The usefulness of serum transferrin receptor for discriminating iron deficiency without anemia in children. *Haematologica* 2006;91:264-265.
27. Koulaouzidis A, Said E, Cottier R, Saeed AA. Soluble transferrin receptors and iron deficiency, a step beyond ferritin. A systematic review. *J Gastrointest Liver Dis* 2009;18:345-352.
28. Park G, Park CY, Jang SJ, Moon DS, Park SM, Park YJ. Soluble transferrin receptor-ferritin index and estimated body iron in iron-deficiency anemia in "select" chronic diseases. *Ann Hematol* 2009;88:913-915.

29. Marković M, Majkić-Singh N, Ignjatović S, Singh S. Reticulocyte haemoglobin content vs. soluble transferrin receptor and ferritin index in iron deficiency anaemia accompanied with inflammation. *Int J Lab Hematol* 2007;**29**:341-346.
30. Marković M, Majkić-Singh N, Subota V. Usefulness of soluble transferrin receptor and ferritin in iron deficiency and chronic disease. *Scand J Clin Lab Invest* 2005;**65**:571-576.
31. Leers MP, Keuren JF, Oosterhuis WP. The value of the Thomas-plot in the diagnostic work up of anemic patients referred by general practitioners. *Int J Lab Hematol* 2010;**32**:572-581.
32. Chang J, Bird R, Clague A, Carter A. Clinical utility of serum soluble transferrin receptor levels and comparison with bone marrow iron stores as an index for iron-deficient erythropoiesis in a heterogeneous group of patients. *Pathology* 2007;**39**:349-353.
33. Beguin Y. Soluble transferrin receptor for the evaluation of erythropoiesis and iron status. *Clin Chim Acta* 2003;**329**:9-22.

Safety and Efficacy of Total-Dose Infusion of Low Molecular Weight Iron Dextran for Iron Deficiency Anemia in Patients with Inflammatory Bowel Disease

Ioannis E. Koutroubakis · Pantelis Oustamanolakis ·
Christos Karakoidas · Gerassimos J. Mantzaris ·
Elias A. Kouroumalis

Received: 7 August 2009 / Accepted: 30 September 2009 / Published online: 16 October 2009
© Springer Science+Business Media, LLC 2009

Abstract

Background Intravenous iron has been suggested as a safe and effective treatment of anemia complicating inflammatory bowel disease (IBD). Low molecular weight (LMW) iron dextran has the ability to administer the patient's total iron requirement in a single infusion.

Aims The aim of this study was to assess the safety and efficacy of the total dose of LMW iron dextran infusion for the treatment of iron deficiency in IBD.

Methods Fifty IBD patients (27 female, 35 Crohn's disease, 15 ulcerative colitis) were included in the study. Mean \pm standard deviation (SD) hemoglobin and ferritin levels before the infusion were 9.88 ± 1.42 g/dl and 13.9 ± 10.9 ng/ml, respectively. A 25-mg test dose was followed by infusion of the total dose of LMW iron dextran based on the iron deficit. Several clinical and laboratory parameters were measured before and on week 4 after infusion.

Results Four patients (8%) developed adverse reactions during the test infusion and did not receive the total-dose infusion. Only one patient developed an allergic reaction during the total-dose infusion. In the remaining 45 patients, the mean \pm SD iron dose that was given was $1,075 \pm 269$ mg. The mean \pm SD elevation of hematocrit and hemoglobin on week 4 was $4.9 \pm 1.9\%$ and 1.7 ± 0.8 g/dl, respectively. Hematopoietic response was observed in 23 of 45 patients (51.1%).

Conclusion Total parenteral iron replacement with LMW iron dextran is an easy, safe, and effective alternative method for treating iron deficiency anemia in IBD. Harmless adverse reactions may develop in a minority of patients.

Keywords Anemia · Crohn's disease · Infusions · Iron deficiency anemia · Ulcerative colitis

I. E. Koutroubakis (✉) · P. Oustamanolakis ·
E. A. Kouroumalis
Department of Gastroenterology, University Hospital Heraklion,
P.O. Box 1352, 71110 Heraklion, Crete, Greece
e-mail: ikoutroub@med.uoc.gr; ktjohn@her.forthnet.gr

P. Oustamanolakis
e-mail: pantelis@vodafone.net.gr

E. A. Kouroumalis
e-mail: kouroum@med.uoc.gr

C. Karakoidas · G. J. Mantzaris
1st Department of Gastroenterology, Evangelismos Hospital
Athens, Athens, Greece

C. Karakoidas
e-mail: ChKarako@otenet.gr

G. J. Mantzaris
e-mail: gman195@yahoo.gr

Introduction

Anemia is a common and important complication of inflammatory bowel disease (IBD), associated with a decrease in quality of life and increased rate of hospitalization [1, 2]. The correction of anemia has recently been highlighted as a specific therapeutic goal [3, 4]. Although the cause of anemia in IBD is multifactorial, it is usually due to iron deficiency. Therefore, treatment with iron supplementation is important and it should be initiated when iron deficiency anemia is present.

Recent guidelines suggest that iron supplementation should be preferably administered intravenously in IBD, even though many patients will respond to the oral administration of iron [5]. This is because oral iron is limited by poor absorption, intolerance, and induction of

oxidative stress at the site of bowel inflammation [1, 3]. Moreover, the intravenous route is faster, easier, better tolerated, and effective, improving patients' quality of life to a greater extent than oral iron supplementation. Several studies have shown that intravenous iron sucrose is a safe and effective treatment of anemia complicating IBD [6–10]. However, it has the disadvantage of repeated infusions.

Low molecular weight (LMW) iron dextran has a high complex stability and the ability to infuse patients' total iron requirements in a single administration (total-dose infusion). The infusion of total-dose intravenous (TDI) iron dextran has been evaluated in iron deficiency anemia [11], as well as in anemia associated with chronic kidney disease [12–15] and pregnancy [16]. The results of these studies showed significant increase of hemoglobin levels after treatment with TDI of LMW iron dextran without significant adverse events. Moreover, Auerbach et al., prospectively comparing three regimens of intravenous iron dextran in hemodialysis patients, found that TDI of iron dextran is safe, convenient, less expensive, and as efficacious as divided-dose infusions [12]. In pediatric IBD patients, TDI iron dextran has been suggested as an effective and safe treatment [17], although two different preparations of both high and low molecular weight iron dextran were used. TDI of LMW iron dextran has not been investigated in anemic adult IBD patients.

The aim of this study was to assess the safety and efficacy of TDI of LMW iron dextran for the treatment of iron deficiency anemia in adult patients with IBD.

Methods

Patients

Fifty patients with IBD were investigated at two centers in Greece. All patients had confirmed diagnosis of ulcerative colitis or Crohn's disease according to established criteria [18]. Moreover, they were assessed by their physicians as having refractory anemia to previous treatments. Eligible were patients aged 14–69 years with anemia and intolerance or no response to oral iron, those with hemoglobin concentrations below 10.0 or 11.0 g/dl for females or males, respectively, or those with active disease and intestinal bleeding. The median age of our patients was 33 years. Thirty-six (72%) of the patients had poor response or intolerance to previous treatment with oral iron. Nine patients (18%) had a history of blood transfusion for the treatment of anemia. The demographic and clinical characteristics of patients included in the study are shown in Table 1. Disease activity in Crohn's disease was evaluated at baseline and at the end of therapy using the

Table 1 Patient demographic and clinical parameters

| | UC | CD | Total |
|-------------------------------------------|-----|-----|-------|
| Number | 15 | 35 | 50 |
| Male | 8 | 15 | 23 |
| Female | 7 | 20 | 27 |
| Active | 6 | 16 | 22 |
| Inactive | 9 | 19 | 28 |
| Mean disease duration (years) | 8.4 | 7.9 | |
| Disease location | | | |
| Proctitis (UC)/ileum (CD) | 1 | 9 | |
| Left sided colitis (UC)/colonic (CD) | 6 | 8 | |
| Extensive colitis (UC)/ileum + colon (CD) | 8 | 18 | |
| Disease behavior (CD) | | | |
| Stenosing | | 10 | |
| Fistulizing | | 9 | |
| Inflammatory | | 16 | |
| Current treatment ^a | | | |
| Steroids | 4 | 8 | 12 |
| Azathioprine | 1 | 8 | 9 |
| Infliximab | 1 | 5 | 6 |
| Adalimumab | 0 | 3 | 3 |
| Salazopyrin or 5-aminosalicylic acid | 13 | 12 | 25 |

^a Some patients received more than one drug

CD Crohn's disease; UC ulcerative colitis

Crohn's disease activity index (CDAI) [19] and in ulcerative colitis by the simple clinical colitis activity index (SCCAI) [20]. Patients were excluded from the study if they had untreated vitamin B12 or folate deficiency, other types of anemia, red blood cell transfusion or erythropoietin treatment within 12 weeks before screening, asthma or eczema, acute or chronic infection, clinically evident congestive heart failure or ischemic heart disease, previously diagnosed HIV or HBV infection, and clinical evidence of current malignancy.

All patients gave written informed consent for participation in the study; the Ethics Committee of the Medical Faculty of Crete approved the protocol of the study.

Administration of the Iron and Measurements

All patients received a 25-mg iron dextran test dose (over a period of 15 min) prior to whole-dose infusion. In case of a negative test, the total dose of LMW iron dextran, with a maximum dose of 20 mg/kg, was infused intravenously over 4–6 h. The total dose of iron was calculated according to iron deficit using the Ganzoni's formula [21]: total iron deficit (mg) = [body weight (kg) × (target hemoglobin – actual hemoglobin g/dl) × 0.24] + 500.

A hematopoietic response was defined as an increase in hemoglobin of or above 2.0 g/dl.

Clinical assessment, an adverse event check, hematological parameters, and other routine laboratory tests, including serum ferritin, transferrin saturation (TSAT), and C-reactive protein (CRP), were monitored at baseline and on week 4.

Statistical Analysis

The comparison of laboratory data at baseline and after treatment was made by paired *t*-tests. The Kolmogorov–Smirnov test was used to assess the assumption that data were sampled from populations that follow Gaussian distributions. A level of $P < 0.05$ was considered to be statistically significant. Fisher's exact test was used to detect differences between responders and non-responders in terms of possible predictive factors. All analyses were two-tailed and conducted using the computer-based statistics software program InStat version 3.0 (GraphPad Software, Inc.).

Results

The indications for administering intravenous LMW iron dextran instead of oral iron were as follows: poor response (11) and/or intolerance (7) of oral iron supplementation, malabsorption (4), active disease, intestinal bleeding (8), or a combination of these indications (20). In ten cases (20%), premedication with 125 mg intravenous methylprednisolone was given. Our patients received a total iron dose ranging from 800 to 1,600 mg.

The laboratory data of all treated patients at baseline and after treatment with LMW iron dextran are shown in Table 2. The mean hemoglobin (Hb) concentrations increased from 9.88 ± 1.42 to 11.60 ± 1.29 g/dl. All patients showed an increase in the levels of hemoglobin after treatment and the difference between the mean hemoglobin levels at baseline and after treatment was statistically significant ($P < 0.0001$). However, a

hematopoietic response was observed in only 23 of 45 patients (51.1%) on week 4 post-treatment.

Treatment resulted in a significant increase in the mean corpuscular volume (MCV) levels (74.6 ± 9.9 at baseline to 79.9 ± 8.7 after treatment, $P = 0.008$). The mean ferritin levels and the mean TSAT were also significantly increased from 13.9 ± 10.9 ng/ml and $11.2 \pm 9.0\%$ at baseline to 145.6 ± 112.7 ng/ml and $24.5 \pm 11.6\%$, respectively, at the end of therapy ($P < 0.0001$). In contrast, no significant changes were seen in the mean CRP and erythrocyte sedimentation rate (ESR) levels at the end of therapy compared with baseline ($P = 0.65$ and $P = 0.09$, respectively).

Analysis of the baseline characteristics of responders versus non-responders did not reveal any statistically significant differences. However, there was a trend for better response in active disease, in patients with higher CRP levels, and in patients under therapy with infliximab or adalimumab.

Four cases (8%) developed adverse reactions, including nausea (3), dyspnea (2), chest pain (1), and tachycardia (1), during administration of the test dose of LMW iron dextran, and they did not receive the total-dose infusion. Only one anaphylactoid reaction (itching and urticaria) occurred during the total-dose infusion in a patient who had a successful test infusion. None of these adverse events were life-threatening, and symptoms were treated symptomatically with anti-histamines or steroids. Two more patients presented mild adverse events after TDI, such as myalgias, arthralgias, and nausea, which were resolved within 72 h after iron infusion. None of the patients who received corticosteroid pre-medication developed any adverse event.

Discussion

Iron deficiency is the most common cause of anemia in IBD. The causes of iron deficiency are reduced intake, either from dietary deficiency or malabsorption, or increased losses. Chronic intestinal bleeding in IBD may exceed the amount of iron that can be absorbed from the diet, resulting in a negative iron balance [1, 3]. This imbalance is often seen in IBD, leading to anemia.

Oral iron treatment of anemia in IBD is limited by poor absorption, intolerance, and the induction of oxidative stress at the site of bowel inflammation [1, 3]. Moreover, there is evidence that oral iron increases the clinical disease activity in IBD.

On the other hand, patients with IBD and anemia respond well to intravenous iron therapy, with an increase in hemoglobin levels. Several studies have shown that intravenous iron replacement, especially with iron sucrose, is safe and effective in the treatment of iron-deficient

Table 2 Patient laboratory data at baseline and after treatment

| | Before treatment | After treatment |
|------------------------------|------------------|-------------------|
| Mean hemoglobin (g/dl) | 9.88 ± 1.42 | 11.60 ± 1.29 |
| Mean corpuscular volume (fl) | 74.6 ± 9.9 | 79.9 ± 8.7 |
| Ferritin (ng/ml) | 13.9 ± 10.9 | 145.6 ± 112.7 |
| TSAT (%) | 11.2 ± 9.0 | 24.5 ± 11.6 |
| CRP (mg/dl) | 1.74 ± 3.2 | 1.43 ± 1.93 |
| ESR (mm/h) | 37.4 ± 28.5 | 25.9 ± 19.1 |

TSAT transferrin saturation; CRP C-reactive protein; ESR erythrocyte sedimentation rate

anemia in IBD [6–10]. However, treatment with iron sucrose has the disadvantage of the need for repeated infusions, as single doses should not exceed 300 mg/infusion. Therefore, strategies with higher doses of intravenous iron administration have been suggested. New intravenous iron formulations such as ferric carboxymaltose, which can be administered as single doses up to 1,000 mg iron per week, have shown high safety and efficacy in IBD-associated anemia [22, 23], but it has not been approved by the Food and Drug Administration (FDA) and it is not available commercially in our country yet. Moreover, ferumoxytol, which is a novel, semisynthetic, carbohydrate-coated, super paramagnetic iron oxide nanoparticle that is administered IV rapidly as an injection of 510 mg, has been suggested in the treatment of anemia or chronic kidney disease [24].

This study was designed to evaluate the safety and efficacy of the total dose of LMW iron dextran infusion for the treatment of iron deficiency in IBD. LMW iron dextran has the ability to infuse the patient's total iron requirement in a single administration (total-dose infusion) and has been proven as a safe and effective treatment of iron deficiency [11–17]. Since TDI is simpler and more convenient for the patients, we tried to assess its efficacy in IBD patients with refractory anemia. We found that total parenteral iron replacement with LMW iron dextran is a safe and effective therapy without significant adverse effects. Moreover, it increased significantly the hemoglobin concentrations and improved the measured hematological parameters (MCV, TSAT, and serum ferritin) in these patients. Regarding the hematopoietic response, we found that 51.1% of the patients were responders after one month.

The adverse events of LMW iron dextran are immediate anaphylactoid reactions, such as malaise, itching, urticaria, sweating, myalgia, arthralgia and febrile episodes, and delayed reactions, such as lymphadenopathy, myalgia, arthralgia, backache, headache, fevers, nausea, vomiting, dizziness, and diaphoresis, which usually resolve within 72 h after iron infusion. Serious adverse events and life-threatening anaphylactic reactions are rare with LMW iron dextran (<1 in 200,000) [25, 26]. In our study, 8% of the patients had a positive test and did not receive a total-dose infusion. Although it has been suggested that some of the mild reactions do not recur with rechallenge [26], and it is likely that these four patients could have tolerated the IV iron, a conservative decision was made during the contact of the study in order to avoid the total dose in these cases. One patient also had allergic reaction during the total-dose infusion which was not life-threatening, and the symptoms were treated symptomatically. Moreover, two patients (4%) had delayed reactions which were resolved within 72 h after iron infusion. The prevalence of hypersensitivity

reactions in our study was rather higher than that reported in patients with anemia without IBD [11–16], but it is similar to that reported in 9% of pediatric IBD patients [17]. It could be suggested that this difference may be attributed to the known higher rate of immune-mediated drug reactions in inflammatory than in non-inflammatory diseases and the high prevalence of allergy in IBD patients [27, 28]. Another point is that only 20% of our patients received pre-medication with methylprednisolone but, considering the total-dose infusion of LMW iron dextran, maybe pre-medication should be included as routine clinical practice [26].

Our study has some obvious limitations, such as the rather short follow up period and the absence of a control group treated with oral iron. However, the majority of the patients had already experienced intolerance and/or ineffectiveness of oral iron replacement therapy, and it was considered unethical to include an arm in the study with this treatment.

In conclusion, our results suggest that the total dose of LMW iron dextran infusion may be useful in treating IBD-associated anemia. This approach is effective and has the additional advantage of being simple, easy to accept, and more convenient for the patients. A minority of patients (about 10%) develop an allergic reaction to the test dose and is excluded from further treatment. Based on these data and the available data on accelerated regimens of high-dose intravenous iron sucrose [10, 29–31], anemia in IBD patients could be treated either with high-dose infusions of iron sucrose in about three sessions or with a single dose of LMW iron dextran. Further randomized studies comparing the available regimens of intravenous iron in IBD patients with anemia should be conducted.

References

1. Gasche C, Lomer MCE, Cavill I, Weiss G. Iron, anaemia, and inflammatory bowel diseases. *Gut*. 2004;53:1190–1197.
2. Wilson A, Reyes E, Ofman J. Prevalence and outcomes of anemia in inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. *Am J Med*. 2004;116(Suppl 7A):44S–49S.
3. Kulnigg S, Gasche C. Systematic review: managing anaemia in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006;24:1507–1523.
4. Tsiolakidou G, Koutroubakis IE. Stimulating erythropoiesis in inflammatory bowel disease associated anemia. *World J Gastroenterol*. 2007;13:4798–4806.
5. Gasche C, Berstad A, Befrits R, Beglinger C, Dignass A, Erichsen K, et al. Guidelines on the diagnosis and management of iron deficiency and anemia in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13:1545–1553.
6. Gasche C, Waldhoer T, Feichtenschlager T, Male C, Mayer A, Mittermaier C, et al. Prediction of response to iron sucrose in inflammatory bowel disease-associated anemia. *Am J Gastroenterol*. 2001;96:2382–2387.

7. Bodemar G, Kechagias S, Almer S, Danielson BG. Treatment of anaemia in inflammatory bowel disease with iron sucrose. *Scand J Gastroenterol*. 2004;39:454–458.
8. Schröder O, Mickisch O, Seidler U, de Weerth A, Dignass AU, Herfarth H, et al. Intravenous iron sucrose versus oral iron supplementation for the treatment of iron deficiency anemia in patients with inflammatory bowel disease—a randomized, controlled, open-label, multicenter study. *Am J Gastroenterol*. 2005;100:2503–2509.
9. Erichsen K, Ulvik RJ, Nysaeter G, Johansen J, Ostborg J, Berstad A, et al. Oral ferrous fumarate or intravenous iron sucrose for patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2005;40:1058–1065.
10. Kouroubakis IE, Kaminis K, Makreas S, Xidakis C, Niniraki M, Kouroumalis EA. Effectiveness of darbepoetin-alfa in combination with intravenous iron sucrose in patients with inflammatory bowel disease and refractory anaemia: a pilot study. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2006;18:421–425.
11. Reddy CM, Kathula SK, Ali SA, Bekal R, Walsh M. Safety and efficacy of total dose infusion of iron dextran in iron deficiency anaemia. *Int J Clin Pract*. 2008;62:413–415.
12. Auerbach M, Winchester J, Wahab A, Richards K, McGinley M, Hall F, et al. A randomized trial of three iron dextran infusion methods for anemia in EPO-treated dialysis patients. *Am J Kidney Dis*. 1998;31:81–86.
13. Anuradha S, Singh NP, Agarwal SK. Total dose infusion iron dextran therapy in predialysis chronic renal failure patients. *Ren Fail*. 2002;24:307–313.
14. Sinha S, Chiu DY, Peebles G, Kolakkat S, Lamerton E, Fenwick S, et al. Comparison of intravenous iron sucrose versus low-molecular-weight iron dextran in chronic kidney disease. *J Ren Care*. 2009;35:67–73.
15. Bhandari S, Naudeer S. Improving efficiency and value in health care. Intravenous iron management for anaemia associated with chronic kidney disease: linking treatment to an outpatient clinic, optimizing service provision and patient choice. *J Eval Clin Pract*. 2008;14:996–1001.
16. Ayub R, Tariq N, Adil MM, Iqbal M, Junaid A, Jafery T. Efficacy and safety of total dose infusion of low molecular weight iron dextran in the treatment of iron deficiency anemia during pregnancy. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2008;18:424–427.
17. Mamula P, Piccoli DA, Peck SN, Markowitz JE, Baldassano RN. Total dose intravenous infusion of iron dextran for iron-deficiency anemia in children with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2002;34:286–290.
18. Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 1989;24:2–6.
19. Best WR, Becktel JM, Singleton JW, Kern F Jr. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology*. 1976;70:439–444.
20. Walmsley RS, Ayres RC, Pounder RE, Allan RN. A simple clinical colitis activity index. *Gut*. 1998;43:29–32.
21. Ganzoni AM. Intravenous iron-dextran: therapeutic and experimental possibilities. *Schweiz Med Wochenschr*. 1970;100:301–303.
22. Kulnigg S, Stoinov S, Simanenkov V, Dudar LV, Kamafel W, Garcia LC, et al. A novel intravenous iron formulation for treatment of anemia in inflammatory bowel disease: the ferric carboxymaltose (FERINJECT) randomized controlled trial. *Am J Gastroenterol*. 2008;103:1182–1192.
23. Lyseng-Williamson KA, Keating GM. Ferric carboxymaltose: a review of its use in iron-deficiency anaemia. *Drugs*. 2009;69:739–756.
24. Singh A, Patel T, Hertel J, Bernardo M, Kausz A, Brenner L. Safety of ferumoxytol in patients with anemia and CKD. *Am J Kidney Dis*. 2008;52:907–915.
25. Chertow GM, Mason PD, Vaage-Nilsen O, Ahlmén J. On the relative safety of parenteral iron formulations. *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19:1571–1575.
26. Auerbach M, Ballard H, Glaspy J. Clinical update: intravenous iron for anaemia. *Lancet*. 2007;369:1502–1504.
27. D'Arienzo A, Manguso F, Astarita C, D'Amiento FP, Scarpa R, Gargano D, et al. Allergy and mucosal eosinophil infiltrate in ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol*. 2000;35:624–631.
28. Engkilde K, Menné T, Johansen JD. Inflammatory bowel disease in relation to contact allergy: a patient-based study. *Scand J Gastroenterol*. 2007;42:572–576.
29. Blaustein DA, Schwenk MH, Chattopadhyay J, Singh H, Daoui R, Gadh R, et al. The safety and efficacy of an accelerated iron sucrose dosing regimen in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl*. 2003;87:S72–S77.
30. Hollands JM, Foote EF, Rodriguez A, Rothschild J, Young S. Safety of high-dose iron sucrose infusion in hospitalized patients with chronic kidney disease. *Am J Health Syst Pharm*. 2006;63:731–734.
31. Wall GC, Pauly RA. Evaluation of total-dose iron sucrose infusions in patients with iron deficiency anemia. *Am J Health Syst Pharm*. 2008;65:150–153.



available at www.sciencedirect.com



REVIEW ARTICLE

Diagnosing anemia in inflammatory bowel disease: Beyond the established markers

Pantelis Oustamanolakis, Ioannis E. Koutroubakis*, Elias A. Kouroumalis

Department of Gastroenterology, University Hospital of Heraklion, Crete Greece

Received 5 February 2011; received in revised form 16 March 2011; accepted 16 March 2011

KEYWORDS:

Anemia;
Crohn's disease;
Ferritin;
Iron;
Iron deficiency;
Ulcerative colitis

Abstract

The main types of anemia in inflammatory bowel disease (IBD) are iron deficiency anemia (IDA) and anemia of inflammatory etiology, or anemia of chronic disease (ACD). In the management of IBD patients with anemia it is essential for the physician to diagnose the type of anemia in order to decide in an evidence-based manner for the appropriate treatment. However, the assessment of iron status in IBD in many cases is rather difficult due to coexistent inflammation. For this assessment several indices and markers have been suggested. Ferritin, seems to play a central role in the definition and diagnosis of anemia in IBD and transferrin, transferrin saturation (Tsat), and soluble transferrin receptors are also valuable markers. All these biochemical markers have several limitations because they are not consistently reliable indices, since they are influenced by factors other than changes in iron balance. In this review, in addition to them, we discuss the newer alternative markers for iron status that may be useful when serum ferritin and Tsat are not sufficient. The iron metabolism regulators, hepcidin and prohepcidin, are still under investigation in IBD. Erythrocytes parameters like the red cell distribution width (RDW) and the percentage of hypochromic red cells as well as reticulocyte parameters such as hemoglobin concentration of reticulocytes, red blood cell size factor and reticulocyte distribution width could be useful markers for the evaluation of anemia in IBD.

© 2011 European Crohn's and Colitis Organisation. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

| | |
|-----------------------------------------|---|
| 1. Introduction | 0 |
| 2. Iron status parameters | 0 |
| 2.1. Serum iron concentration | 0 |

* Corresponding author at: Dept of Gastroenterology, University Hospital Heraklion, P.O.BOX 1352, 71110 Heraklion, Crete, Greece. Tel.: +30 2810392253, fax +30 2810542085.

E-mail address: ikoutroub@med.uoc.gr (I.E. Koutroubakis).

1873-9946/\$ - see front matter © 2011 European Crohn's and Colitis Organisation. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.crohns.2011.03.010

Please cite this article as: Oustamanolakis P, et al, Diagnosing anemia in inflammatory bowel disease: Beyond the established markers, *Journal of Crohn's and Colitis* (2011), doi:10.1016/j.crohns.2011.03.010

2.2. Ferritin 0
 2.3. Transferrin/total iron binding capacity 0
 2.4. Transferrin saturation 0
 2.5. Soluble transferrin receptors 0
 3. Iron metabolism regulators 0
 3.1. Hepcidin 0
 3.2. Prohepcidin 0
 4. Erythrocytes parameters 0
 4.1. Red cell distribution width 0
 4.2. Percentage of hypochromic red cells 0
 4.3. Erythrocyte zinc protoporphyrin 0
 5. Reticulocytes parameters 0
 5.1. Mean reticulocyte volume 0
 5.2. Reticulocyte hemoglobin concentration 0
 5.3. Immature reticulocyte fraction 0
 5.4. Red blood cell size factor 0
 5.5. Reticulocyte distribution width 0
 6. Conclusions 0
 References 0

1. Introduction

Anemia is the most frequent extraintestinal manifestation of inflammatory bowel disease (IBD) with a great impact on the patients' quality of life.¹ For this reason the research has recently been focused on the pathophysiology, diagnosis and treatment of anemia in IBD. Several studies have contributed in this field unraveling its main mechanisms and suggesting new diagnostic criteria.²⁻⁴ At the same time, new therapeutic methods were developed, especially in the field of iron and erythropoietin supplementation therapy.⁵⁻¹⁰ Nowadays, the diagnosis and therapy of anemia has become one of the most challenging fields in the clinical IBD practice.

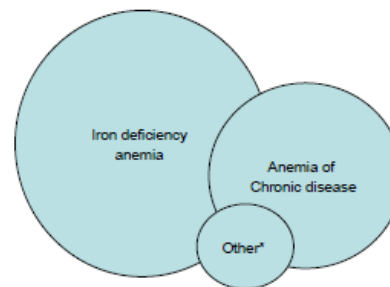
The prevalence of anemia in IBD varies between 15% and 75%, depending on the definition and subgroup of patients examined.¹¹ Patients present with a variety of symptoms and signs, such as fatigue, weakness, paleness, headaches, dyspnea, tachycardia, reduced functionality of the musculoskeletal system and impaired cognitive functions.^{12,13} These symptoms may occur before the establishment of anemia in the full blood count and the clinicians should detect and treat them early, in order to prevent patient's hospitalization or prolongation of hospital stay. On the other hand, the economic burden of anemia in IBD is very important, on the basis of reducing patient's ability to work and often leading to prolonged hospitalization.

The main types of anemia in IBD are iron deficiency anemia (IDA) and anemia of inflammatory etiology, or anemia of chronic disease (ACD) (Fig. 1). IDA, which is the most common, is the result of reduced iron uptake from the enterocyte and chronic blood loss from the gastrointestinal tract, due to chronic inflammation of the epithelium of the small and large intestine. On the other hand, inflammation, through an inflammatory cytokines-mediated mechanism, leads to a decreased iron level in the circulation and thus to a limited availability of iron for erythroid cells. Besides that, inflammatory mechanisms also lead to decreased iron uptake from the intestinal epithelium, thus providing a very complex two-way

interactive pathophysiologic pathway between iron deficiency (ID) mechanisms and inflammation.⁴

In the management of IBD patients with anemia it is essential for the physician to diagnose the type of anemia and to determine the degree of iron deficiency and the degree of inflammation in each patient, in order to decide in an evidence-based manner for the treatment. In our armamentarium nowadays there are plenty of established and new generation indices and markers (Table 1), some of them being a product of latest new technology blood analyzers. There is a growing volume of data about the ability of such markers to differentiate between ID and inflammation, in order to diagnose easily and with a cost-effective way the type of anemia in IBD.

This review discusses the role of established and new indices and markers in the diagnosis of anemia in patients with IBD.



*Vitamin B12 or folate deficiency, drug induced, hemolysis, myelodysplastic syndrome, aplasia, hemoglobinopathies

Figure 1 Etiology of anemia in inflammatory bowel disease.

Please cite this article as: Oustamanolakis P, et al, Diagnosing anemia in inflammatory bowel disease: Beyond the established markers, *Journal of Crohn's and Colitis* (2011), doi:10.1016/j.crohns.2011.03.010

Table 1 Markers that differentiate iron deficiency anemia from anemia of chronic disease in inflammatory bowel disease.

| Parameter | Iron deficiency anemia | Anemia of chronic disease | Mixed anemia |
|--------------|------------------------|---------------------------|----------------------|
| Ferritin | Reduced | Increased or normal | Normal or increased |
| Transferrin | Increased | Reduced or normal | Reduced |
| Tsat | Reduced | Reduced | Reduced |
| sTfR | Increased | Normal or reduced | Normal or increased |
| sTfR-F index | Increased | Reduced | Increased |
| Hepcidin | Reduced | Increased | Increased or reduced |
| MCV | Reduced | Reduced or normal | Reduced or normal |
| CRP | Normal | Increased | Increased |
| RDW | Increased | Normal or increased | Normal or increased |
| CHr | Reduced | Reduced | Reduced |
| RSF | Reduced | Normal or reduced | Normal or reduced |
| RDWR | Increased | Normal or increased | Normal or increased |

Tsat, Transferrin saturation; sTfR, soluble transferrin receptor; sTfR-F, soluble transferrin receptor-ferritin; MCV, Mean corpuscular volume; CRP, C-reactive protein; RDW, red cell distribution width; RSF, Red blood cell size factor; and RDWR, Reticulocyte distribution width.

2. Iron status parameters

2.1. Serum iron concentration

Iron is an essential element employed by almost all types of cells as a cofactor for fundamental biochemical reactions or as a part of numerous enzymes participating in redox reactions, oxygen transport, energy metabolism and DNA synthesis. Iron possesses a very flexible coordination chemistry and redox reactivity, which enable it to interfere with proteins, bind to oxygen, transfer electrons or mediate catalytic reactions.

The content of iron in the human body is normally 3–4 g, corresponding to a concentration of 40–50 mg of iron/kg body weight. About 60% of the iron is present in the form of hemoglobin in the circulating red blood cells and another 6–7 mg/kg in the form of myoglobin and haem and nonhaem enzymes. Transport iron, bound to the transport protein transferrin, represents only a tiny part (<0.2%) of total body iron. The iron bound to transferrin, supplies the tissues with the iron which they need. The remaining iron (15–30% of the total iron) is bound in a storage form, principally in the cytoplasm in the form of ferritin but also in lysosomes, as hemosiderin.¹⁴

Serum iron concentrations reflect the balance between the flow of iron into and out of the plasma pool. Iron in this pool turns over very rapidly and plasma iron levels are

subject to large and rapid changes. The iron stores show extensive fluctuations dependent on such factors as circadian rhythm, turnover of the iron in the major iron compartments and absorption. The turnover of serum iron takes place many times daily.^{15,16} The measurement of serum iron concentration is subject to many variables that may introduce substantial errors into results, such as inadequately processed glassware, contamination of reagents with small amounts of iron, turbidity, and entrapment of iron in plasma proteins during their precipitation.¹⁷ Moreover, many factors such as menstrual bleeding in women,^{18,19} acute or chronic inflammatory processes (including IBD),^{20,21} malignancy,²² chemotherapy and myocardial infarction^{23,24} may influence the measured values. In conclusion, serum iron concentration is a rather unreliable index for the evaluation of IDA in IBD patients.

2.2. Ferritin

Ferritin is an oligomeric protein characterized by a hollow protein shell capable to store substantial amounts of iron in a non-toxic, soluble and bioavailable form. It serves as a reservoir of iron for cellular requirements for almost all human cells. The main storage sites of ferritin are liver, spleen and skeletal muscle. The origin of serum ferritin is not well established, although animal studies suggest that it is mostly derived from liver.²⁵

Measurement of ferritin provides a useful indirect estimate of body iron stores. Small amounts of ferritin secreted into the circulation can be measured by immunoassay. In healthy individuals serum ferritin levels correlate with body iron stores. The maximum possible concentration of serum ferritin (in glycosylated form) derived from active ferritin synthesis is considered to be about 4000 µg/L. Higher concentrations are thought to be due to the release of intracellular ferritin from damaged cells.²⁶

In the healthy population elevated ferritin concentrations usually indicate increased iron stores, but a number of disorders may also increase serum ferritin levels independently of the body iron. Serum ferritin is an acute phase reactant and conditions such as fever, acute infections, chronic inflammatory disorders (including IBD), may increase the serum ferritin concentration.²⁶ Acute and chronic damage to the liver, as well as damage to other tissues, may increase serum ferritin as part of an inflammatory process or by release of tissue ferritin (not glycosylated) from damaged parenchymal cells. Defective clearance of circulating ferritin, for example due to liver dysfunction, may also lead to elevation of the serum ferritin concentration. Malignant diseases and chemotherapy may increase serum ferritin levels.²⁶ These factors may result in increased serum ferritin levels, which may obscure iron deficiency and complicate the detection of iron overload. On the other hand, conditions that lower the serum ferritin levels without ID are hypothyroidism and vitamin C deficiency.²⁶

Every µg/L of serum ferritin corresponds to 8–10 mg storage of iron.²⁷ Guyatt et al. in an analysis of 55 studies reported that the mean area of the receiver-operator characteristic (ROC) curves for ferritin was 0.95, while that of MCV was only 0.76 in the diagnosis of ID.²⁸ A ferritin level of ≤12 µg/L has a high specificity (98%) but low sensitivity

Please cite this article as: Oustamanolakis P, et al, Diagnosing anemia in inflammatory bowel disease: Beyond the established markers, *Journal of Crohn's and Colitis* (2011), doi:10.1016/j.crohns.2011.03.010

(25%) for diagnosis of ID.²⁹ The sensitivity can be improved to 92% with the same specificity of 98% if a cut-off ferritin level of 30 $\mu\text{g/L}$ is used. Kis et al.³⁰ in patients who had undergone bone marrow aspirations, found that a ferritin of $\leq 100 \mu\text{g/L}$ had a 64.9% sensitivity and a 96.1% specificity for diagnosis of ID. The threshold for ferritin of 100 $\mu\text{g/L}$ was also found to stratify anemic veterans into a high-risk group for advanced colonic neoplasia from a low-risk non-anemic group.³¹ Based on these data, a simple clinical cutoff can guide management of anemic subjects: serum ferritin $< 15 \mu\text{g/L}$ indicates ID, while serum ferritin $> 100 \mu\text{g/L}$ mostly excludes ID; intermediate values warrant further investigation.²⁸ Although ferritin level increases with age, and is an acute-phase reactant influenced by chronic inflammation, infection, malignancy and chronic renal failure, the sensitivity and specificity of the serum ferritin is little changed if the 100 $\mu\text{g/L}$ threshold is used.^{28,30} Others have proposed that a ferritin level of 70 $\mu\text{g/L}$ was the necessary safety limit for exclusion of ID.^{32,33} Guagnozzi et al.³⁴ in a study with 76 IBD patients found that the sensitivity and specificity of ferritin, with a cutoff value of 15 ng/mL, were low (89% and 64.5%, respectively) for diagnosis of ID. ROC analysis demonstrated that ferritin diagnostic accuracy could be improved by using higher cutoff values. In anemic IBD patients, the ferritin cutoff value of 28 ng/mL showed a sensitivity of 93.8% and a specificity of 90%, indicating that ferritin may be proposed as an accurate, simple, and useful marker to identify ID, particularly in anemic IBD patients.

According to the established guidelines on the diagnosis and management of IDA and anemia in IBD,³⁵ serum ferritin is included in the screening parameters for anemia, with the recommendation to be measured every 6 to 12 months, in patients in remission or mild disease, or at least every 3 months in outpatients with active disease. Ferritin was added to other parameters (full blood count and CRP) as minimum requirements to diagnose anemia, inflammatory flare or IDA in an early stage, because IDA is a very common nutritional deficiency with a strong impact on anemia.³⁶ Ferritin, along with Tsat and CRP, is the minimum workup for anemic patients with IBD. The combination of serum ferritin levels with soluble transferrin receptors (sTfR) levels can be used to detect ID (increased sTfR, low ferritin), inflammation (normal sTfR and ferritin) or mixed conditions (increased sTfR, normal ferritin). Furthermore, ferritin $< 30 \mu\text{g/L}$ (in combination with Tsat $< 16\%$) is an established index for ID in patients without evidence of inflammation. In the presence of inflammation, the lower limit of serum ferritin consistent with normal iron stores is considered to be 100 $\mu\text{g/L}$, thus the diagnostic criteria for ACD are a serum ferritin $> 100 \mu\text{g/L}$ and Tsat $< 16\%$. If the serum ferritin level is between 30 and 100 $\mu\text{g/L}$, a combination of true IDA and ACD is likely. Finally, serum ferritin can be used in the form of the sTfR/log ferritin ratio as a useful tool to exclude ID, when it is < 1 .³⁷

2.3. Transferrin/total iron binding capacity

Transferrin (TRF) mediates iron exchange between body tissues, taking iron from donor sites, such as the gut and macrophages, to acceptor cells like erythroblasts. In conditions of normal iron status, serum TRF is saturated to about one-third of its iron-binding capacity, so that we have

a mixture of apotransferrin, the two mono-ferric forms and di-ferric TRF. TRF is mainly synthesized in liver hepatocytes and in small amounts in brain, lymph nodes, testicular tissue and mammary glands.³⁸

Serum TRF is an indicator for ID but is not as useful as the serum ferritin level. TRF concentrations increase when iron stores are depleted and decrease with iron overload. However, the TRF level is not a consistently reliable index, since it is influenced by factors other than changes in iron balance. Inflammation, infection, malignancy, liver disease, nephrotic syndrome and malnutrition may all reduce the serum TRF concentration, while pregnancy and oral contraceptives will increase it.²⁶

Total iron binding capacity (TIBC) indicates the maximum amount of iron needed to saturate plasma or serum TRF. The correlation between TIBC and TRF is generally considered good, but they also present important differences. Although TIBC is cheaper, there are several advantages of serum TRF. Due to binding of iron to other plasma proteins (mainly albumin), TIBC methods generally overestimate the iron binding capacity of transferrin and no generic reference values are available. In contrast, internationally accepted interim reference ranges are available for serum TRF. In view of these observations, determination of TRF concentration, rather than TIBC, is recommended. However, TIBC measurements may be preferred in populations with genetic variation of TRF.³⁹

Although serum ferritin measurement is the investigation of choice in ID, many laboratories continue to measure iron and TIBC/TRF. In a recent study, Hawkins et al. comparing the diagnostic utility of iron, TRF and Tsat measurements in the diagnosis of ID across inpatient and outpatient found that TRF or TIBC measurement outperformed iron measurement and saturation index.⁴⁰ Shek et al.,⁴¹ in a more cost effective approach to the diagnosis of ID, suggested that serum iron and TIBC should be done first, and serum ferritin is not required when Tsat $< 16\%$ and TIBC $> 70 \text{ mmol/L}$ or if Tsat is $\geq 22\%$ and TIBC $\leq 70 \text{ mmol/L}$. A study from Germany⁴² investigating the diagnostic validity of an increased TRF concentration for diagnosis of ID showed diagnostic sensitivity 36% and specificity 97%. Finally, a recent study on rheumatoid arthritis showed limited value of TIBC in the diagnosis of ID.⁴³

In conclusion, it seems that TRF/TIBC test is superior to serum iron or Tsat, but is not better than ferritin in diagnosis of ID. In any way, TRF/TIBC should be used with consciousness and only in parallel with other iron status tests, in order to get the highest diagnostic yield. In IBD patients, TRF has been suggested to be included, among other parameters, in the more extensive workup of anemia, when the minimum investigation (ferritin, Tsat, and CRP) cannot identify the cause of anemia.³⁵ In addition, TRF levels can be used, in combination with other indices (serum erythropoietin and sTfR), to predict cases that will not respond to intravenous iron alone and may profit from a combination therapy with erythropoiesis stimulating agents.⁴⁴

2.4. Transferrin saturation

Transferrin saturation (Tsat) is an index reported as a percentage and is the quotient of iron levels ($\mu\text{mol/L}$)/TRF

Please cite this article as: Oustamanolakis P, et al, Diagnosing anemia in inflammatory bowel disease: Beyond the established markers, *Journal of Crohn's and Colitis* (2011), doi:10.1016/j.crohns.2011.03.010

levels (mg/dl) in the serum or plasma multiplied by 70.9 (fasting blood sample).⁴⁵ Tsat is a measurement of the iron content of the circulating TRF. Normally, there is enough TRF present in 100 mL serum to bind 250 to 450 μg (4.4 to 8.0 μmol) of iron. Since the normal iron levels are about 1.8 $\mu\text{mol/dl}$ (100 $\mu\text{g/dl}$), TRF is roughly one-third saturated with iron. TRF is normally 20 to 50% saturated with iron. A normal value for Tsat often accompanies low serum iron levels in the ACD. However, exceptions are so common as to considerably detract from the diagnostic value of measuring Tsat.¹⁷

A Tsat <16% implies a suboptimal supply of iron for erythropoiesis. A reduced Tsat has a relatively high sensitivity (90%) but a relatively low specificity (40–50%) for detecting ID.⁴⁶ Determination of Tsat gives only an indirect indication of the extent of iron use in the bone marrow and does not provide any information about the condition of the iron stores. As Tsat is subject to certain circadian fluctuations, its measurement should always be carried out at the same time of the day and repeated several times.⁴⁵ Tsat also has some acute-phase reactivity as TRF may be elevated in the setting of inflammation, which would lower the Tsat, if circulating iron is constant. Decreased TRF synthesis in the setting of malnutrition and chronic disease results in a raised Tsat.⁴⁶

Three studies^{47–49} examining the use of Tsat in renal failure patients, with cutoff values between 19 and 21%, showed sensitivity 59–88% and specificity 63–78% in diagnosis of ID, suggesting that only a few patients with true ID have a Tsat >20%.⁴⁶ In the guidelines for diagnosis of anemia in IBD, Tsat is included in the minimum anemia workup, along with ferritin and CRP. It is used, in combination with ferritin, at a lower cutoff point (Tsat <16%) in the diagnostic criteria for IDA (when ferritin is <30 $\mu\text{g/L}$) or for ACD (when ferritin is >100 $\mu\text{g/L}$). A Tsat level between 16 and 50% indicates adequate iron stores, while a value >50% is consistent with a potential iron overload.³⁵

2.5. Soluble transferrin receptors

Serum iron, in the form of diferric TRF, is delivered to cells via the TRF-to-cell cycle, which involves the transferrin receptor (TfR1), a disulfide-linked homodimer composed of two identical glycosylated subunits. Each of the subunits can bind one diferric TRF molecule. The number of soluble transferrin receptors (sTfR) reflects the cellular requirements for iron, and varies both as a function of the cell type, and also with the cell's morphological development. Whereas early normoblasts have some 300,000 TRF receptors, at the peak period of haem synthesis, in the intermediate normoblast, this increases to around 800,000/cell. The circulating receptor seems to be a truncated form of the cellular receptor and it is bound to TRF.²⁵

In ID the numbers of TfR increase significantly. Part of the TfR is shed into the plasma, where the concentration can be measured by immunoassay and used as an indicator of ID. This assay seems particularly useful for diagnosis of ID in patients with infection, inflammation or malignancy where serum ferritin is not a good indicator of IDA.⁵⁰ The concentration of sTfRs in the serum is an indicator of the iron supply available for erythropoiesis; sTfRs reflect

erythropoiesis and inversely the amount of iron available for erythropoiesis.^{45,51–53}

Unlike ferritin and TRF, chronic inflammation and hepatic damage have no effect on sTfRs, which should make them a more reliable parameter than serum ferritin for diagnosing ID in patients with IBD.^{45,46} However, Fernandez-Rodriguez et al.³⁴ found sTfRs to be less accurate than serum ferritin in this setting. They demonstrated a sTfR sensitivity of 70% and a specificity of 59% at a cutoff of 2.6 mg/L. Tessitore et al.⁴⁸ demonstrated a sTfR sensitivity of 81% and a specificity of 71% at a cutoff of 1.5 mg/L. The sTfR:log ferritin ratio has also been suggested as able to differentiate more accurately between IDA and ACD or to assess the iron status in patients with mixed type anemia.⁵³ In another study of 176 patients (51.1% with ACD and 48.8% with IDA),⁵⁵ both the sensitivity and specificity of sTfR in IDA was found to be 100%, whereas in ACD, these were 66.6% and 100% respectively, concluding that sTfR is a reliable index of IDA and could be useful in distinguishing IDA from ACD. These findings are in agreement with a more recent study⁵⁶ where it was found that sTfR levels can be very useful in differentiating pure IDA, ACD and ACD with coexisting IDA, thus providing a noninvasive alternative to bone marrow iron. A high diagnostic power of sTfR or sTfR:log ferritin ratio for differentiating IDA from ACD and mixed anemia has been suggested by several studies in various groups of patients.^{37,57}

Increased concentrations of sTfRs are reported in other disorders of erythropoiesis, such as hemolytic anemia, thalassemia and polycythemia, while they are reduced in aplastic anemia and other conditions with hypoproliferative erythropoiesis, such as renal anemia.⁴⁵ Serum sTfR levels average 5.0 ± 1.0 mg/L in normal subjects but the various commercial assays give disparate values because of the lack of an international standard.⁵² The most important determinant of sTfR levels appears to be marrow erythropoietic activity which can cause variations up to 8 times below and up to 20 times above average normal values. Measurements of sTfR are very helpful to investigate the pathophysiology of anemia, quantitatively evaluating the absolute rate of erythropoiesis and the adequacy of marrow proliferative capacity for any given degree of anemia, and to monitor the erythropoietic response to various forms of therapy, in particular allowing to predict response early when changes in hemoglobin are not yet apparent.⁵² Conclusively, sTfR represents a valuable quantitative assay of marrow erythropoietic activity as well as a marker of tissue ID, with the restriction that the assay is not widely available and not standardized, which impedes its clinical application.

3. Iron metabolism regulators

3.1. Hepcidin

Hepcidin is a circulating peptide which plays a major role in iron homeostasis. It is mainly produced in the liver as well as by myeloid cells⁵⁸ and by activated splenocytes,⁵⁹ through a precursor protein (prohepcidin). Hepcidin reduces the quantity of circulating iron by preventing its exit from the cells, especially from enterocytes and macrophages. It binds to ferroportin, in order to limit iron egress, inducing its internalization and degradation.^{60,61} In the absence of

Please cite this article as: Oustamanolakis P, et al, Diagnosing anemia in inflammatory bowel disease: Beyond the established markers, *Journal of Crohn's and Colitis* (2011), doi:10.1016/j.crohns.2011.03.010

hepcidin, increased intestinal iron absorption associated with increased iron efflux from macrophage leads to parenchymal iron overload.^{62,63}

Hepcidin expression is controlled by iron and inflammation.⁶⁴ The proinflammatory cytokines play a central role in the induction of the hepcidin gene.⁶⁵ IL6 stimulates hepcidin expression in vivo with concomitant reduction in serum iron.^{66,67} The characteristic features of ACD (reduction in serum iron, retention of iron in macrophages and blocking of intestinal iron absorption) are all compatible with the consequences of an increase in the production of hepcidin. Iron overload induces an increase in the synthesis of hepcidin whereas IDA results in the reduction in the production of hepcidin, thus ensuring a better availability of iron to the developing erythrocytes in the bone marrow.⁶⁸ Hypoxia also inhibits the synthesis of hepcidin.⁶⁵ It seems that hepcidin appears as the "ferrostat" of the organism, adjusting the quantities of circulating iron according to body requirements.

The literature about the role of hepcidin in the mechanisms of anemia in IBD is limited⁶⁹⁻⁷¹ and not very clear with the results of the existing studies to be rather conflicting (Table 2). In the study of our group⁷¹ the sensitivity of low hepcidin for diagnosis of anemia was 71% and the specificity was 43%. Similarly, the sensitivity of low hepcidin for diagnosis of IDA was 81% and the specificity was 45%.

It is worth mentioning that currently there is no reference method for hepcidin measurement. Hepcidin levels reported by the various methods vary considerably but analytical variance is generally low and similar for all methods.⁷²

3.2. Prohepcidin

Prohepcidin is the 60 amino acid immature form of hepcidin. Serum prohepcidin levels have controversial clinical significance since they have been found to be highly variable in normal physiological conditions⁷³ and without correlation with the expected hepcidin responses to physiologically relevant stimuli.⁷⁴ Sasu et al.⁷⁵ reported that prohepcidin did not correlate with hepcidin or anemia of inflammation and appears to be an unstable analyte in serum.

Research work on the role of prohepcidin in the anemia of IBD patients is very limited^{71,76,77} (Table 2). In the study of our group,⁷¹ median prohepcidin levels were significantly lower in IBD patients compared with HC ($P=0.03$), but after adjustment with other covariates no correlations with parameters of iron status or disease activity were found.

It seems that both hepcidin and prohepcidin offer a major contribution in the development of anemia in IBD, but their levels alone seem inadequate for use in distinguishing IDA from ACD.

4. Erythrocytes parameters

4.1. Red cell distribution width

The red cell distribution width (RDW) is derived from pulse height analysis and is the width of the red cell size distribution curve in fL at the 20% level of the peak. The RDW can also be expressed as the CV% of the measurements of the red cell volume. It is a quantitative measurement of

Table 2 Studies evaluating hepcidin and prohepcidin in inflammatory bowel disease.

| Author (reference) | Study design | Disease (N) HC (N) | Results |
|-------------------------------------|-------------------------------|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Semrin et al. ⁶⁹ | Urine hepcidin measurement | CD (19) | Increased levels in active disease positively correlated with IL-6 and CRP |
| Arnold et al. ⁷⁰ | Serum hepcidin measurement | UC (51) CD (10) HC (25) | Decreased levels positively correlated with IL-6 |
| Oustamanolakis et al. ⁷¹ | Serum hepcidin measurement | UC (49) CD (51) HC (102) | Increased levels positively correlated with ferritin and disease activity (for UC) |
| Kaya et al. ⁷⁶ | Serum prohepcidin measurement | Pediatric IBD (15) | Increased levels positively correlated CRP |
| Nagy et al. ⁷⁷ | Serum prohepcidin measurement | UC (72) CD (30) HC (28) | No significant difference compared with controls |
| Oustamanolakis et al. ⁷¹ | Serum prohepcidin measurement | UC (49) CD (51) HC (102) | Decreased levels not correlated with ferritin or disease activity |

CD, Crohn's disease; UC, ulcerative colitis; HC, healthy controls; CRP, C reactive protein; and IL-6, interleukin-6.

variation in red cell size and is equivalent to anisocytosis seen on the examination of a stained blood film.⁷⁸ A classification of anemia based on MCV and RDW has been suggested.⁷⁹ In addition to microcytic, normocytic, and macrocytic, this classification further divides the RBC population into homogeneous (with normal RDW) and heterogeneous (with increased RDW). The former include hypoproliferative anemia, aplasia, and thalassemia heterozygosis; the latter comprise nutritional anemia such as deficiencies in iron, B12, and folic acid and sideroblastic anemia.⁸⁰ However, an increase in the RDW in patients with anemia due to chronic infections and at least half of heterozygotes for thalassemia have been reported, and normal values of RDW are seen in 15%–20% of IDA.⁸⁰ Where microcytosis and macrocytosis exist within the same sample, the two abnormalities may cancel each other out and cause a normal MCV, however, the resulting high RDW will identify the error.⁷⁸ Moreover, in patients treated with purine analogs the effect of these drugs on MCV should be taken

Please cite this article as: Oustamanolakis P, et al, Diagnosing anemia in inflammatory bowel disease: Beyond the established markers, *Journal of Crohn's and Colitis* (2011), doi:10.1016/j.j.crohns.2011.03.010

into account. Both MCV and RDW should be validated in this type of patients.

There is a wide distribution of RDW values within a given disease and this has diminished its usefulness in differential diagnosis, but its importance as a general marker of abnormality has been maintained.⁸¹ Moreover there are significant differences on the measurements (CV percentage or direct measurement) and the reference intervals in the various methods used for calculation of the RDW.⁸⁰

The amount of literature concerning the implication of RDW in the field of IBD is rather limited. Cakal et al. in 2009⁸² found that RDW was significantly elevated in patients with active IBD compared with those with inactive disease and controls ($P < 0.05$). In another retrospective review of 284 patients with IBD,⁸³ there was a significant difference in the mean RDW between CD and UC (14.9 vs. 14.3, $P = 0.027$), suggesting RDW as a marker in differentiating CD from UC. In a study from our group⁸⁴ RDW was significantly increased in IBD patients compared with HC, whereas it was positively correlated with sTfR and negatively with Tsat. Additionally, RDW was found significantly different in patients with IDA compared with those without IDA. High RDW (> 14) was among the best markers for diagnosis of IDA with a sensitivity of 93% and a specificity of 81%. Finally, RDW was not significantly correlated with disease activity.

4.2. Percentage of hypochromic red cells

Percentage of hypochromic red cells is defined as cells with intracellular hemoglobin of < 28 g/dl.⁸⁵ In the healthy population, the percentage of hypochromic red cells does not exceed 2.5% and values greater than this are indicative of iron deficient erythropoiesis.⁸⁶ Percentage of hypochromic red cells is the concentration of hemoglobin in individual cells rather than the mean, as happens with mean cell hemoglobin (MCH) or mean cell hemoglobin concentration (MCHC). It is a more sensitive marker because small changes in the number of red cells with inadequate hemoglobin can be measured before there is any change in the MCHC.⁷⁸ Some sophisticated instruments can report this parameter but it has been argued that, as mature red cells have a longer lifespan, the percentage of hypochromic red cells integrates information from over too long a period and may be less sensitive than reticulocyte hemoglobin in diagnosing functional IDA or monitoring anemia treatment.⁷⁸ Some studies report that the percentage of hypochromic red cells is sensitive enough for the measurement of functional IDA.⁸⁷ Additionally, the utility of the test is limited as the percentage of hypochromic red blood cells is dependent on the total number of red blood cells, which may vary with the length of storage time. Currently, there are no studies investigating the role of this parameter in IBD.

4.3. Erythrocyte zinc protoporphyrin

In IDA and lead poisoning, the enzyme ferrochelatase catalyzes the incorporation of zinc, instead of iron, into protoporphyrin IX (the immediate precursor of heme), resulting in the formation of zinc protoporphyrin (ZPP). As the levels of ZPP reflect iron status in the bone marrow during erythropoiesis, ZPP values > 40 $\mu\text{mol/mol}$ hemoglobin

have been shown to indicate in addition to IDA, its severity as well and thus distinguish between mild (latent) IDA without clinical symptoms (ZPP: 40–60 $\mu\text{mol/mol}$ hemoglobin) and IDA with clinical symptoms (ZPP > 80 $\mu\text{mol/mol}$ hemoglobin).⁴⁵ ZPP is also valuable in the diagnosis of ACD.⁸⁸ However, as zinc deficiency rather common in inflammatory disorders,⁸⁹ the interpretation of ZPP levels should be handled with caution in the setting of IBD.

5. Reticulocytes parameters

5.1. Mean reticulocyte volume

There is evidence that Mean Reticulocyte Volume (MRV) increases after iron supplementation therapy in patients with IDA and decreases with the development of iron deficient erythropoiesis. The MRV decreases and reticulocytes are smaller than mature red cells following treatment with vitamin B12 or folate.⁷⁸ However there are limitations in the use of MRV since it lacks standardization, which means numeric results from different manufacturers are not comparable and there is no quality control material available.

5.2. Reticulocyte hemoglobin concentration

After the decade of 1990 some new technology hematology analyzers made possible to measure the hemoglobin concentration of reticulocytes (Chr). Chr is measured in the stained reticulocytes using two angle light scatter. The reference mean value in healthy population is 30.8 pg, with the same value in males and females, and the lower limit of normal is 28 pg.⁷⁸ The Chr provides an indirect measure of the functional iron available for new red blood cell production over the previous 3–4 days and it also provides an early measure of the response to iron therapy, increasing within 2–4 days of the initiation of intravenous iron therapy.⁷⁸ It is an early indicator of iron-restricted erythropoiesis in patients receiving erythropoietin therapy. These patients may have functional IDA and respond to iron therapy even with very high serum ferritin values. A value of Chr < 28 pg was found to predict functional IDA more accurately than ferritin or Tsat.⁷⁸

Although there are no studies evaluating Chr in patients with IBD it could be a reliable index for measuring the response to iron supplementation therapy. Large studies are needed to confirm this hypothesis in this particular group of patients.

5.3. Immature reticulocyte fraction

Immature Reticulocyte Fraction (IRF) indicates the less mature subgroup of reticulocytes, which contain the most RNA, and is an early and sensitive index of erythropoiesis.⁹⁰ Immature reticulocytes are released into the peripheral circulation during periods of intense erythropoietic stimulation such as hemorrhage, certain anemias or in response to therapy to stimulate bone marrow production.⁷⁸ The IRF increases before the total reticulocyte count and has been found to be useful in distinguishing anemias characterized by

Please cite this article as: Oustamanolakis P, et al, Diagnosing anemia in inflammatory bowel disease: Beyond the established markers, *Journal of Crohn's and Colitis* (2011), doi:10.1016/j.crohns.2011.03.010

increased marrow erythropoiesis (high reticulocytes, high IRF) from anemias due to reduced marrow activity (low reticulocytes, low IRF) and from situations such as acute infections and myelodysplastic syndromes (low/normal reticulocytes, high IRF).⁸⁰

A recent study, evaluating IRF in IBD patients,⁸⁴ showed significantly increased IRF in IBD patients compared to HC ($p < 0.0001$). IRF was not significantly correlated with ferritin, Tsat or sTfR and no differences in IRF between patients with IDA and patients without IDA were found. Higher IRF in patients compared to HC could be attributed to an ongoing blood loss in IBD patients, often subclinical, as a result of chronic inflammation in the gut, thus leading to an increased "drive" for erythropoiesis in the bone marrow, even in low iron availability conditions, due to impaired iron absorption.

Limitations of IRF are the non-standardization, the reference intervals are method dependent and the sensitivity is lower in non-fluorescence-based analyzers.⁸⁰ This makes IRF a marker of rather limited use in anemia evaluation in IBD.

5.4. Red blood cell size factor

Red blood cell size factor (RSF) is the result of the square root of the product of Mean corpuscular volume (MCV) multiplied by the Mean Reticulocyte Volume (MRV) and seems to be a suitable parameter for the study of bone marrow erythropoietic activity, as it provides a very good level of agreement with reticulocyte hemoglobin content (ChR). There is evidence of a significant correlation between RSF and ChR with excellent diagnostic performance of RSF compared with ChR in diagnosing the type of anemia.⁹¹ A significant correlation between RSF and reticulocyte hemoglobin equivalent (Ret He) in the diagnosis of inefficient erythropoiesis has also been observed.⁹²

RSF was found significantly positively correlated with Tsat and negatively with sTfR in a recent study of 100 patients with IBD.⁸⁴ RSF was significantly lower in patients with IDA compared with patients with other causes of anemia and patients without anemia. Low RSF was among the best markers for diagnosis of ID with a sensitivity of 83% and a specificity of 82%. On the contrary, concerning disease activity, RSF was not significantly different between active and non-active disease and no significant correlation between RSF and CRP levels was found. Based on these data RSF seems to be a sensitive real time parameter for the early detection of the impaired erythropoietic mechanisms in IBD patients.

5.5. Reticulocyte distribution width

Reticulocyte Distribution Width (RDWR) is a new generation reticulocyte index, which is automatically reported in the new technology hematology analyzers. It can be presented as RDWR-CV (Coefficient of Variation) and RDWR-SD (Standard Deviation). RDWR-SD is the standard deviation of the retic volume multiplied by the volume factor and is expressed in femptoliters (fL). RDWR-CV is the ratio of RDWR-SD and the retic volume mean (MRV) multiplied by 100 and is expressed as percentage. Both RDWR-SD and RDWR-CV are derived from

the reticulocyte histogram. RDWR is an indication of the size dispersion within the reticulocyte population.⁹³

In a recent study both indices were found to be significantly increased in patients with CD and UC, compared to HC ($p < 0.0001$).⁸⁴ RDWR-CV only was significantly negatively correlated with Tsat and positively with sTfR. In addition, RDWR-CV was significantly higher in patients with IDA compared with patients with other causes of anemia and patients without anemia. The sensitivity of high values of RDWR-CV for diagnosis of IDA was 60% and the specificity was 51%. It seems that RDWR and reticulocyte number play a similar role for reticulocytes as RBC count and RDW play for red blood cells. Both RDWR-SD and RDWR-CV were significantly correlated with disease activity and CRP.

6. Conclusions

A great challenge for the IBD practitioner is to combine traditional/conventional anemia markers with the new generation parameters, in order to achieve the highest diagnostic yield of anemia, in patients with IBD (Fig. 2). Anemia is a rather complex manifestation of IBD, due to the mixed type of IDA and ACD.

From the conventional markers, serum iron remains an unreliable index for the diagnosis of IDA, because it is affected by a variety of factors. Ferritin, seems to play a central role in the definition and diagnosis of anemia in IBD and, in combination with other parameters, remains a cornerstone of the diagnosis of IDA, with or without ACD. TRF is superior to serum iron or Tsat but not better than ferritin in diagnosis of IDA; however, it can be used with other markers to detect patients who can profit from combination therapy with iron and erythropoietin. Tsat is a classic marker of anemia, giving indirect information of the extent of iron use in the bone marrow, although it does not provide information about the condition of iron stores. It is included in the definition of anemia in IBD, as well as in the minimum workup, in anemic patients with IBD. sTfR indicate marrow erythropoietic activity and reflect tissue IDA; remains useful in the differential diagnosis between IDA and ACD, but is expensive and not always available.

Iron metabolism regulators, hepcidin and prohepcidin, are still under investigation for their role in the anemia of IBD, they seem to play a central role in the development of it, but they are rather inadequate to distinguish IDA from ACD.

In the group of erythrocyte parameters, RDW is a classic and very strong marker for diagnosis of IDA, with good values of sensitivity and specificity, but not very useful in differential diagnosis, remaining a rather general marker of abnormality. Percentage of hypochromic red cells and zinc protoporphyrin are not validated in patients with IBD, with the former still being unclear from the supporting literature whether it is better or worse than ChR in diagnosing functional IDA. A recently described mathematic model⁹⁴ suggesting new ways of diagnosing and predicting IDA, with the use of erythrocyte parameters, could be evaluated in IBD.

As far as the new generation reticulocytes parameters are concerned (MRV, ChR, IRF, RSF and RDWR), the literature about their role in the anemia of IBD is very limited, but some

Please cite this article as: Oustamanolakis P, et al, Diagnosing anemia in inflammatory bowel disease: Beyond the established markers, *Journal of Crohn's and Colitis* (2011), doi:10.1016/j.j.crohns.2011.03.010

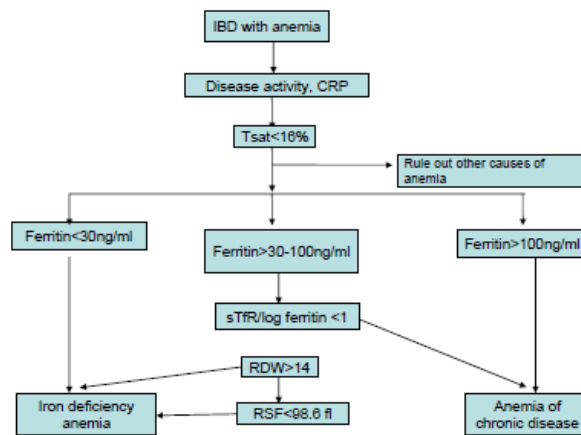


Figure 2 Algorithm for the differentiation of iron deficiency anemia from anemia of chronic disease in inflammatory bowel disease (IBD). Tsat, Transferrin saturation; sTfR, soluble transferrin receptor; CRP, C-reactive protein; RDW, red cell distribution width; RSF, Red blood cell size factor.

of them seem very promising in the evaluation of the anemia in patients with IBD, while others may have a role in reflecting anemia mechanisms. In any case, large studies are needed in order to validate them in everyday clinical practice.

References

- Gasche C, Lomer MCE, Cavill I, Weiss G. Iron, anemia, and inflammatory bowel diseases. *Gut* 2004;53:1190-7.
- Bergamaschi G, Di Sabatino A, Albertini R, Ardizzone S, Biancheri P, Bonetti E, et al. Prevalence and pathogenesis of anemia in inflammatory bowel disease. Influence of anti-tumor necrosis factor- α treatment. *Haematologica* 2010;95:199-205.
- Gomollón F, Gisbert JP. Anaemia and inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2009;15:4659-65.
- Weiss G, Gasche C. Pathogenesis and treatment of anemia in inflammatory bowel disease. *Haematologica* 2010;95:175-8.
- Horina JH, Petritsch W, Schmid CR, Reich G, Wenzl H, Silly H, et al. Treatment of anemia in inflammatory bowel disease with recombinant human erythropoietin: results in three patients. *Gastroenterology* 1993;104:1828-31.
- Demirtürk L, Hülagü S, Yaylaci M, Altın M, Ozel M. Serum erythropoietin levels in patients with severe anemia secondary to inflammatory bowel disease and the use of recombinant human erythropoietin in patients with anemia refractory to treatment. *Dis Colon Rectum* 1995;38:896-7.
- Schreiber S, Howaldt S, Schnoor M, Nikolaus S, Bauditz J, Gasché C, et al. Recombinant erythropoietin for the treatment of anemia in inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 1996;334:619-23.
- Koutroubakis IE, Karmiris K, Makreas S, Xidakis C, Niniraki M, Kouroumalis EA. Effectiveness of darbepoetin- α in combination with intravenous iron sucrose in patients with inflammatory bowel disease and refractory anaemia: a pilot study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006;18:421-5.
- Moreno López R, Sicilia Aladrén B, Gomollón García F. Use of agents stimulating erythropoiesis in digestive diseases. *World J Gastroenterol* 2009;15:4675-85.
- Tsiolakidou G, Koutroubakis IE. Stimulating erythropoiesis in inflammatory bowel disease associated anemia. *World J Gastroenterol* 2007;13:4798-806.
- Kulnigg S, Gasche C. Systematic review: managing anemia in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;24:1507-23.
- Wells CW, Lewis S, Barton JR, Corbett S. Effects of changes in hemoglobin level on quality of life and cognitive function in inflammatory bowel disease patients. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:123-30.
- Zhu A, Kaneshiro M, Kaunitz JD. Evaluation and treatment of iron deficiency anemia: a gastroenterological perspective. *Dig Dis Sci* 2010;55:548-59.
- Iron metabolism: biologic and molecular aspects. In: Crichton RR, Danielson BG, Geisser P, editors. *Iron Therapy with Special Emphasis on Intravenous Administration*. 2nd edn. Bremen: UNI-MED; 2005. p. 14.
- Hamilton LD, Gubler CJ, Cartwright GE, Wintrobe MM. Diurnal variation in the plasma iron level of man. *Proc Soc Exp Biol Med* 1964;61:44.
- Speck B. Diurnal variation of serum iron and the latent iron binding capacity in normal adults. *Helv Med Acta* 1968;34:231.
- Fairbanks VF, Beutler E. Iron deficiency. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, editors. *Williams Hematology*. 5th edn. USA: McGraw-Hill; 1995. p. 498.
- Zilva JF, Patston VJ. Variations in serum-iron in healthy women. *Lancet* 1966;1:459-62.
- Fujino M, Dawson EB, Hdeleman T, McGarity WJ. Interrelationships between estrogenic activity, serum iron and ascorbic acid levels during the menstrual cycle. *Am J Clin Nutr* 1966;18:256-60.
- Cartwright GE. The anemia of chronic disorders. *Semin Hematol* 1966;3:351-75.
- Bainton DF, Finch CA. The diagnosis of iron deficiency anemia. *Am J Med* 1964;37:62-70.

Please cite this article as: Oustamanolakis P, et al, Diagnosing anemia in inflammatory bowel disease: Beyond the established markers, *Journal of Crohns and Colitis* (2011), doi:10.1016/j.crohns.2011.03.010

22. Banerjee RN, Narang RM. Haematological changes in malignancy. *Br J Haematol* 1967;13:829-43.
23. Handjani AM, Banihashemi A, Rafiee R, Tolou H. Serum iron in acute myocardial infarction. *Blut* 1971;23:363-6.
24. Syrkis I, Machtey I. Hypoferremia in acute myocardial infarction. *J Am Geriatr Soc* 1973;21:28-30.
25. Iron metabolism: biologic and molecular aspects. In: Crichton RR, Danielson BG, Geisser P, editors. *Iron Therapy with Special Emphasis on Intravenous Administration*. 2nd edn. Bremen: UNI-MED; 2005. p. 16-7.
26. Laboratory evaluation of iron status. In: Crichton RR, Danielson BG, Geisser P, editors. *Iron Therapy with Special Emphasis on Intravenous Administration*. 2nd edn. Bremen: UNI-MED; 2005. p. 26-7.
27. Walters GO, Miller FM, Worwood M. Serum ferritin concentration and iron stores in normal subjects. *J Clin Pathol* 1973;26:770-2.
28. Guyatt GH, Oxman AD, Ali M, Willan A, McIroy W, Patterson C. Laboratory diagnosis of iron-deficiency anemia: an overview. *J Gen Intern Med* 1992;7:145-53.
29. Mast AE, Blinder MA, Gronowski AM, Chumley C, Scott MG. Clinical utility of the soluble transferrin receptor and comparison with serum ferritin in several populations. *Clin Chem* 1998;44:45-51.
30. Kis AM, Carnes M. Detecting iron deficiency in anemic patients with concomitant medical problems. *J Gen Intern Med* 1998;13:455-61.
31. Sawhney MS, Lipato T, Nelson DB, Lederle FA, Rector TS, Bond JH. Should patients with anemia and low normal or normal serum ferritin undergo colonoscopy? *Am J Gastroenterol* 2007;102:82-8.
32. Coenen JL, vanDieijen-Viser MP, van Pelt J, van Deursen CT, Fickers MM, van Wersch JW, et al. Measurements of serum ferritin used to predict concentrations of iron in bone marrow in anemia of chronic disease. *Clin Chem* 1991;37:560-3.
33. Koulaouzidis A, Said E, Cottier R, Saeed AA. Soluble transferrin receptors and iron deficiency, a step beyond ferritin. A systematic review. *J Gastrointest Liver Dis* 2009;18:345-52.
34. Guagnozzi D, Severi C, Ialongo P, Viscido A, Patrizi F, Testino G, et al. Ferritin as a simple indicator of iron deficiency in anemic IBD patients. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:150-1.
35. Gasche C, Berstad A, Befrits R, Beglinger C, Dignass A, Erichsen K, et al. Guidelines on the diagnosis and management of iron deficiency and anemia in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:1545-53.
36. Lee KM, Sartor RB. Oral iron potentiates immune-mediated colitis in IL-10 deficient mice. *Gastroenterology* 2007;132:A701.
37. Weiss G, Goodnough LT. Anemia of chronic disease. *N Engl J Med* 2005;352:1011-23.
38. Iron metabolism: biologic and molecular aspects. In: Crichton RR, Danielson BG, Geisser P, editors. *Iron Therapy with Special Emphasis on Intravenous Administration*. 2nd edn. Bremen: UNI-MED; 2005. p. 15-6.
39. Kasvosve I, Delanghe J. Total iron binding capacity and transferrin concentration in the assessment of iron status. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:1014-8.
40. Hawkins RC. Total iron binding capacity or transferrin concentration alone outperforms iron and saturation indices in predicting iron deficiency. *Clin Chim Acta* 2007;380:203-7.
41. Shek CC, Swaminathan R. A cost effective approach to the biochemical diagnosis of iron deficiency. *J Med* 1990;21:313-22.
42. Withold W, Neumayer C, Beyrau R, Heins M, Schauseil S, Rick W. Efficacy of transferrin determination in human sera in the diagnosis of iron deficiency. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1994;32:19-25.
43. Ravindran V, Jain S, Mathur DS. The differentiation of anaemia in rheumatoid arthritis: parameters of iron-deficiency in an Indian rheumatoid arthritis population. *Rheumatol Int* 2008;28:507-11.
44. Gasche C, Waldhoer T, Feichtenschlager T, Male C, Mayer A, Mittermaier C, et al. Prediction of response to iron sucrose in inflammatory bowel disease-associated anemia. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2382-7.
45. Stein J, Hartmann F, Dignass AU. Diagnosis and management of iron deficiency anemia in patients with IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;7:599-610.
46. Wish JB. Assessing iron status: beyond serum ferritin and transferrin saturation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006;1:54-8.
47. Fishbane S, Kowalski EA, Imbriano LJ, Maesaka JK. The evaluation of iron status in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 1996;7:2654-7.
48. Tessitore N, Solero GP, Lippi G, Bassi A, Faccini GB, Bedogna V, et al. The role of iron status markers in predicting response to intravenous iron in haemodialysis patients on maintenance erythropoietin. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:1416-23.
49. Kalantar-Zadeh K, Hoffken B, Wunsch H, Fink H, Kleiner M, Luft FC. Diagnosis of iron deficiency anemia in renal failure patients during the post-erythropoietin era. *Am J Kidney Dis* 1995;26:292-9.
50. Laboratory evaluation of iron status. In: Crichton RR, Danielson BG, Geisser P, editors. *Iron Therapy with Special Emphasis on Intravenous Administration*. 2nd edn. Bremen: UNI-MED; 2005. p. 29.
51. Clark SF. Iron deficiency anemia: diagnosis and management. *Curr Opin Gastroenterol* 2009;25:122-8.
52. Beguin Y. Soluble transferrin receptor for the evaluation of erythropoiesis and iron status. *Clin Chim Acta* 2003;329:9-22.
53. Thomas L, Thomas C. Anemia in iron deficiency and disorders of iron metabolism. *Dtsch Med Wochenschr* 2002;127:1591-4.
54. Fernandez-Rodriguez AM, Guindeo-Casasús MC, Molero-Labarta T, Dominguez-Cabrera C, Hortal-Casc nL, Pérez-Borges P, et al. Diagnosis of iron deficiency in chronic renal failure. *Am J Kidney Dis* 1999;34:508-13.
55. Hanif E, Ayyub M, Anwar M, Ali W, Bashir M. Evaluation of serum transferrin receptor concentration in diagnosing and differentiating iron deficiency anaemia from anaemia of chronic disorders. *J Pak Med Assoc* 2005;55:13-6.
56. Jain S, Narayan S, Chandra J, Shama S, Jain S, Malhan P. Evaluation of serum transferrin receptor and sTFR ferritin indices in diagnosing and differentiating iron deficiency anemia from anemia of chronic disease. *Indian J Pediatr* 2010;77:179-83.
57. Punnonen K, Irajala K, Rajamaki A. Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency. *Blood* 1997;89:1052-7.
58. Peyssonnaud C, Zinkernagel AS, Datta V, Lauth X, Johnson RS, Nizet V. TLR4-dependent hepcidin expression by myeloid cells in response to bacterial pathogens. *Blood* 2006;107:3727-32.
59. Liu XB, Nguyen NB, Marques KD, Yang F, Haile DJ. Regulation of hepcidin and ferroportin expression by lipopolysaccharide in splenic macrophages. *Blood Cells Mol Dis* 2005;35:47-56.
60. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 2004;306:2090-3.
61. Delaby C, Pilard N, Gonçalves AS, Beaumont C, Canonne-Hergaux F. Presence of the iron exporter ferroportin at the plasma membrane of macrophages is enhanced by iron loading and down-regulated by hepcidin. *Blood* 2005;106:3979-84.
62. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is over-expressed during iron overload. *J Biol Chem* 2001;276:7811-9.
63. Kerma E, Tjalsma H, Laarakkers C, Nemeth E, Willems H, Swinkels D. Novel urine hepcidin assay by mass spectrometry. *Blood* 2005;106:3268-70.
64. Ganz T. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood* 2003;102:783-8.

Please cite this article as: Oustamanolakis P, et al. Diagnosing anemia in inflammatory bowel disease: Beyond the established markers. *Journal of Crohn's and Colitis* (2011), doi:10.1016/j.crohns.2011.03.010

65. Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan JL, Bigard X, Devaux I, et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest* 2002;110:1037–44.
66. Ganz T. Hepcidin and its role in regulating systemic iron metabolism. Hematology 2006. The American Society of Hematology (ASH) Education Program Book Washington, DC: ASH publications; 2006. p. 29–35.
67. Fleming MD. The regulation of hepcidin and its effects on systemic and cellular iron metabolism. Hematology 2008. The American Society of Hematology (ASH) Education Program Book Washington, DC: ASH publications; 2008. p. 151–8.
68. Pietrangelo A, Trautwein C. Mechanisms of disease: the role of hepcidin in iron homeostasis—implications for hemochromatosis and other disorders. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2004;1:39–45.
69. Semrin G, Fishman DS, Bousvaros A, Zhouldev A, Saunders AC, Correia CE, et al. Impaired intestinal iron absorption in Crohn's disease correlates with disease activity and markers of inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:1101–6.
70. Arnold J, Sangwaiya A, Bhatkal B, Geoghegan F, Busbridge M. Hepcidin and inflammatory bowel disease: dual role in host defence and iron homeostasis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009;21:425–9.
71. Oustamanolakis P, Koutroubakis IE, Messaritakis I, Malliaraki N, Sfiridaki A, Kouroumalis EA. Serum hepcidin and prohepcidin concentrations in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011;23:262–8.
72. Kroot JJ, Kemna EH, Bansal SS, Busbridge M, Camprostrini N, Girelli D, et al. Results of the first international round robin for the quantification of urinary and plasma hepcidin assays: need for standardization. *Haematologica* 2009;94:1748–52.
73. Luukkonen S, Punnonen K. Serum pro-hepcidin concentrations and their responses to oral iron supplementation in healthy subjects manifest considerable inter-individual variation. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:1361–2.
74. Beirão I, Almeida S, Swinkels D, Costa PM, Moreira L, Fonseca I, et al. Low serum levels of prohepcidin, but not hepcidin-25, are related to anemia in familial amyloidosis TTR V30M. *Blood Cells Mol Dis* 2008;41:175–8.
75. Sasu BJ, Li H, Rose MJ, Arvedson TL, Doellgast G, Molineux G. Serum hepcidin but not prohepcidin may be an effective marker for anemia of inflammation (AI). *Blood Cells Mol Dis* 2010;45:238–45.
76. Kaya Z, Yıldız E, Gursel T, Albayrak M, Kocak U, Karadeniz C, et al. Serum prohepcidin levels in children with solid tumors, inflammatory bowel disease and iron deficiency anemia. *J Trop Pediatr* 2011;57:120–5.
77. Nagy J, Lakner L, Poor V, Pandur E, Mozsik G, Miseta A, et al. Serum prohepcidin levels in chronic inflammatory bowel diseases. *J Crohns Colitis* 2010;4:649–53.
78. Briggs C. Quality counts: new parameters in blood cell counting. *Int J Lab Hematol* 2009;31:277–97.
79. Bessman JD, Gilmer PR, Gardner FH. Improved classification of anemias by MCV and RDW. *Am J Clin Pathol* 1983;80:322–6.
80. Buttarello M, Plebani M. Automated blood cell counts: state of the art. *Am J Clin Pathol* 2008;130:104–16.
81. Brittenham GM, Koepke JA. Red blood cell volume distributions and the diagnosis of anemia: help or hindrance? *Arch Pathol Lab Med* 1987;111:1146–8.
82. Cakal B, Akoz AG, Ustundag Y, Yalinkiic M, Ulker A, Ankarali H. Red cell distribution width for assessment of activity of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2009;54:842–7.
83. Clarke K, Sagunathy R, Kansal S. RDW as an additional marker in inflammatory bowel disease/undifferentiated colitis. *Dig Dis Sci* 2008;53:2521–3.
84. Oustamanolakis P, Koutroubakis IE, Messaritakis I, Kefalogiannis G, Niniraki M, Kouroumalis EA. Measurement of reticulocyte and red blood cell indices in the evaluation of anemia in inflammatory bowel disease. *J Crohn's Colitis* 2011. doi:10.1016/j.crohns.2011.02.002.
85. Hört WH, Cavill I, MacDougall IC, Schaefer RM, Sunder-Plassmann G. How to diagnose and correct iron deficiency during r-huEPO therapy – a consensus report. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:246–50.
86. Schaefer RM, Schaefer L. The hypochromic red cell: a new parameter for monitoring of iron supplementation during rhEPO therapy. *J Perinat Med* 1995;23:83–8.
87. Chuang CL, Liu RS, Wei YH, Huang TP, Tamg DC. Early prediction of response to intravenous iron supplementation by reticulocyte haemoglobin content and high-fluorescence reticulocyte count in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:370–7.
88. Metzgeroth G, Hastka J. Diagnostic work-up of iron deficiency. *J Lab Med* 2004;28:391–9.
89. Scrimgeour AG, Condlin ML. Zinc and micronutrient combinations to combat gastrointestinal inflammation. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2009;12:653–60.
90. Davis BH. Report on the ISLH-sponsored immature reticulocyte fraction (IRF) workshop. *Lab Hematol* 1997;3:261–3.
91. Urrechaga E. Clinical utility of the new Beckman–Coulter parameter red blood cell size factor in the study of erythropoiesis. *Int J Lab Hematol* 2009;31:623–9.
92. Urrechaga E, Borque L, Escanero JF. Analysis of reticulocyte parameters on the Sysmex XE 5000 and LH 750 analyzers in the diagnosis of inefficient erythropoiesis. *Int J Lab Hematol* 2011;33:37–44.
93. Beckman–Coulter bulletin 9618: Research use only (RUO) options for Coulter LH series hematology systems. Beckman Coulter Inc. 2006. www.beckmancoulter.com.
94. Higgins JM, Mahadevan L. Physiological and pathological population dynamics of circulating human red blood cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:20587–92.

Please cite this article as: Oustamanolakis P, et al, Diagnosing anemia in inflammatory bowel disease: Beyond the established markers, *Journal of Crohns and Colitis* (2011), doi:10.1016/j.crohns.2011.03.010

Συμπλήρωμα

Μέρος 4ο

Βιογραφικό σημείωμα συγγραφέα

Προσωπικά Στοιχεία

Όνοματεπώνυμο: Παντελεήμων Ουσταμανωλάκης του Ιωάννη

Ημερομηνία γέννησης: 20 Μαρτίου 1974

Τόπος γέννησης: Αθήνα, Αττικής

Οικογενειακή κατάσταση: Έγγαμος με την Αικατερίνη Μπουμπάκη, ιατρό Ενδοκρινολόγο.
Τέκνα: Μία κόρη, Κατερίνα-Ελένη, γεννηθείσα το 2009.

Ταχυδρομική διεύθυνση οικίας: Τεγέας 8, Τ.Κ. 71409, Ηράκλειο, Κρήτη, Ελλάδα

Τηλ. οικίας: +302810213068, **Κινητό:** +306972075958

e-mail: oustapan@gmail.com

Προ-Πανεπιστημιακή εκπαίδευση

1. Απόφοιτος του 2^{ου} Γενικού Λυκείου Ηρακλείου, 1991
2. Ξένες γλώσσες: First Certificate in English, 1988

Πανεπιστημιακή εκπαίδευση

1. Φοίτηση στα δύο πρώτα έτη του τμήματος Βιολογίας, Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Κρήτης, 1991-1993
2. Απόφοιτος τμήματος Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, 1993-1999, Βαθμός: «Λίαν Καλώς»

Επαγγελματική απασχόληση & Μεταπτυχιακή ιατρική εκπαίδευση

1. Έμμισθη 3μηνη υποχρεωτική εκπαίδευση στο Βενιζέλειο- Πανάνειο Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου (ΒΠΓΝΗ), στις ειδικότητες Παθολογίας, Καρδιολογίας, Χειρουργικής, 9/1999-12/1999
2. Υπηρεσία Υπαίθρου στο Π.Ι. Μεταξοχωρίου του Κ.Υ. Χάρακα, Νομού Ηρακλείου, 12/1999- 12/2000
3. Στρατιωτική θητεία 12 μηνών στην Πολεμική Αεροπορία, ως Ιατρός Μονάδος, 5/2001- 5/2002
4. Ειδίκευση στην Παθολογία, Β' Παθολογική Κλινική του ΒΠΓΝΗ, διάρκειας 21 μηνών, 5/2002-2/2004, Δ/ντής: Θ. Αποστολάκης

5. Υπεράριθμος ειδικευόμενος ιατρός στο Ογκολογικό Τμήμα του ΒΠΓΝΗ, 2004-2004 (3 μήνες), Δ/ντής: Σ. Τσούσης
6. Υπεράριθμος ειδικευόμενος ιατρός στο Αιματολογικό Τμήμα του ΒΠΓΝΗ, 2004-2005 (7 μήνες), Δ/ντής: Π. Ηλιάκης
7. Υπεράριθμος ειδικευόμενος ιατρός στο Γαστρεντερολογικό Τμήμα του ΒΠΓΝΗ, 2005-2006 (18 μήνες), Δ/ντής: Γ. Πασπάτης

Εκπαίδευση στη Γαστρεντερολογία- Ηπατολογία

4ετής ειδίκευση στη Γαστρεντερολογία- Ηπατολογία, στη Γαστρεντερολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου (ΠαΓΝΗ), υπό τη Διεύθυνση του Καθ. Η. Κουρούμαλη, 6/2006- 6/2010. Αριθμός απόφασης χορήγησης τίτλου ιατρικής ειδικότητας: 6625/30-9-2010, Ν.Α. Ηρακλείου

Μετεκπαιδευτική εξειδίκευση

Εξειδίκευση διάρκειας 12 μηνών (2/2011-2/2012), με υποτροφία από την Ελληνική Γαστρεντερολογική Εταιρεία, στο πεδίο της νευρογαστρεντερολογίας και κινητικών και λειτουργικών διαταραχών του πεπτικού συστήματος, στο *Clinical neurogastroenterology and motility unit, Department of Pathophysiology, Translational Research Center for Gastrointestinal Disorders (TARGID), Katholieke Universiteit Leuven, Belgium* (www.targid.eu), υπό τη διεύθυνση του Prof. Dr. Jan Tack.

Οργάνωση σεμιναρίων-συμποσίων-συνεδρίων

1. Μέλος της Οργανωτικής Επιτροπής του Συμποσίου: «Καρκίνος του Παχέος Εντέρου», Ηράκλειο, Κρήτη, 2006. Οργάνωση: Ογκολογικό Τμήμα του ΒΠΓΝΗ.
2. Μέλος της Οργανωτικής Επιτροπής του Συμποσίου: «Καταστολή στην ενδοσκόπηση», Ελούντα, Κρήτη, 2007. Οργάνωση: Γαστρεντερολογικό Τμήμα του ΒΠΓΝΗ.
3. Μέλος της Οργανωτικής Επιτροπής του Πανελληνίου Συμποσίου: «Πρόληψη της υποτροπής στον αλκοολισμό», Ηράκλειο, Κρήτη, 2010. Οργάνωση: Διεπιστημονικό Κέντρο Αλκοολογίας- Γαστρεντερολογική Κλινική ΠαΓΝΗ.

1. Εκπαίδευση στη λήψη ιατρικού ιστορικού, κλινικής εξέτασης, διάγνωσης και θεραπείας των παθήσεων του γαστρεντερικού συστήματος, σε προπτυχιακούς φοιτητές Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Κρήτης, 2006-2009
2. Προσκεκλημένος ομιλητής στα μεταπτυχιακά μαθήματα ειδικευομένων του Γαστρεντερολογικού Τμήματος του ΒΠΓΝΗ, Ηράκλειο, 2009
3. Παρουσίαση διαλέξεων στα μετεκπαιδευτικά μαθήματα ειδικευομένων της Γαστρεντερολογικής Κλινικής του ΠαΓΝΗ, 2006-2010
4. Προσκεκλημένος ομιλητής στα «Μετεκπαιδευτικά Μαθήματα Χειρουργικής Παθολογίας του Παχέος Εντέρου» (ενότητα: ΙΦΕΝ), Δελφοί, 2007. Οργάνωση: Ε. Ξυνός, Αν. Καθ. Χειρουργικής, Παν. Κρήτης.
5. Προσκεκλημένος ομιλητής: «Νέες μέθοδοι στη διερεύνηση του ΓΕΣ: ο ρόλος της ενδοσκόπησης», 28^ο Δήμερο Ιατρικό Συνέδριο, Λεμεσός, Κύπρος, 2007. Οργάνωση: Ιατρικός Σύλλογος Λεμεσού.
6. Προσκεκλημένος ομιλητής στα «Μετεκπαιδευτικά Μαθήματα Χειρουργικής Παθολογίας του Παχέος Εντέρου» (ενότητα: ΙΦΕΝ), Καμένα Βούρλα, 2008. Οργάνωση: Ε. Ξυνός, Αν. Καθ. Χειρουργικής, Παν. Κρήτης.
7. Προσκεκλημένος ομιλητής στο σεμινάριο «Αλκοολισμός για το γενικό πληθυσμό», Νεάπολη, Λασιθίου, Κρήτη, 2009. Οργάνωση: Κέντρο Αλκοολογίας Ηρακλείου Κρήτης.
8. Προσκεκλημένος ομιλητής στο σεμινάριο «Αλκοολισμός για το δάσκαλο- διδάσκοντας για το αλκοόλ στις ηλικίες 6-12 ετών», Ηράκλειο, Κρήτη, 2009. Οργάνωση: Κέντρο Αλκοολογίας Ηρακλείου Κρήτης.
9. Προσκεκλημένος ομιλητής στο σεμινάριο «Κλινικό Σεμινάριο ΙΦΕΝ», Ηράκλειο, Κρήτη, 2010. Οργάνωση: Schering-Plough.

1. Συμμετοχή ως ερευνητής στη μελέτη: “Double-blind, Double-dummy, Randomized, Multicentre Study to Compare the Efficacy and Safety of Oral Budesonide (9 mg) and Oral Mesalazine (4.5 g) in Moderately Active Crohn's Disease Patients” (NCT ID: NCT00300118), Πρωτόκολλο BUC-52/CDA (mc320), Dr. Falk Pharma GmbH
2. Συμμετοχή ως ερευνητής στη μελέτη: «Επίδραση της αναστολής του TNF-α με Infliximab, στην αντίσταση στην ινσουλίνη και στα επίπεδα

λιπιδίων, σε ασθενείς με Ιδιοπαθή Φλεγμονώδη Εντεροπάθεια». Γαστρεντερολογική Κλινική ΠαΓΝΗ.

3. Συμμετοχή ως ερευνητής στη μελέτη: «Ασφάλεια και αποτελεσματικότητα της ολικής δόσης σιδηροδεξτράνης στην αντιμετώπιση της σιδηροπενικής αναιμίας σε ασθενείς με ιδιοπαθή φλεγμονώδη εντεροπάθεια (ΙΦΕΝ)». Γαστρεντερολογική Κλινική ΠαΓΝΗ.
4. Συμμετοχή ως ερευνητής στη μελέτη: «Ασφάλεια και αποτελεσματικότητα της ενδοφλέβιας χορήγησης καρβοξυμαλτοζικού σιδήρου (Ferinject®), σε Έλληνες ασθενείς με σιδηροπενική αναιμία και ιδιοπαθή φλεγμονώδη εντεροπάθεια». Γαστρεντερολογική Κλινική ΠαΓΝΗ.

Πλήρεις δημοσιεύσεις σε peer-reviewed περιοδικά

1. Paspatis GA, Paraskeva K, Theodoropoulou A, Mathou N, Vardas E, **Oustamanolakis P**, Chlouverakis G, Karagiannis I. A prospective, randomized comparison of adrenaline injection in combination with detachable snare versus adrenaline injection alone in the prevention of postpolypectomy bleeding in large colonic polyps. *Am J Gastroenterol*. 2006 Dec;101(12):2805
2. Charoniti I, Theodoropoulou A, Vardas E, **Oustamanolakis P**, Manolaraki M, Ieromonachou P, Anastasiadou A, Paspatis GA. Combination of adrenaline injection and detachable snare application as haemostatic preventive measures, before polypectomy of large colonic polyps in children. *Dig Dis Sci*. 2007 Dec;52(12):3381-2.
3. Manolaraki MM, Theodoropoulou A, Stroumpos C, Vardas E, **Oustamanolakis P**, Gritzali A, Chlouverakis G, Paspatis GA. Remifentanyl compared with midazolam and pethidine sedation during colonoscopy: a prospective, randomized study. *Dig Dis Sci*. 2008 Jan;53(1):34-40.
4. Theodoropoulou A, Sfiridaki A, **Oustamanolakis P**, Vardas E, Livadiotaki A, Boumpaki A, Paspatis G, Koutroubakis IE. Genetic risk factors in young patients with ischemic colitis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008 Aug;6(8):907-11.
5. Koutroubakis IE, **Oustamanolakis P**, Malliaraki N, Karmiris K, Chalkiadakis I, Ganotakis E, Karkavitsas N, Kouroumalis EA. Effects of tumor necrosis factor alpha inhibition with infliximab on lipid levels and insulin resistance in patients with inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2009 Mar;21(3):283-8.
6. Koutroubakis IE, **Oustamanolakis P**, Karakoidas C, Mantzaris GJ, Kouroumalis EA. Safety and Efficacy of Total-Dose Infusion of Low Molecular Weight Iron Dextran for Iron Deficiency Anemia in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Dig Dis Sci*. 2010; 55(8): 2327-31.

7. **Oustamanolakis P** and Koutroubakis IE. New desensitization regimen with mesalamine granules in a patient with ulcerative colitis and mesalamine intolerance. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17(2):E8-E9.
8. Koutroubakis IE, Drygiannakis D, Tsirogianni A, **Oustamanolakis P**, Karmiris K, Papamichael K, Mantzaris G J, Kouroumalis EA. Antigliyan Antibodies in Greek patients with Inflammatory Bowel Disease. *Digestive Diseases and Sciences*, DOI: 10.1007/s10620-010-1328-9
9. **Oustamanolakis P**, Koutroubakis IE, Messaritakis I, Malliaraki N, Sfiridaki A, Kouroumalis EA. Serum hepcidin and prohepcidin concentrations in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2011;23(3):262-268.
10. **Oustamanolakis P**, Koutroubakis IE, Messaritakis I, Kefalogiannis G, Niniraki M, Kouroumalis EA. Measurement of reticulocyte and red blood cell indices in the evaluation of anemia in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis.* 2011;5(4):295-300.
11. **Oustamanolakis P**, Koutroubakis IE, Kouroumalis EA. Diagnosing anemia in Inflammatory Bowel Disease: Beyond the established markers. *J Crohn's Colitis*, 2011, doi: 10.1016/j.crohns.2011.03.010.
12. **Oustamanolakis P**, Koutroubakis IE. Soluble transferrin receptor-ferritin index is the most efficient marker for the diagnosis of iron deficiency anemia in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2011; in press.

Δημοσιεύσεις σε Ελληνικά περιοδικά

1. Γενετζάκης Μ, **Ουσταμανολάκης Π**, Πισταμαλτζιάν Ν. Τεχνητή γονιμοποίηση: Υπάρχει δικαίωμα αναπαραγωγής; *Αρχαία Ελληνικής Ιατρικής* 1997, 14(2):202-211
2. **Oustamanolakis P**, Koutroubakis IE, Messaritakis I, Niniraki M, Kouroumalis EA. Soluble transferrin receptor- ferritin index in the evaluation of anemia in inflammatory bowel disease: a case-control study. *Ann Gastroenterol* 2011;24(2):110-116

Υποβληθείσες δημοσιεύσεις σε peer-reviewed περιοδικά

1. Samonakis DN, **Oustamanolakis P**, Manousou P, Kouroumalis EA, Burroughs AK. Body Asymmetry and Thrombosis. *Submitted.*

2. **Oustamanolakis P**, Tack J. Dyspepsia: organic vs functional. Review. Submitted.
3. **Oustamanolakis P**, Janssen P, Verbeke K, Tack J. Gastric emptying, gastric accommodation, satiation and return of hunger: comparison of soy and cow's milk. Submitted.

Ανακοινώσεις σε Διεθνή Συνέδρια

1. Papanikolaou NC, Charalambous EG, **Oustamanolakis P**, Klados G, Farsaraki E, Vassilogiannaki S, Neonaki F, Kissamitaki V. Plasma Homocysteine in Cretan patients with stroke. 5th Int. Congress on Coronary Artery Disease, Florence, 2003. **Abstract: Journal of Coronary Artery Disease. 2003;5,1:46**
2. Papanikolaou NC, Charalambous EG, **Oustamanolakis P**, Klados G, Vassilogiannaki S, Neonaki F, Farsaraki E, Kyriakakis E. Apolipoproteins B, A-1 and Lp(A) in Cretan patients with acute ischemic stroke. 5th Int. Congress on Coronary Artery Disease, Florence, 2003. **Abstract: Journal of Coronary Artery Disease. 2003;5,1:121-122**
3. Paspatis GA, Paraskeva K, Theodoropoulou A, Mathou N, Vardas E, **Oustamanolakis P**, Chlouverakis G, Karagiannis I. A prospective, randomized comparison of adrenaline injection in combination with detachable snare versus adrenaline injection alone in the prevention of postpolypectomy bleeding in large colonic polyps. BSG Annual Meeting, 2006, Birmingham. **Abstract: Gut. 2006;55(Suppl II):A4**
4. Manolaraki M, Paspatis GA., Vardas E, Theodoropoulou A, **Oustamanolakis P**, Gritzali A, Anastasiadou A. Remifentanil versus midazolam and pethidine sedation during colonoscopy: a prospective, randomized study. BSG Annual Meeting, 2006, Birmingham. **Abstract: Gut. 2006;55(Suppl II):A37**
5. Manolaraki M, Vardas E, Theodoropoulou A, **Oustamanolakis P**, Gritzali A, Anastasiadou A, Paspatis GA. Remifentanil versus midazolam and pethidine sedation during colonoscopy: a prospective, randomized study. DDW, 2006, ASGE Postgraduate Course, Los Angeles. **Abstract: Gastrointestinal Endoscopy. 2006;63,5:AB195**
6. Paspatis GA, Paraskeva K, Theodoropoulou A, Mathou N, Vardas E, **Oustamanolakis P**, Chlouverakis G, Karagiannis I. A prospective, randomized comparison of adrenaline injection in combination with detachable snare versus adrenaline injection alone in the prevention of postpolypectomy bleeding in large colonic polyps. DDW, 2006, ASGE Postgraduate Course, Los Angeles. **Abstract: Gastrointestinal Endoscopy. 2006;63,5:AB198**
7. **Oustamanolakis P**, Koutroubakis I, Malliaraki N, Karmiris K, Chalkiadakis I, Ganotakis E, Karkavitsas N, Kouroumalis E. Effects of TNF- α inhibition with Infliximab on lipid levels and insulin resistance

in patients with inflammatory bowel disease. 16th UEGW, Vienna, 2008. **Abstract: Gut. 2008;57(Suppl II):A68 (Travel Grant award)**

8. **Oustamanolakis P**, Koutroubakis IE, Karakoidas C, Mantzaris G, Kouroumalis EA. Safety and efficacy of total dose infusion of low molecular weight iron dextran for iron deficiency anemia in patients with inflammatory bowel disease. GASTRO 2009, UEGW/WCOG, London. **Abstract: Gut. 2009;58(Suppl II):A171**
9. **Oustamanolakis P**, Koutroubakis IE, Karakoidas C, Mantzaris G, Kouroumalis EA. Safety and efficacy of total dose infusion of low molecular weight iron dextran for iron deficiency anemia in patients with inflammatory bowel disease. 4th ECCO Congress, Hamburg, 2009. **Abstract: Journal of Crohn's & Colitis. 2009;3, S58**
10. **Oustamanolakis P**, Koutroubakis IE, Drygiannakis D, Karmiris K, Karampasi A, Bourikas L, Kouroumalis EA. Antiglycan Antibodies in Greek patients with Inflammatory Bowel Disease. 5th ECCO Congress, Prague, 2010. **Abstract: Journal of Crohn's & Colitis. 2010;4, S35**
11. **Oustamanolakis P**, Koutroubakis IE., Messaritakis H, Niniraki M, Kefalogiannis G, Kouroumalis EA. Prevalence of anemia, iron status and erythropoiesis biomarkers in Greek patients with Inflammatory Bowel Disease. 5th ECCO Congress, Prague, 2010. **Abstract: Journal of Crohn's & Colitis. 2010;4, S111**
12. Koulentaki M, Grinakis E, **Oustamanolakis P**, Liodaki N, Stathaki D, Mouzas I. Alcohol outpatient clinic. A 5-years experience in Crete. EASL monothematic conference: Alcoholic liver disease, Athens, Greece, 2010.
13. Grinakis E, Koulentaki M, **Oustamanolakis P**, Liodaki N, Stathaki D, Mouzas I. Alcohol outpatient clinic in University Hospital of Heraklion; an epidemiological overview with outcome results. National Congress of Alcohol Dependence- 1st Meeting of the Lisbon Alcoholism Treatment Unity, Lisbon, Portugal, 2010.
14. **Oustamanolakis P**, Koutroubakis IE, Messaritakis H, Malliaraki N, Sfiridaki A, Kouroumalis EA. Serum hepcidin and prohepcidin concentrations in inflammatory bowel disease. 6th ECCO Congress, Dublin, 2011. **Abstract: Journal of Crohn's & Colitis. 2011;5(1): S47**
15. **Oustamanolakis P**, Koutroubakis IE, Messaritakis H, Kefalogiannis G, Niniraki M, Kouroumalis EA. Measurement of reticulocyte and red blood indices in the evaluation of anemia in inflammatory bowel disease. 6th ECCO Congress, Dublin, 2011. **Abstract: Journal of Crohn's & Colitis. 2011;5(1): S48**
16. **Oustamanolakis P**, Koutroubakis IE, Messaritakis H, Georgousaki C, Terzoudis S, Niniraki M, Kouroumalis EA. Soluble transferrin receptor-ferritin index is the most efficient marker for the evaluation of anemia in inflammatory bowel disease. 19th UEGW, Stockholm, 2011.

1. Πετράκη Κ, Παναγιωτάκης Σ, Τσιράκης Γ, Σταυρουλάκη Α, **Ουσταμανωλάκης Π**, Χρονάκη Ε, Πασπάτης Γ, Κισσαμιτάκη Β. Αιματέμεση. 11^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Χανιά, 2002
2. Μαραγκάκη Σ, Μίχου Ε, Κατσανεβάκη Ζ, **Ουσταμανωλάκης Π**, Καρβουνάρης Σ, Σμυρλάκη Μ, Χαλκιαδάκης Ι, Κυριακάκης Ε, Καντιδάκη Ε, Κόμης Γ. Συχνότητα των ορολογικών δεικτών των HBV και HCV λοιμώξεων στο ιατρικό και νοσηλευτικό προσωπικό γενικού νοσοκομείου. 12^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Ελούντα, 2004
3. Χαλκιαδάκης Ι, Αποστολάκης Σ, **Ουσταμανωλάκης Π**, Δροσίτης Ι, Σλήμαν ΧΜ, Τσούσης Σ. Ωθητικός όγκος σε ασθενή με καρκίνωμα του παχέος εντέρου. Προβληματισμός, επ' ευκαιρία μιας περίπτωσης. 5^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γυναικολογικής Ογκολογίας, Αθήνα, 2005
4. Θεοδωροπούλου Α, Μπουμπάκη Α, Σφυριδάκη Α, **Ουσταμανωλάκης Π**, Βάρδας Ε, Πασπάτης Γ, Κουτρομπάκης Ι. Συγγενείς παράγοντες κινδύνου σε νέους ασθενείς με ισχαιμική κολίτιδα. 27^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Θεσσαλονίκη, 2007. **Περίληψη: Annals of Gastroenterology 2007;20(Suppl):19**
5. **Ουσταμανωλάκης Π**, Μπουρίκας Α, Καρμίρης Κ, Οικονόμου Β, Ρουσσομουστακάκη Μ, Κουτρομπάκης Ι.Ε, Κουρούμαλης Η.Α. Ενδείξεις χορήγησης και αποτελεσματικότητα της Ινφλιξιμάμπης (IFX) σε ασθενείς με Νόσο Crohn στη Γαστρεντερολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου. 27^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Θεσσαλονίκη, 2007. **Περίληψη: Annals of Gastroenterology 2007;20(Suppl):26**
6. Μπουρίκας Α, **Ουσταμανωλάκης Π**, Καρμίρης Κ, Χαλκιαδάκης Ι, Ρουσσομουστακάκη Μ, Κουτρομπάκης Ι.Ε, Κουρούμαλης Η.Α. Αίτια διακοπής και ανεπιθύμητες ενέργειες της θεραπείας με Ινφλιξιμάμπη (IFX) σε ασθενείς με ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις εντερικές νόσους (IFEN). 27^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Θεσσαλονίκη, 2007. **Περίληψη: Annals of Gastroenterology 2007;20(Suppl):26**
7. Καρμίρης Κ, Κουτρομπάκης Ι.Ε, **Ουσταμανωλάκης Π**, Μοσχανδρέα Ι, Κουρούμαλης Η.Α. Προτυποποιημένη προοπτική μελέτη καταγραφής και αξιολόγησης παραγόντων κινδύνου υποτροπής σε ασθενείς με ιδιοπαθή φλεγμονώδη εντερική νόσο (IFEN). 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιδιοπαθών Φλεγμονωδών Νόσων του Εντέρου, Φόδελε, Κρήτη, 2007.
8. Ζαβός Χ, Κουτρομπάκης Ι, Νεραντζουλάκης Ι, Παπαδάκης Γ, **Ουσταμανωλάκης Π**, Βουδούρη Θ, Δαμηλάκης Ι, Κουρούμαλης Η. Παράγοντες κινδύνου μειωμένης οστικής πυκνότητας σε κρητικούς ασθενείς με ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις εντερικές νόσους (IFEN). 7^ο

Πανελλήνιο Συνέδριο Ιδιοπαθών Φλεγμονωδών Νόσων του Εντέρου, Κέρκυρα, 2008

9. **Ουσταμανωλάκης Π**, Κουτρομπάκης Ι, Μαλλιαράκη Ν, Καρμίρης Κ, Χαλκιαδάκης Ι, Μπουρίκας Λ, Καρκαβίτσας Ν, Κουρούμαλης Η. Επίδραση της αναστολής του TNF-α με Infliximab, στην αντίσταση στην ινσουλίνη και στα επίπεδα λιπιδίων, σε ασθενείς με ιδιοπαθή φλεγμονώδη εντεροπάθεια. 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιδιοπαθών Φλεγμονωδών Νόσων του Εντέρου, Κέρκυρα, 2008
10. **Ουσταμανωλάκης Π**, Κουτρομπάκης Ι, Μαλλιαράκη Ν, Καρμίρης Κ, Καρκαβίτσας Ν, Κουρούμαλης Η, Γανωτάκης Ε. Επίδραση της αναστολής του TNF-α με Infliximab, στην αντίσταση στην ινσουλίνη και στα επίπεδα λιπιδίων, σε ασθενείς με ιδιοπαθή φλεγμονώδη εντεροπάθεια. 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αθηροσκλήρωσης, Αθήνα, 2008
11. Σαμωνάκης Δ, Ρουσσομουστακάκη Μ, **Ουσταμανωλάκης Π**, Μπουρίκας Λ, Ματρέλλα Ε, Κουτρομπάκης Ι, Μουζάς Ι, Χαλκιαδάκης Ι, Κουρούμαλης Η.Α. Τα endoclips στη συντηρητική αντιμετώπιση διατρήσεων μετά ενδοσκοπική πολυπεκτομή. 28^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Αθήνα, 2008. **Περίληψη: Annals of Gastroenterology 2008;21(Suppl):30**
12. **Ουσταμανωλάκης Π**, Κουτρομπάκης Ι, Μαλλιαράκη Ν, Καρμίρης Κ, Χαλκιαδάκης Ι, Μπουρίκας Λ, Καρκαβίτσας Ν, Κουρούμαλης Η. Επίδραση της αναστολής του TNF-α με Infliximab, στην αντίσταση στην ινσουλίνη και στα επίπεδα λιπιδίων, σε ασθενείς με ιδιοπαθή φλεγμονώδη εντεροπάθεια. 28^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Αθήνα, 2008. **Περίληψη: Annals of Gastroenterology 2008;21(Suppl):33 (3^ο Βραβείο Αναρτημένης Ανακοίνωσης)**
13. **Ουσταμανωλάκης Π**, Κουτρομπάκης Ι, Καρακούιδας Κ, Μάντζαρης Γ, Κουρούμαλης Η. Ασφάλεια και αποτελεσματικότητα της ολικής δόσης σιδηροδεξτράνης στην αντιμετώπιση της σιδηροπενικής αναιμίας σε ασθενείς με ιδιοπαθή φλεγμονώδη εντεροπάθεια (ΙΦΕΝ). 28^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Αθήνα, 2008. **Περίληψη: Annals of Gastroenterology 2008;21(Suppl):36**
14. **Ουσταμανωλάκης Π**, Κουτρομπάκης Ι, Κουρούμαλης Η. Ασφάλεια και αποτελεσματικότητα της ολικής δόσης σιδηροδεξτράνης στην αντιμετώπιση της αναιμίας μετά από αιμορραγία πεπτικού. 28^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Αθήνα, 2008. **Περίληψη: Annals of Gastroenterology 2008;21(Suppl):43**
15. Σαμωνάκης Δ, Χαλκιαδάκης Ι, **Ουσταμανωλάκης Π**, Μπουρίκας Λ, Τσαγκουρνής Ο, Ρουσσομουστακάκη Μ, Κουρούμαλης Η. Ευρήματα από το δωδεκαδάκτυλο σε ασθενείς με πυλαία υπέρταση. 28^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Αθήνα, 2008. **Περίληψη: Annals of Gastroenterology 2008;21(Suppl):49**

16. Σαμωνάκης Δ, Μπουρίκας Λ, **Ουσταμανωλάκης Π**, Κουκούτση Κ, Τζαγκουρνιασάκης Μ, Κουρούμαλης Η. Πρώτη εμπειρία από μεταμόσχευση ήπατος σε ασθενείς με οικογενή αμυλοειδική πολυνευροπάθεια. 28^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Αθήνα, 2008. **Περίληψη: Annals of Gastroenterology 2008;21(Suppl):61**
17. Σαμωνάκης Δ, Κουκούτση Κ, **Ουσταμανωλάκης Π**, Τσιολακίδου Γ, Ματρέλλα Ε, Κουλεντάκη Μ, Κουρούμαλης Η. Η NAFLD-NASH στο Ηπατολογικό ιατρείο ΠαΓΝΗ. 28^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Αθήνα, 2008. **Περίληψη: Annals of Gastroenterology 2008;21(Suppl):66**
18. Σαμωνάκης Δ, Χρηστίδου Α, Μαθιουδάκης Κ, Τσαγκουρνής Ο, **Ουσταμανωλάκης Π**, Μπουρίκας Λ, Χαλκιαδάκης Ι, Ενέλε-Μελόνο ΖΜ, Κουρούμαλης Η. Μικροβιολογική μελέτη σοβαρών λοιμώξεων σε νοσηλεύομενους με νόσους ήπατος-χοληφόρων-παγκρέατος. 28^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Αθήνα, 2008. **Περίληψη: Annals of Gastroenterology 2008;21(Suppl):71**
19. Κεφαλογιάννης Γ, Μεσσαριτάκης Ι, Γιαχνάκης Μ, Μηλιώρη Α, Παπαδάκη Χ, **Ουσταμανωλάκης Π**, Κουτρομπάκης Ι. Λοίμωξη με Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού σε άτομα τρίτης ηλικίας σε αγροτική περιοχή της Κρήτης. 4^ο Εθνικό Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας & Νοσοκομειακών Λοιμώξεων, Αθήνα, 2009
20. Μπουρίκας Λ, Βαλάτας Β, Σαϊτάκη Χ, **Ουσταμανωλάκης Π**, Ρουσομουστακάκη Μ, Κουτρομπάκης Ι, Παπαδάκης Κ, Κουρούμαλης Η. Η επίδραση της θεραπείας με Infliximab στην αναιμία και στους δείκτες φλεγμονής σε ασθενείς με Νόσο Crohn. 29^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Χαλκιδική, 2009. **Περίληψη: Annals of Gastroenterology 2009;22(Suppl):36**
21. **Ουσταμανωλάκης Π**, Κουτρομπάκης Ι, Καρακούιδας Κ, Μάντζαρης Γ, Κουρούμαλης Η. Ασφάλεια και αποτελεσματικότητα της χορήγησης ολικής δόσης δεξτρανικού σιδήρου χαμηλού μοριακού βάρους στην αντιμετώπιση σιδηροπενικής αναιμίας σε ασθενείς με ιδιοπαθή φλεγμονώδη εντεροπάθεια. 29^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Χαλκιδική, 2009. **Περίληψη: Annals of Gastroenterology 2008;22(Suppl):31**
22. **Ουσταμανωλάκης Π**, Κουτρομπάκης Ι, Κουρούμαλης Η. Έλκη Cameron: ένα ασύνηθες αίτιο οξείας αιμορραγίας ανωτέρου πεπτικού μη κίρσικης αιτιολογίας- παρουσίαση 4 περιπτώσεων. 29^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Χαλκιδική, 2009. **Περίληψη: Annals of Gastroenterology 2008;22(Suppl):44**
23. **Ουσταμανωλάκης Π**, Κουτρομπάκης Ι, Μεσσαριτάκης Ι, Νινιράκη Μ, Κεφαλογιάννης Γ, Κουρούμαλης Η. Δείκτες αναιμίας, μεταβολισμού σιδήρου και ερυθροποίησης σε ασθενείς με ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις εντερικές νόσους (ΙΦΕΝ). 9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιδιοπαθών

Φλεγμονωδών Νοσημάτων του Εντέρου (ΙΦΝΕ), Λεμεσός, Κύπρος, 2010

24. **Ουσταμανωλάκης Π**, Κουτρομπάκης Ι, Μεσσαριτάκης Ι, Μαλλιαράκη Ν, Σφυριδάκη Α, Κουρούμαλης Η. Επίπεδα Herceidin και Proherceidin στον ορό ασθενών με ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις εντερικές νόσους (ΙΦΕΝ). 9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιδιοπαθών Φλεγμονωδών Νοσημάτων του Εντέρου (ΙΦΝΕ), Λεμεσός, Κύπρος, 2010
25. **Ουσταμανωλάκης Π**, Κουτρομπάκης Ι, Μεσσαριτάκης Ι, Κεφαλογιάννης Γ, Κουρούμαλης Η. Το εύρος κατανομής των Δικτυοερυθροκυττάρων (RDWR) ως νέας γενιάς δείκτης ερυθροποίησης λόγω σιδηροπενικής αναιμίας σε ασθενείς με ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις εντερικές νόσους (ΙΦΕΝ). 9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιδιοπαθών Φλεγμονωδών Νοσημάτων του Εντέρου (ΙΦΝΕ), Λεμεσός, Κύπρος, 2010
26. **Ουσταμανωλάκης Π**, Κουτρομπάκης Ι, Γεωργουσάκη Χ, Κουρούμαλης Η. Ενδοφλέβια χορήγηση καρβοξυμαλτοζικού σιδήρου στην αντιμετώπιση της σιδηροπενικής αναιμίας σε ασθενείς με ιδιοπαθή φλεγμονώδη εντεροπάθεια. 30^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Αθήνα, 2010. **Περίληψη: Annals of Gastroenterology 2010;23(Suppl):44**
27. **Ουσταμανωλάκης Π**, Κουτρομπάκης Ι, Μεσσαριτάκης Ι, Μαλλιαράκη Ν, Σφυριδάκη Α, Κουρούμαλης Η. Αυξημένα επίπεδα herceidin και μειωμένα επίπεδα proherceidin στον ορό ασθενών με ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις εντερικές νόσους (ΙΦΕΝ). 30^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Αθήνα, 2010. **Περίληψη: Annals of Gastroenterology 2010;23(Suppl):44**
28. **Ουσταμανωλάκης Π**, Κουτρομπάκης Ι, Μεσσαριτάκης Ι, Κεφαλογιάννης Γ, Κουρούμαλης Η. Το εύρος κατανομής των Δικτυοερυθροκυττάρων (RDWR) ως νέας γενιάς δείκτης ερυθροποίησης λόγω σιδηροπενικής αναιμίας σε ασθενείς με ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις εντερικές νόσους (ΙΦΕΝ): Πρόδρομα αποτελέσματα. 30^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Αθήνα, 2010. **Περίληψη: Annals of Gastroenterology 2010;23(Suppl):44**
29. **Ουσταμανωλάκης Π**, Κουτρομπάκης Ι, Μεσσαριτάκης Ι, Νινιράκη Μ, Κεφαλογιάννης Γ, Κουρούμαλης Η. Δείκτες αναιμίας, μεταβολισμού σιδήρου και ερυθροποίησης σε ασθενείς με ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις εντερικές νόσους (ΙΦΕΝ). 30^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Αθήνα, 2010. **Περίληψη: Annals of Gastroenterology 2010;23(Suppl):44**
30. Κουλεντάκη Μ, Γρινάκης Ε, **Ουσταμανωλάκης Π**, Λιοδάκη Ν, Σταθάκη Δ, Κουρούμαλης Η, Μουζάς Ι. Αλκοολογικό ιατρείο στην Κρήτη. Εμπειρία πέντε ετών. 30^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Αθήνα, 2010. **Περίληψη: Annals of Gastroenterology 2010;23(Suppl):18**

31. Γεωργουσάκη Χ, Κουτρομπάκης Ι, **Ουσταμανολάκης Π**, Κουρούμαλης Η. Σημαντική βελτίωση της αναιμίας και της ποιότητας ζωής με την ενδοφλέβια χορήγηση καρβοξυμαλτοζικού σιδήρου σε ασθενείς με ιδιοπαθή φλεγμονώδη εντεροπάθεια. 10^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιδιοπαθών Φλεγμονωδών Νοσημάτων του Εντέρου (ΙΦΝΕ), Καλαμάτα, 2011
32. **Ουσταμανολάκης Π**, Κουτρομπάκης Ι, Γεωργουσάκη Χ, Μεσσαριτάκης Ι, Νινιράκη Μ, Κουρούμαλης Η. Ο δείκτης διαλυτού υποδοχέα τρανσφερίνης-φερριτίνης στην αξιολόγηση της αναιμίας ασθενών με ιδιοπαθή φλεγμονώδη εντεροπάθεια. 10^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιδιοπαθών Φλεγμονωδών Νοσημάτων του Εντέρου (ΙΦΝΕ), Καλαμάτα, 2011
33. **Ουσταμανολάκης Π**, Janssen P, Verbeke K, Tack J. Γαστρική κένωση, γαστρική υποδοχή, κορεσμός και επανεμφάνιση της πείνας: τυχαιοποιημένη, τυφλή, συγκριτική μελέτη αγελαδινού γάλακτος και γάλακτος σόγιας σε υγιείς εθελοντές. 31^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Θεσσαλονίκη, 2011.

Διακρίσεις & Βραβεία

1. Travel Grant award: **Oustamanolakis P**, Koutroubakis I, Malliaraki N, Karmiris K, Chalkiadakis I, Ganotakis E, Karkavitsas N, Kouroumalis E. Effects of TNF- α inhibition with Infliximab on lipid levels and insulin resistance in patients with inflammatory bowel disease. 16th UEGW, Vienna, 2008. **Abstract: Gut. 2008;57(Suppl II):A68**
2. 3^ο Βραβείο Αναρτημένης Ανακοίνωσης: **Π. Ουσταμανολάκης**, Ι. Κουτρομπάκης, Ν. Μαλλιαράκη, Κ. Καρμίρης, Ι. Χαλκιαδάκης, Λ. Μπουρίκας, Ν. Καρκαβίτσας, Η. Κουρούμαλης. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΟΥ TNF- α ΜΕ INFLIXIMAB, ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΣΤΗΝ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗ ΚΑΙ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΛΙΠΙΔΙΩΝ, ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΙΔΙΟΠΑΘΗ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗ ΕΝΤΕΡΟΠΑΘΕΙΑ. 28^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Αθήνα, 2008.
3. Βραβείο Αναρτημένης Ανακοίνωσης: **Ουσταμανολάκης Π**, Κουτρομπάκης Ι, Μεσσαριτάκης Ι, Νινιράκη Μ, Κεφαλογιάννης Γ, Κουρούμαλης Η. Δείκτες αναιμίας, μεταβολισμού σιδήρου και ερυθροποίησης σε ασθενείς με ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις εντερικές νόσους (ΙΦΕΝ). 30^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Αθήνα, 2010.
4. 2^ο Βραβείο Αναρτημένης Ανακοίνωσης: Grinakis E, Koulentaki M, **Oustamanolakis P**, Liodaki N, Stathaki D, Mouzas I. Alcohol outpatient clinic in University Hospital of Heraklion; an epidemiological overview with outcome results. National Congress of Alcohol Dependence- 1st Meeting of the Lisbon Alcoholism Treatment Unity, Lisbon, Portugal, 2010.

A. ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Gastroenterology Week , Falk Foundation, Freiburg 2002
2. 37th Annual Meeting of the European Association for the study of the Liver, Madrid, Spain, 2002
3. “Inflammatory Bowel Disease from the Bench to Bedside” International Symposium, Heraklion, Crete, Greece, 2003
4. World Congress of Gastroenterology, Montreal, Canada, 2005
5. British Society of Gastroenterology Annual Meeting, Birmingham, UK, 2006
6. 28^ο Διήμερο Ιατρικό Συνέδριο Ιατρικού Συλλόγου Λεμεσού, Λεμεσός, Κύπρος, 2007
7. 3rd International Congress on Gastrointestinal Oncology ,Crete, Greece, 2007
8. II Falk Gastro-Conference: Falk Workshop, Falk Symposium 161, Falk Symposium 162, Dresden, Germany, 2007
9. 3rd Congress of ECCO- the European Crohn’s and Colitis Organisation, Inflammatory Bowel Diseases 2008, Lyon, France, 2008
10. 6th IBD Intensive Advanced Course for Junior Gastroenterologists, Lyon, France, 2008
11. Gastroenterology and Endotherapy: 26th European Workshop, Brussels, Belgium, 2008
12. 16th United European Gastroenterology Week, Vienna, Austria, 2008
13. 4th ECCO Educational Workshop on the Implementation of ECCO Consensus on Crohn’s Disease and Ulcerative Colitis, Athens, Greece, 2008
14. 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, San Francisco, California, USA, 2008
15. 2008 International Association for the Study of the Liver (IASL) Biennial Meeting, San Francisco, California, USA, 2008

16. 4th Congress of ECCO- the European Crohn's and Colitis Organisation, Inflammatory Bowel Diseases 2009, Hamburg, Germany, 2009
17. 7th IBD Intensive Advanced Course for Junior Gastroenterologists, Hamburg, Germany, 2009
18. GASTRO 2009 UEGW/WCOG, London, UK, 2009
19. 5th Congress of ECCO- the European Crohn's and Colitis Organisation, Inflammatory Bowel Diseases 2010, Prague, Czech Republic, 2010
20. 3rd International Athens Live Endoscopy Course, Athens, Greece, 2010
21. Gastroenterology and Endotherapy: 28th European Workshop, Brussels, Belgium, 2010
22. 6th Congress of ECCO- the European Crohn's and Colitis Organisation, Inflammatory Bowel Diseases 2011, Dublin, Ireland, 2011
23. 23rd Belgian week of Gastroenterology, Liege, Belgium, 2011
24. Symposium: "Frontiers in Gastrointestinal Translational Research", TARGID, University Hospital Gasthuisberg Leuven, Belgium, 2011

B. ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Ημερίδα Επιστημονικής Εταιρείας Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδας: «Από τον τραυματισμό στην επανένταξη», Ηράκλειο, 1995
2. 2^ο Ελληνο-Ιταλικό Συνέδριο Αγγειολογίας-Αγγειοχειρουργικής, Ηράκλειο, Κρήτη, 1996
3. 3^ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδας- 3^ο Πανευρωπαϊκό Συμπόσιο Φοιτητών Ιατρικής, Ηράκλειο, 1997
4. 4^ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδας, Ιωάννινα, 1998
5. 22^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Αθήνα, 2002
6. 11^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Χανιά, Κρήτη, 2002
7. 8^ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη, 2003

8. 23^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Θεσσαλονίκη, 2003
9. 24^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Αθήνα, 2004
10. Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο, 24^ο Πανελλήνιου Συνεδρίου Γαστρεντερολογίας, Αθήνα, 2004
11. 9^ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Μύκονος, 2005
12. Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο, 9^ο Πανελληνίου Ηπατολογικού Συνεδρίου, Μύκονος, 2005
13. 25^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Θεσσαλονίκη, 2005
14. 16^ο Συμπόσιο Παγκρέατος, Θεσσαλονίκη, 2005
15. 4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιδιοπαθών Φλεγμονωδών Νοσημάτων του Εντέρου, Θεσσαλονίκη, 2005
16. Συμπόσιο: «Καρκίνος του Παχέος Εντέρου και του Ορθού», Ογκολογικό & Γαστρεντερολογικό τμήμα Βενιζελείου Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου, Ηράκλειο, 2006
17. Ημερίδα: «Ηπατίτιδες Β & C στην κλινική πράξη», Γαστρεντερολογική Κλινική, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ηρακλείου, Ηράκλειο, 2006
18. 13^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Ηράκλειο, Κρήτη, 2006
19. 1^ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο στην Ενδοσκόπηση του Πεπτικού, 401 ΓΣΝΑ, ΝΝΑ, 251 ΓΝΑ, Αθήνα, 2006
20. 15^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μεταμοσχεύσεων, Θεσσαλονίκη, 2007
21. Ημερίδα: «Δυσκοιλιότητα: Διάγνωση και Νεότερα Δεδομένα στην αντιμετώπισή της», Γαστρεντερολογικό τμήμα Βενιζελείου Νοσοκομείου Ηρακλείου, Ηράκλειο, 2007
22. 2^η Εκπαιδευτική Δημερίδα του Ελληνικού Ιδρύματος Γαστρεντερολογίας & Διατροφής: «Εξελίξεις στη Γαστρεντερολογία και Ηπατολογία», Αθήνα, 2007
23. 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιδιοπαθών Φλεγμονωδών Νοσημάτων του Εντέρου, Φόδελε, Κρήτη, 2007
24. 27^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Θεσσαλονίκη, 2007

25. 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιδιοπαθών Φλεγμονωδών Νοσημάτων του Εντέρου, Κέρκυρα, 2008
26. 28^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Αθήνα, 2008
27. Δημερίδα Ιογενούς Ηπατίτιδας Β & C, Αθήνα, 2008
28. 3^η Εκπαιδευτική Δημερίδα του Ελληνικού Ιδρύματος Γαστρεντερολογίας & Διατροφής: «Εξελιξείς στη Γαστρεντερολογία και Ηπατολογία», Αθήνα, 2008
29. 14^η Ετήσια Δημερίδα στη Θεραπευτική Ενδοσκόπηση, Α' & Β' Γαστρεντερολογικά Τμήματα Θεραπευτηρίου «Ο Ευαγγελισμός», Αθήνα, 2008
30. Συμπόσιο για τη Νεοπλασία του Παχέος Εντέρου, Γαστρεντερολογικό τμήμα Βενιζελείου Νοσοκομείου Ηρακλείου, Χερσόνησος, Κρήτη, 2008
31. 11^ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Κέρκυρα, 2009
32. 29^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Χαλκιδική, 2009
33. 16^η Διεθνής Δημερίδα Ηπατίτιδας Β & C 2009, Αθήνα, 2009
34. 4^η Εκπαιδευτική Δημερίδα του Ελληνικού Ιδρύματος Γαστρεντερολογίας & Διατροφής: «Εξελιξείς στη Γαστρεντερολογία και Ηπατολογία», Αθήνα, 2009
35. 4^ο Εθνικό Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας & Νοσοκομειακών Λοιμώξεων, Αθήνα, 2009
36. 15^η Ετήσια Ημερίδα στη Θεραπευτική Ενδοσκόπηση, Α' & Β' Γαστρεντερολογικά Τμήματα Θεραπευτηρίου «Ο Ευαγγελισμός», Αθήνα, 2009
37. 4^η Ετήσια Εκπαιδευτική Γαστρεντερολογική Δημερίδα: «Νεότερες Εξελιξείς στη Γαστρεντερολογία», Ε.Γ.Ε., Ηράκλειο, Κρήτη, 2009
38. Συμπόσιο: «Η ERCF στην Ελλάδα», Γαστρεντερολογικό τμήμα Βενιζελείου Νοσοκομείου Ηρακλείου, Ελούντα, Κρήτη, 2009
39. 7^η Δημερίδα Επαγγελματικής Ένωσης Γαστρεντερολόγων Ελλάδας: «Επιπλοκές στη Γαστρεντερολογία», Αθήνα, 2009
40. 4^η Πανελλήνια Δημερίδα: «Προκαρκινικές βλάβες του Πεπτικού Συστήματος», Ε.Γ.Ε.-Ογκολογικό Τμήμα, Αθήνα, 2009

41. Πανελλήνιο Συμπόσιο Αλκοολογίας: «Πρόληψη της υποτροπής στον αλκοολισμό», Ηράκλειο, Κρήτη, 2010
42. 9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιδιοπαθών Φλεγμονωδών Νοσημάτων του Εντέρου, Λεμεσός, Κύπρος, 2010
43. 30^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Αθήνα, 2010

Ενεργό Μέλος σε Επιστημονικές Εταιρείες- Συλλόγους

1. Ιατρικός Σύλλογος Ηρακλείου, από το 1999
2. Ελληνική Αντικαρκινική Εταιρεία, από το 2002
3. Ελληνική Γαστρεντερολογική Εταιρεία, από το 2006
4. Ελληνικό Ίδρυμα Γαστρεντερολογίας & Διατροφής, από το 2006
5. European Crohn's and Colitis Organization (ECCO), από το 2009
6. Επαγγελματική Ένωση Γαστρεντερολόγων Ελλάδας (ΕΠ.Ε.Γ.Ε.), από το 2010
7. Ελληνική Ομάδα Μελέτης Ιδιοπαθών Φλεγμονωδών Νοσημάτων του Εντέρου (ΕΟΜΙΦΝΕ), από το 2011
8. Μέλος του European Board of Gastroenterology and Hepatology, από το 2011



Γαστρεντερολογική Κλινική

Περίληψη Διδακτορικής Διατριβής

Μελέτη των μηχανισμών αναιμίας με έμφαση στις διαταραχές της ομοιόστασης του σιδήρου και της ερυθροποίησης σε ασθενείς με Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Εντερικές Νόσους

Παντελεήμων Ι. Ουσταμανωλάκης

Ιατρός Γαστρεντερολόγος

Επιβλέποντες Καθηγητές

Ι. Κουτρομπάκης, *Επίκουρος Καθηγητής Γαστρεντερολογίας*

Η. Κουρούμαλης, *Καθηγητής Γαστρεντερολογίας*

Ε. Παπαδάκη, *Καθηγήτρια Αιματολογίας*

Ηράκλειο

2011

1. Οι Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Εντερικές Νόσοι

Οι Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Εντερικές Νόσοι (ΙΦΕΝ) είναι μία ομάδα νοσημάτων που χαρακτηρίζονται από χρόνια, υποτροπιάζουσα καταστροφική φλεγμονή του γαστρεντερικού σωλήνα (ΓΕΣ). Εκδηλώνονται με μία ποικιλία συμπτωμάτων όπως χρόνια ή υποτροπιάζουσα διάρροια, συχνά με πρόσμιξη αίματος, κοιλιακό άλγος, πυρετό και αναιμία. Επιπροσθέτως, όχι σπάνια η συμπτωματολογία συνοδεύεται και από διάφορες εξωεντερικές εκδηλώσεις από το δέρμα (γαγγραινώδες πυόδερμα, οζώδες ερύθημα), τις αρθρώσεις (αρθραλγία, περιφερική αρθρίτιδα, σπονδυλίτιδα) ή τους οφθαλμούς (ιριδοκυκλίτιδα, ραγοειδίτιδα). Οι ΙΦΕΝ διακρίνονται σε δύο κύριες μορφές νόσου: τη Νόσο Crohn (NC) και την Ελκώδη Κολίτιδα (ΕΚ). Άλλες υποκατηγορίες περιλαμβάνουν την αδιευκρίνιστη κολίτιδα και τη μικροσκοπική (κολλαγονική) κολίτιδα. Συχνά οι ΙΦΕΝ συσχετίζονται με άλλα χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα όπως η ψωρίαση, η πρωτοπαθής σκληρυντική χολαγγειίτιδα (ΠΣΧ) και η αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα.

Στο Δυτικό κόσμο, η επίπτωση και ο επιπολασμός των ΙΦΕΝ έχει αυξηθεί τα τελευταία 50 έτη, έως 8-14/100000/έτος και 120-200/100000 άτομα, αντίστοιχα, για την ΕΚ και έως 6-15/100000/έτος και 50-200/100000 άτομα, αντίστοιχα, για τη NC. Ο επιπολασμός της NC στη Βόρεια Αμερική κυμαίνεται μεταξύ 44 και 201/100000 και της ΕΚ μεταξύ 37,5 και 238/100000. Στην Ευρώπη, ο επιπολασμός της NC κυμαίνεται μεταξύ 8 και 214/100000 ενώ της ΕΚ από 21 έως 294/100000. Όταν τα δεδομένα αναχθούν στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό, υπολογίζεται ότι στην Ευρώπη, περίπου 1 εκατομμύριο άτομα πάσχουν από NC και 1,4 εκατομμύρια από ΕΚ¹.

Το οικογενειακό ιστορικό είναι ένας σοβαρός παράγοντας κινδύνου για την εκδήλωση ΙΦΕΝ, με κορύφωση της συχνότητας εμφάνισης την πρώιμη ενήλικη περίοδο της ζωής, μολονότι μπορούν να προσβληθούν άτομα κάθε ηλικίας. Οι ΙΦΕΝ θεωρείται ότι είναι το αποτέλεσμα μίας συνεχούς, υπέρμετρης φλεγμονώδους απάντησης σε συμβιωτικά μικρόβια, σε έναν γενετικά προδιατεθειμένο ξενιστή^{2,3}. Οι πρώτες μελέτες ευρείας γενετικής διασύνδεσης στις ΙΦΕΝ δημοσιεύθηκαν προ 10ετίας και έκτοτε έχουν ανακαλυφθεί πολλές περιοχές γενετικής προδιάθεσης στα χρωμοσώματα 1, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12, 14, 16, 19 και X. Οι Hugot και συν.⁴ ήταν οι πρώτοι που ανακοίνωσαν συσχέτιση με το χρωμόσωμα 16q το 1996 και πέντε χρόνια αργότερα, ταυτοποίησαν το υποκείμενο γονίδιο CARD15 (ή NOD2). Πιο πρόσφατα, σε διάστημα ενός έτους έχουν δημοσιευθεί επτά μελέτες συσχέτισης ολικού γονιδιώματος (whole genome association studies, WGAS) όπου έχουν ανακαλυφθεί επιπλέον γονίδια για τη NC και την ΕΚ (ATG16L1, IL23R, PTGER4, IRGM, NELL1).

Δεδομένα από ανοσολογικές, μικροβιολογικές και γενετικές μελέτες συνηγορούν υπέρ μίας διαταραγμένης αλληλεπίδρασης μεταξύ ξενιστή και μικροβίων, όσον αφορά την παθογένεση των ΙΦΕΝ⁵. Η μικροβιακή εκτροπή που παρατηρείται σε ασθενείς με ΙΦΕΝ, με τη συνακόλουθη αποδιοργάνωση της εντερικής χλωρίδας, μπορεί να οφείλεται σε αποικισμό από εντερικά παθογόνα, σε φλεγμονώδη αντίδραση του ξενιστή ή σε συνδυασμό αυτών⁶. Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια ολοένα και περισσότερα δεδομένα υποστηρίζουν το γεγονός μίας σημαντικής αλληλεπίδρασης

ανάμεσα σε 3 θεμελιώδη βιολογικά μονοπάτια του κυττάρου, σχετικά με την παθογένεση των ΙΦΕΝ: της αυτοπεψίας, της αναγνώρισης των μικροβίων και του στρες του ενδοπλασματικού δικτύου⁷. Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την παθογένεση των ΙΦΕΝ είναι η υποξία, μεταβολικοί παράγοντες⁸, οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες⁹, όπως και διαταραχές διαφόρων ομοιοστατικών μηχανισμών¹⁰.

Η τρέχουσα άποψη για τη διάγνωση των ΙΦΕΝ είναι ότι αυτή γίνεται στη βάση του συνδυασμού κλινικών, ενδοσκοπικών, απεικονιστικών, ιστολογικών και ορολογικών κριτηρίων. Το θεραπευτικό πλάνο για ένα ασθενή με ΙΦΕΝ θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη την ενεργότητα, την εντόπιση και τη συμπεριφορά της νόσου. Η απόφαση για τη χρήση ενός φαρμάκου επηρεάζεται από την ισορροπία ανάμεσα στη θεραπευτική του δράση και τις πιθανές ανεπιθύμητες ενέργειες, την ανταπόκριση σε προηγούμενα θεραπευτικά σχήματα και την παρουσία εξωεντερικών εκδηλώσεων και άλλων επιπλοκών. Οι θεραπευτικές επιλογές για τις ΙΦΕΝ περιλαμβάνουν τοπικά ή συστηματικά αμινοσαλικυλικά, τοπικά ή συστηματικά κορτικοστεροειδή, αντιβιοτικά, ανοσοτροποποιητικά (αζαθειοπρίνη/6-μερκαπτοπυρίνη, μεθοτρεξάτη), κυκλοσπορίνη και βιολογικούς παράγοντες (infliximab, adalimumab, κλπ). Σημαντικό ρόλο επίσης παίζουν η διαιτητική υποστήριξη και η χειρουργική παρέμβαση, της οποίας σημαντική παράμετρος επιτυχίας είναι η επιλογή του κατάλληλου τύπου επέμβασης και της κατάλληλης χρονικής στιγμής για τη διενέργειά της^{11,12}.

2. Η αναιμία στις ΙΦΕΝ

Η αναιμία είναι μία από τις συχνότερες εξωεντερικές εκδηλώσεις των ΙΦΕΝ, με ισχυρή επίδραση στην ποιότητα ζωής. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ), ως αναιμία ορίζεται το επίπεδο αιμοσφαιρίνης κάτω από 120 g/L σε γυναίκες (<110 g/L για εγκύους) και κάτω από 130 g/L σε άνδρες, στο επίπεδο της θάλασσας. Η αναιμία στους ασθενείς με ΙΦΕΝ μπορεί να οφείλεται πρωταρχικά σε σιδηροπενία εξαιτίας χρόνιας απώλειας αίματος αλλά και μειωμένης απορρόφησης του σιδήρου των τροφών από τον εντερικό βλεννογόνο, λόγω της φλεγμονής. Ωστόσο, η αναιμία των ΙΦΕΝ φαίνεται να είναι πολυπαραγοντικής αιτιολογίας, και συχνότερα εμφανίζεται ως το αποτέλεσμα του συνδυασμού της σιδηροπενίας (συχνότερης αιτίας) και της αναιμίας της φλεγμονής ή αναιμίας χρόνιας νόσου (δεύτερης συχνότερης αιτίας).

Στη βιβλιογραφία, ο επιπολασμός της αναιμίας σε ασθενείς με ΙΦΕΝ κυμαίνεται από 6% έως 74%^{13,14}. Μετά από μία ενδελεχή διερεύνηση της βιβλιογραφίας, σε βάθος χρόνου, η υπολογιζόμενη μέση τιμή του επιπολασμού της αναιμίας στις ΙΦΕΝ, φαίνεται να κυμαίνεται γύρω στο 17%¹⁵. Σε μία συστηματική ανασκόπηση¹³, ο επιπολασμός της σιδηροπενίας κυμαινόταν μεταξύ 36% και 90%, ανάλογα με τον ορισμό της σιδηροπενίας και τον πληθυσμό ελέγχου. Σιδηροπενία λαμβάνει χώρα όταν η απώλεια σιδήρου υπερβαίνει το ποσό σιδήρου που απορροφάται από το έντερο. Η κατάσταση αυτή του αρνητικού ισοζυγίου σιδήρου εμφανίζεται όταν δεν καταναλώνεται αρκετός σίδηρος, όταν αναστέλλεται η απορρόφηση σιδήρου, όταν αυξάνονται οι ανάγκες του οργανισμού σε σίδηρο (π.χ. κατά την κύηση ή την ήβη) ή εξαιτίας απώλειας σιδήρου λόγω αιμορραγίας/απώλειας αίματος. Το κύριο αίτιο σιδηροπενίας είναι η απώλεια αίματος από το ουρογεννητικό σύστημα στις γυναίκες ή

από το γαστρεντερικό σωλήνα και στα δύο φύλα. Η αναιμία των ΙΦΕΝ οφείλεται κυρίως σε σιδηροπενία. Πολλοί από τους προαναφερθέντες παθογενετικούς μηχανισμούς παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη ελλείμματος σιδήρου στις ΙΦΕΝ. Οι ασθενείς με ΙΦΕΝ, κυρίως οι γυναίκες, εμφανίζουν μειωμένη ημερήσια πρόσληψη σιδήρου, κυρίως μη-αιμικού σιδήρου, κατά κύριο λόγο εξαιτίας της αποφυγής τροφών με υψηλή περιεκτικότητα σε φυτικές ίνες, πλούσιων ή εμπλουτισμένων με σίδηρο, που θα μπορούσαν ενδεχομένως να επιδεινώσουν τη συμπτωματολογία της νόσου. Φτωχή απορρόφηση σιδήρου εξαιτίας δομικών αλλαγών στο βλεννογόνο αναμένεται μόνο στη σχετικά σπάνια μορφή της NC του ανωτέρου πεπτικού, μολονότι δυσαπορρόφηση σιδήρου έχει περιγραφεί σε πάνω από 90% των παιδιατρικών ασθενών με ΙΦΕΝ. Ένας επιπλέον παράγοντας που επηρεάζει την απορρόφηση του σιδήρου των τροφών είναι τα αυξημένα επίπεδα hepcidin (σαν αποτέλεσμα χρόνιας φλεγμονής), που οδηγούν σε μειωμένη εκροή σιδήρου από τα εντεροκύτταρα. Ωστόσο, η κύρια αιτία αρνητικού ισοζυγίου σιδήρου στις ΙΦΕΝ παραμένει η χρόνια απώλεια αίματος από τον εξελκωμένο εντερικό βλεννογόνο¹⁶.

Η αναιμία χρόνιας νόσου (AXN) φαίνεται να είναι το αποτέλεσμα της διέγερσης του ανοσολογικού συστήματος από την υποκείμενη διεργασία και συγκεκριμένες φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, συμπεριλαμβανομένου του tumor necrosis factor alpha (TNFα), της ιντερφερόνης γ (IFNγ) και των ιντερλευκινών (IL) 1,6,8 και 10. Μέχρι σήμερα, έχουν ταυτοποιηθεί 3 κύριοι παθοφυσιολογικοί παράγοντες, υποκείμενοι της AXN. Όλοι μοιράζονται το κοινό χαρακτηριστικό ότι επάγονται μετά από διέγερση του εγγενούς ανοσολογικού μηχανισμού: Πρώτον, η φλεγμονή οδηγεί σε κατακράτηση του σιδήρου εντός των κυττάρων του ΔΕΣ, έχοντας σαν αποτέλεσμα περιορισμένη διαθεσιμότητα σιδήρου για τα προγονικά ερυθροποιητικά κύτταρα. Δεύτερον, οι κυτταροκίνες και οι πρωτεΐνες οξείας φάσης επηρεάζουν αρνητικά τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των προγονικών ερυθροποιητικών κυττάρων. Τρίτον, στην ανάπτυξη AXN συμβάλει και η ελαττωμένη παραγωγή και βιολογική δράση της ενδογενούς EPO. Επιγραμματικά, στην AXN, φαίνεται να εμπλέκονται διάφοροι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί (αντίστοιχες κυτταροκίνες)^{17,18}:

6. Ελαττωμένη διάρκεια ζωής των ερυθροκυττάρων εξαιτίας δυσερυθροποίησης, αυξημένου ρυθμού καταστροφής και αυξημένης φαγοκυττάρωσης (TNFα).
7. Ανεπαρκής ανταπόκριση της παραγωγής EPO για τον αντίστοιχο βαθμό αναιμίας σε πολλούς, αλλά όχι όλους τους ασθενείς (IL-1 & TNFα).
8. Ελαττωμένη ευαισθησία των κυττάρων της ερυθράς σειράς στην EPO (IFNγ, IL-1, TNFα, hepcidin).
9. Αναστολή της ωρίμανσης και διαφοροποίησης των κυττάρων της ερυθράς σειράς (IFNγ, IL-1, TNFα, α1-αντιθρυσίνη).
10. Παθολογική ομοίωση του σιδήρου εξαιτίας αυξημένης έκφρασης του DMT1 (IFNγ) και του TfR (IL-10) στα μακροφάγα, μειωμένης έκφρασης της ferroportin 1 (αυξημένες συγκεντρώσεις hepcidin λόγω IFNγ και IL-6) στα εντεροκύτταρα (αναστολή απορρόφησης σιδήρου) και μακροφάγα (αναστολή επανακυκλοφορίας του σιδήρου), και αυξημένου ρυθμού σύνθεσης της φερριτίνης (TNFα, IL-1, IL-6, IL-10) (αυξημένη αποθήκευση σιδήρου).

Η διαγνωστική προσέγγιση της αναιμίας των ΙΦΕΝ, κυρίως στο πεδίο διαχωρισμού της σιδηροπενικής αναιμίας (ΣΠΑ) από την ΑΧΝ, περιλαμβάνει πληθώρα εδραιωμένων αλλά και νέας γενιάς εργαστηριακών δεικτών, η συνδυαστική χρήση των οποίων μπορεί να διαγνώσει με μεγάλη ακρίβεια το βαθμό συμμετοχής του κάθε τύπου αναιμίας. Η φερριτίνη, μαζί με τον κορεσμό τρανσφερίνης και τη CRP, είναι ο ελάχιστος έλεγχος για τους ασθενείς με ΙΦΕΝ και αναιμία. Ο συνδυασμός επιπέδων φερριτίνης ορού με τα επίπεδα του διαλυτού υποδοχέα τρανσφερίνης (sTfR), μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση σιδηροπενίας (υψηλός sTfR, χαμηλή φερριτίνη), φλεγμονής (φυσιολογικός sTfR και φερριτίνη) ή μικτών καταστάσεων (αυξημένος sTfR, φυσιολογική φερριτίνη). Επιπλέον, φερριτίνη <30 μg/L (σε συνδυασμό με κορεσμό τρανσφερίνης <16%) είναι ένας εδραιωμένος δείκτης σιδηροπενίας σε ασθενείς με φλεγμονή. Σε παρουσία φλεγμονής, το κατώτερο όριο φερριτίνης ορού που αντιστοιχεί σε φυσιολογικές αποθήκες σιδήρου είναι τα 100 μg/L, έτσι τα διαγνωστικά κριτήρια για την ΑΧΝ είναι φερριτίνη ορού >100 μg/L και κορεσμός τρανσφερίνης <16%. Εάν τα επίπεδα φερριτίνης είναι ανάμεσα σε 30 και 100 μg/L, είναι πιθανός ένας συνδυασμός αληθούς ΣΠΑ και ΑΧΝ. Τέλος, η φερριτίνη ορού μπορεί να χρησιμοποιηθεί υπό τη μορφή του λόγου STfR/log ferritin, σαν ένα χρήσιμο εργαλείο αποκλεισμού ΣΠΑ, όταν είναι <1¹⁹. Οι ρυθμιστές μεταβολισμού του σιδήρου, hepcidin και prohepcidin, βρίσκονται υπό αξιολόγηση, φαίνεται ότι έχουν κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη αναιμίας στις ΙΦΕΝ, αλλά είναι μάλλον ανεπαρκείς για το διαχωρισμό ΣΠΑ και ΑΧΝ. Επιπλέον, μία πληθώρα δεικτών των ερυθρών και των ΔΕΚ (εύρος κατανομής ερυθρών, ποσοστό υπόχρωμων ερυθρών, ψευδαργυρική πρωτοπορφυρίνη, μέσος όγκος ΔΕΚ, αιμοσφαιρίνη των ΔΕΚ, IRF, RSF, εύρος κατανομής των ΔΕΚ, κλπ) έχουν υποστηρικτικό ρόλο στη διάγνωση της αναιμίας των ΙΦΕΝ, βρίσκονται ακόμη υπό αξιολόγηση, ενώ κάποιοι φαίνεται ότι αντανακλούν με μεγάλη ακρίβεια διάφορους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς αναιμίας²⁰.

Η θεραπευτική προσέγγιση της αναιμίας των ΙΦΕΝ περιλαμβάνει τη θεραπεία υποκατάστασης με σίδηρο (από του στόματος ή ενδοφλεβίως), τη χορήγηση ερυθροποιητικών παραγόντων, ενώ τελευταία φαίνεται να εξελίσσεται ο τομέας θεραπείας της ΑΧΝ. Οι ανταγωνιστές της hepcidin αναμένεται να ωφελήσουν ασθενείς με νοσήματα υπερέκφρασης της ορμόνης αυτής, που εκδηλώνονται με εικόνα συστηματικής ΣΠΑ, σε έδαφος ΑΧΝ²¹.

3. Κλινικές μελέτες

Οι στόχοι των κλινικών μελετών, στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν:

5. Η καταγραφή των επιδημιολογικών, κλινικών και εργαστηριακών δεδομένων, σχετικά με την αναιμία σε ασθενείς με ΙΦΕΝ, που παρακολουθούνται στη Γαστρεντερολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου.
6. Η μελέτη των διαταραχών της ομοιόστασης της σιδήρου και η συσχέτισή τους με τους μηχανισμούς φλεγμονής, σε ασθενείς με ΙΦΕΝ, με ιδιαίτερη έμφαση στη μελέτη του ρόλου της πρωτεΐνης hepcidin.

7. Η μελέτη των διαταραχών ερυθροποίησης σε ασθενείς με ΙΦΕΝ, με έμφαση στο ρόλο συμβατικών και νέας γενιάς αιματολογικών δεικτών στη διάγνωση διαταραχών ερυθροποίησης αλλά και ομοιόστασης του σιδήρου.
8. Η μελέτη της επίδρασης θεραπευτικών παρεμβάσεων στους ανωτέρω μηχανισμούς και στις ανωτέρω παραμέτρους.

Ο σκοπός της **πρώτης μελέτης**²² ήταν ο προσδιορισμός των επιπέδων hepcidin και prohepcidin στον ορό ασθενών με ΙΦΕΝ, η σύγκρισή τους με υγιείς μάρτυρες (YM) και η συσχέτισή τους με εδραιωμένες παραμέτρους αξιολόγησης αναιμίας και το προφίλ φλεγμονής του κάθε ασθενούς. Στη μελέτη συμμετείχαν 100 ασθενείς με ΙΦΕΝ: 49 με Ελκώδη Κολίτιδα [EK], 51 με Νόσο Crohn [NC], μέσης ηλικίας 49 ετών, άνδρες/γυναίκες: 58/42, μέση διάρκεια νόσου 8 έτη. Οι ασθενείς συγκρίθηκαν με 102 υγιείς μάρτυρες (YM), αντίστοιχης ηλικίας. Οι συγκεντρώσεις στον ορό των hepcidin-25 και prohepcidin προσδιορίστηκαν με χρήση εμπορικών διαθέσιμων κιτ ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (DRG International, Inc., New Jersey, USA). Ο επιπολασμός της αναιμίας σε αυτή την ομάδα ασθενών με ΙΦΕΝ ήταν 42% (41.2% για την EK και 42.9% για τη NC). Τα μέσα επίπεδα hepcidin ήταν σημαντικά υψηλότερα σε ασθενείς με EK και NC, συγκριτικά με YM ($P < 0.0001$). Τα μέσα επίπεδα prohepcidin ήταν σημαντικά χαμηλότερα σε ασθενείς με ΙΦΕΝ, συγκριτικά με τους YM ($P = 0.03$). Στη μονοπαραγοντική ανάλυση, υπήρχε σημαντική αρνητική συσχέτιση ($r = -0.36$, $P = 0.0003$) της hepcidin ορού και θετική ($r = 0.65$, $P < 0.0001$) της prohepcidin ορού με τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης. Στους ασθενείς με ΙΦΕΝ βρέθηκε επίσης σημαντική συσχέτιση της hepcidin ($r = 0.34$, $P = 0.0007$) και της prohepcidin ($r = -0.21$, $P = 0.04$) με τα επίπεδα φερριτίνης. Η hepcidin ορού συσχετίστηκε με την ενεργότητα της νόσου (για την EK, $r = 0.36$, $P = 0.009$) και τη C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) ($r = 0.29$, $P = 0.004$). Μετά από πολυπαραγοντική ανάλυση, τα επίπεδα hepcidin ορού εμφάνισαν σημαντική συσχέτιση με τη φερριτίνη ($P = 0.0008$) και την ενεργότητα της νόσου (για την EK, $P = 0.004$). Η μελέτη αυτή είναι η πρώτη που διερευνά ταυτόχρονα τα επίπεδα hepcidin και prohepcidin στον ορό ασθενών με ΙΦΕΝ. Τα υψηλότερα επίπεδα hepcidin και τα χαμηλότερα prohepcidin σε ασθενείς με ΙΦΕΝ, συγκριτικά με YM, υπογραμμίζουν τον καίριο ρόλο που παίζουν οι δύο αυτές ορμόνες στις ΙΦΕΝ. Η ισχυρή συσχέτισή τους (θετική για τη hepcidin και αρνητική για την prohepcidin) με την αιμοσφαιρίνη στη μονοπαραγοντική ανάλυση, υποδεικνύει ότι έχουν σημαντική συνεισφορά στη δημιουργία της αναιμίας, όμως η πολυπαραγοντική ανάλυση δείχνει ότι τα επίπεδά τους από μόνα τους φαίνονται ανεπαρκή για χρήση στο διαχωρισμό της ΣΠΑ από την AXN. Αυτό επιτείνεται και από την απουσία συσχέτισης ανάμεσα στις hepcidin/prohepcidin και των Tsat & sTfR, οι οποίοι είναι εδραιωμένοι δείκτες για την ταξινόμηση της αναιμίας. Αντίθετα, η θετική συσχέτιση που βρήκαμε ανάμεσα στη hepcidin και στη φερριτίνη είναι μάλλον αναμενόμενη καθώς και οι δύο είναι πρωτεΐνες οξείας φάσεως και τα επίπεδά τους αυξάνονται κατά τη διάρκεια ενεργού φλεγμονώδους διαδικασίας.

Στη **δεύτερη μελέτη**²³, στον ίδιο πληθυσμό ασθενών και YM, διερευνήθηκε η χρησιμότητα ενός συμβατικού δείκτη (RDW) και τεσσάρων δεικτών νέας γενιάς (IRF, RSF, RDWR-CV, RDWR-SD) στην αξιολόγηση της αναιμίας που συνοδεύει τις ΙΦΕΝ. Η μέτρηση των δεικτών ερυθρών και ΔΕΚ έγινε με χρήση του αιματολογικού αναλυτή

Coulter LH 780 (Beckman Coulter, Inc., California, USA). 30 ασθενείς (30%) είχαν ΣΠΑ (φερριτίνη<30 μg/L & Tsat<16%), 4 ασθενείς (4%) είχαν AXN (φερριτίνη>100 μg/L & Tsat<16%) και 8 ασθενείς (8%) είχαν μικτή ΣΠΑ/AXN (φερριτίνη=30-100 μg/L & Tsat<16%). Βρέθηκε σημαντική συσχέτιση του εύρους κατανομής των ερυθρών (RDW), του παράγοντα μεγέθους των ερυθρών (Red blood cell size factor, RSF) και του συντελεστή διακύμανσης του εύρους κατανομής των ΔΕΚ (Reticulocyte distribution width-coefficient of variation, RDWR-CV) με τον Tsat και τον sTfR, αλλά όχι με τα επίπεδα φερριτίνης. Οι ασθενείς με ΣΠΑ είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα RDW και RDWR-CV καθώς και σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα RSF, συγκριτικά με τους ασθενείς χωρίς ΣΠΑ. Οι υψηλές τιμές του RDW (ευαισθησία 93%, ειδικότητα 81%) και οι χαμηλές τιμές του RSF (ευαισθησία 83%, ειδικότητα 82%) ήταν οι καλύτεροι δείκτες για τη διάγνωση της ΣΠΑ. Υπήρχε σημαντική συσχέτιση των RDWR-CV και RDWR-SD (Standard Deviation) με την ενεργότητα της νόσου και τα επίπεδα CRP. Σχετικά με τους νέους δείκτες, αυτή είναι η πρώτη μελέτη αξιολόγησής στους σε αυτή την κατηγορία ασθενών. Φαίνεται ότι ο RDW μπορεί να προταθεί ως ένας κατάλληλος δείκτης για το διαχωρισμό μεταξύ ΣΠΑ και AXN, σε ασθενείς με ενεργό ΙΦΕΝ. Ωστόσο, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δεν κατάφεραν να επιβεβαιώσουν την υπόθεση αυτή λόγω του μικρού αριθμού ασθενών με AXN που συμμετείχαν σε αυτήν, που καθιστά την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων επισφαλής. Ο IRF είναι ο λόγος των ανώριμων ΔΕΚ προς το συνολικό αριθμό των ΔΕΚ. Στη μελέτη μας, ο IRF ήταν σημαντικά αυξημένος στους ασθενείς, σε σχέση με τους YM, όμως και στις δύο ομάδες ήταν εντός των φυσιολογικών ορίων, βάσει του εύρους του κατασκευαστή (0.20-0.40). Το εύρημα φαίνεται λογικό, λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός της συνεχούς απώλειας αίματος σε ασθενείς με ΙΦΕΝ, συχνά υποκλινικής, σαν αποτέλεσμα της χρόνιας φλεγμονής στο έντερο, οδηγώντας έτσι σε αυξημένο οδηγό σήμα για ερυθροποίηση στο μυελό των οστών, ακόμα και υπό συνθήκες χαμηλής διαθεσιμότητας σιδήρου, λόγω μειωμένης απορρόφησής του. Φαίνεται ότι ο IRF είναι ένας δείκτης μάλλον περιορισμένης χρησιμότητας στην αξιολόγηση της αναιμίας των ΙΦΕΝ, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και από τα αποτελέσματα της μελέτης μας, όπου δεν υπήρξε συσχέτιση του IRF με τη φερριτίνη, τον Tsat και τον sTfR, καθώς και καμία διαφορά μεταξύ ασθενών με και χωρίς ΣΠΑ. Ο RSF συνδέει τον MCV με τον MRV. Τα αποτελέσματα της μελέτης μας υποστηρίζουν την υπόθεση ότι ο RSF φαίνεται να είναι μία ευαίσθητη παράμετρος πραγματικού χρόνου για την πρόιμη ανίχνευση διαταραχών των ερυθροποιητικών μηχανισμών στη λειτουργική σιδηροπενία, σε ασθενείς με ΙΦΕΝ. Στη μελέτη μας το RDWR-SD ήταν σημαντικά αυξημένο στους ασθενείς, συγκριτικά με τους YM ($p<0.0001$), και το RDWR-CV ήταν αυξημένο τόσο στους ασθενείς (σε σχέση με τους YM) όσο και στους ασθενείς με ΣΠΑ (σε σχέση με εκείνους με μη-ΣΠΑ). Λαμβάνοντας υπόψη την ισχυρή αρνητική συσχέτιση του τελευταίου με τον Tsat και τη θετική συσχέτιση με τον sTfR, φαίνεται ότι ο RDWR-CV είναι ένας ευαίσθητος δείκτης διασποράς του πληθυσμού των ΔΕΚ, αντανακλώντας μία παρακολούθηση πραγματικού χρόνου της παραγωγής των ΔΕΚ, πέρα από τον εδραιωμένο αριθμό των ΔΕΚ, που φαίνεται να αντιστοιχεί περισσότερο σε μία μεμονωμένη στιγμή του κύκλου ζωής των ΔΕΚ. Επιπλέον, τόσο ο RDWR-CV, όσο και ο RDWR-SD συσχετίστηκαν καλά με την ενεργότητα της νόσου και τη CRP, ένα εύρημα πολλά υποσχόμενο στη βάση ότι οι δείκτες αυτοί θα μπορούσαν να συνδυαστούν με άλλους (που αντιστοιχούν

μόνο σε σιδηροπενία), ώστε να διαχωριστεί η υπο-ομάδα των ασθενών με καθαρή ΣΠΑ (και όχι μικτή με AXN). Συμπερασματικά, η μελέτη αυτή είναι η πρώτη που ανακοινώνει τη χρησιμότητα των δεικτών των ΔΕΚ στην αξιολόγηση της αναιμίας σε ασθενείς με ΙΦΕΝ. Ο RSF και ο RDWR, μόνοι ή σε συνδυασμό με το RDW και άλλους εδραιωμένους δείκτες αναιμίας και φλεγμονής (Tsat, sTfR, CRP), δείχνουν πολλά υποσχόμενοι σαν νέα ευαίσθητα εργαλεία, παρέχοντας στον κλινικό αρκετά δεδομένα από μία απλή και φθηνή γενική εξέταση αίματος.

Η **τρίτη μελέτη**^{24,25}, επίσης στην ίδια ομάδα ασθενών και YM, αφορούσε τη διερεύνηση της χρήσης του διαλυτού υποδοχέα τρανσφερρίνης (sTfR) και του δείκτη sTfR-ferritin (sTfR-F, sTfR/log₁₀ ferritin) στην αξιολόγηση της αναιμίας σε ασθενείς με ΙΦΕΝ. Στη μελέτη αυτή βρέθηκε ότι ασθενείς με ΣΠΑ είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα sTfR, συγκριτικά με εκείνους χωρίς ΣΠΑ (δηλ. με άλλου τύπου αναιμία ή χωρίς αναιμία). Παρομοίως, οι ασθενείς με ΣΠΑ είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα sTfR-F, συγκριτικά με εκείνους χωρίς ΣΠΑ. Επιπλέον, οι ασθενείς με ΣΠΑ είχαν σημαντικά υψηλότερους δείκτες sTfR & sTfR-F, σε σχέση με τους ασθενείς με AXN (συμπεριλαμβανομένης της μικτής ΣΠΑ/AXN) (P<0.0001). Η ευαισθησία του υψηλού sTfR για τη διάγνωση ΣΠΑ με όριο αποκοπής 1.8 mg/L ήταν 81%, η ειδικότητα 80%, η ΘΠΑ 63% και η ΑΠΑ 91%. Παρομοίως, η ευαισθησία του υψηλού sTfR-F για τη διάγνωση της ΣΠΑ με όριο αποκοπής το 1.4 ήταν 91%, η ειδικότητα 92%, ενώ η ΘΠΑ ήταν 83% και η ΑΠΑ 96%. Δε βρέθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ sTfR ή sTfR-F και επιπέδων CRP. Αυτή είναι η πρώτη μελέτη αξιολόγησης του sTfR-F σε ασθενείς με ΙΦΕΝ. Από τη μελέτη αυτή φάνηκε ότι ο sTfR-F φαίνεται αρκετά αποτελεσματικός στην ανίχνευση και διάγνωση της ΣΠΑ, σε ασθενείς με ΙΦΕΝ. Το ποσοστό ανίχνευσης είναι υψηλότερο από του sTfR και οπωσδήποτε υψηλότερο των άλλων υπάρχοντων δεικτών. Είναι σημαντικό να προστεθεί ότι η κλινική χρήση αυτού του δείκτη μάλλον προσθέτει στην αξία άλλων εδραιωμένων δεικτών, όπως η φερριτίνη, η τρανσφερρίνη και ο Tsat, παρά τους αναπληρώνει στη διάγνωση της ΣΠΑ. Ως εκ τούτου, ο sTfR-F μπορεί να προταθεί ως μία επιπρόσθετη παράμετρος, η οποία μπορεί να βελτιώσει τη διάγνωση της ΣΠΑ σε ασθενείς με ΙΦΕΝ.

Η **τέταρτη μελέτη**²⁶ αφορούσε τον έλεγχο της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας της ολικής δόσης έγχυσης δεξτρανικού σιδήρου χαμηλού ΜΒ σε ασθενείς με αναιμία σε έδαφος ΙΦΕΝ. Στη μελέτη συμμετείχαν 50 ασθενείς με ΙΦΕΝ (27 γυναίκες, 35 με ΝC, 15 με ΕΚ). Η [μέση τιμή±τυπική απόκλιση] της αιμοσφαιρίνης και φερριτίνης προ της έγχυσης ήταν 9.88±1.42 g/dL και 13.9±10.9 ng/ml, αντίστοιχα. Μετά από χορήγηση δοκιμαστικής δόσης 25 mg, έλαβαν δεξτρανικό σίδηρο χαμηλού μοριακού βάρους, ενδοφλέβια σε μία συνεδρία και δόση υπολογισθείσα ανάλογα με το έλλειμμα σιδήρου. Σε όλους τους ασθενείς έγινε καταγραφή κλινικών και εργαστηριακών παραμέτρων προ και 4 εβδομάδες μετά τη θεραπεία. 4 ασθενείς (8%) παρουσίασαν ανεπιθύμητες ενέργειες κατά τη διάρκεια της δοκιμαστικής δόσης και δεν έλαβαν ολική δόση. Μόνο ένας ασθενής παρουσίασε αλλεργική αντίδραση κατά την έγχυση ολικής δόσης. Στους υπόλοιπους 45 ασθενείς, η μέση δόση σιδήρου που χορηγήθηκε ήταν 1075±269 mg. Η μέση άνοδος του αιματοκρίτη και της αιμοσφαιρίνης την εβδομάδα 4 ήταν 4.9±1.9% και 1.7±0.8 g/dL, αντίστοιχα. Αιμοποιητική ανταπόκριση παρατηρήθηκε σε 23 από τους 45 ασθενείς (51.1%). Τα αποτελέσματα της

μελέτης αυτής υποδηλώνουν ότι η ΕΦ χορήγηση δεξτρανικού σιδήρου χαμηλού ΜΒ μπορεί να είναι χρήσιμη στη θεραπεία της ΣΠΑ σε έδαφος ΙΦΕΝ. Η προσέγγιση αυτή είναι αποτελεσματική, απλή, καλά αποδεκτή και φιλική προς τους ασθενείς. Μία μειοψηφία ασθενών (περίπου 10%) αναπτύσσουν αλλεργικές αντιδράσεις και αποκλείονται από την έγχυση ολικής δόσης.

4. Βιβλιογραφία

1. Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2011 May;140(6):1785-94.
2. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2011;474:307-17.
3. Cho JH, Brant SR. Recent insights into the genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2011;140:1704-12.
4. Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C et al. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996; 379: 821-823.
5. Chassaing B, Darfeuille-Michaud A. The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 2011;140:1720-28.
6. Abraham C, Medzhitov R. Interactions between the host innate immune system and microbes in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 2011;140:1729-37.
7. Kaser A, Blumberg RS. Autophagy, microbial sensing, endoplasmic reticulum stress, and epithelial function in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 2011;140:1738-47.
8. Glover LE, Colgan SP. Hypoxia and metabolic factors that influence Inflammatory Bowel Disease pathogenesis. *Gastroenterology* 2011;140:1748-55.
9. Strober W, Fuss IJ. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* 2011;140:1756-67.
10. MacDonald TT, Monteleone I, Fantini MC, Monteleone G. Regulation of homeostasis and inflammation in the intestine. *Gastroenterology* 2011;140:1768-75.
11. Dignass A, Van Assche G, Lindsay JO, et al. for the European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO). The second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management. *J Crohn's Colitis* 2010;4:28-62.
12. Travis SPL, Stange EF, Lemann M, et al. for the European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO). European evidence-based consensus on the management of Ulcerative Colitis: current management. *J Crohn's Colitis* 2008;2:24-62.
13. Kulnigg S, Gasche C. Systematic review: managing anaemia in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006;24:1507–1523.
14. Wilson A, Reyes E, Ofman J. Prevalence and outcomes of anemia in inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. *Am J Med*. 2004;116(Suppl 7A):44S–49S.

15. de la Morena F, Gisbert JP. Anemia and inflammatory bowel disease. *Rev Esp Enferm Dig.* 2008;100:285–293.
16. Gasche C. Anemia in inflammatory bowel diseases. Bremen: UNI-MED, 2008: pp 46-47.
17. Weiss G, Goodnough LT. Anemia of chronic disease. *N Engl J Med.* 2005;352:1011–1023.
18. Muñoz M, García-Erce JA, Remacha AF. Disorders of iron metabolism. Part 1: molecular basis of iron homeostasis. *J Clin Pathol.* 2011;64:281-6.
19. Gasche C, Berstad A, Befrits R, Beglinger C, Dignass A, Erichsen K, Gomollon F, Hjortswang H, Koutroubakis I, Kulnigg S, Oldenburg B, Rampton D, Schroeder O, Stein J, Travis S, Van Assche G. Guidelines on the diagnosis and management of iron deficiency and anemia in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:1545–1553.
20. Oustamanolakis P, Koutroubakis IE, Kouroumalis EA. Diagnosing anemia in inflammatory bowel disease: Beyond the established markers. *Journal of Crohn's and Colitis* (2011), doi:10.1016/j.crohns.2011.03.010.
21. Nemeth E. Targeting the hepcidin-ferroportin axis in the diagnosis and treatment of anemias. *Adv Hematol.* 2010;2010:750643.
22. Oustamanolakis P, Koutroubakis IE, Messaritakis I, Malliaraki N, Sfiridaki A, Kouroumalis EA. Serum hepcidin and prohepcidin concentrations in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2011;23(3):262-268.
23. Oustamanolakis P, Koutroubakis IE, Messaritakis I, Kefalogiannis G, Niniraki M, Kouroumalis EA. Measurement of reticulocyte and red blood cell indices in the evaluation of anemia in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis.* 2011;5(4):295-300.
24. Oustamanolakis P, Koutroubakis IE, Messaritakis I, Niniraki M, Kouroumalis EA. Soluble transferrin receptor- ferritin index in the evaluation of anemia in inflammatory bowel disease: a case-control study. *Ann Gastroenterol* 2011;24(2):110-116
25. Oustamanolakis P, Koutroubakis IE. Soluble transferrin receptor- ferritin index is the most efficient marker for the diagnosis of iron deficiency anemia in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2011; in press.
26. Koutroubakis IE, Oustamanolakis P, Karakoidas C, Mantzaris GJ, Kouroumalis EA. Safety and Efficacy of Total-Dose Infusion of Low Molecular Weight Iron Dextran for Iron Deficiency Anemia in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Dig Dis Sci.* 2010; 55(8): 2327-31.



Department of Gastroenterology

Thesis abstract

Investigation of mechanisms of anemia with a particular emphasis on disorders of iron homeostasis and erythropoiesis in patients with Inflammatory Bowel Diseases

Panteleimon I. Oustamanolakis, MD

Gastroenterologist

Promoters

I. Koutroubakis, PhD- Assistant Professor of Gastroenterology, University of Crete, Greece

E. Kouroumalis, PhD- Professor of Gastroenterology, University of Crete, Greece

H. Papadaki, PhD- Professor of Hematology, University of Crete, Greece

Heraklion, Crete

2011

1. Inflammatory Bowel Diseases (IBD)

IBD is a group of diseases characterized by chronic, relapsing destructive inflammation of the gastrointestinal tract. The clinical presentation includes a variety of symptoms such as chronic or recurrent diarrhea, often with mixture of blood, abdominal pain, fever and anemia. Moreover, not infrequently symptoms are accompanied by extraintestinal manifestations of the skin (pyoderma gangrenosum, erythema nodosum), joints (arthralgia, peripheral arthritis, spondylitis) or eye (iridocyclitis, uveitis). IBD can be divided into two main forms: Crohn's Disease (CD) and Ulcerative Colitis (UC). In the West, the incidence and prevalence of IBD has increased in the past 50 years, up to 8–14/100,000 and 120–200/100,000 persons, respectively, for UC and 6–15/100,000 and 50–200/100,000 persons, respectively, for CD¹. Family history is an important risk factor for IBD onset, with peak incidence in early adult period of life, although individuals of all ages can be affected.

IBD are considered to be the result of a continuous, excessive inflammatory response to symbiotic bacteria, in a genetically predisposed host^{2,3}. The first genome-wide association studies in IBD were published 10 years ago and since then many areas of genetic predisposition have been found on chromosomes 1, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12, 14, 16, 19 and X. Hugot et al.⁴ first announced in 1996 a correlation with chromosome 16q and five years later, the underlying gene CARD15 (or NOD2) was identified. More recently, over one year, seven genome-wide association studies have been published, and many additional genes for CD and UC have been identified (ATG16L1, IL23R, PTGER4, IRGM, NELL1). Data from immunological, microbiological and genetic studies favor an impaired interaction between host and microbes in the pathogenesis of IBD⁵. Microbial aberrations observed in patients with IBD, with consequent disruption of the intestinal flora, may be due to colonization by enteric pathogens, to host inflammatory response or to combination⁶. Furthermore, recent data, concerning pathogenesis of IBD, support the hypothesis of a significant interaction among 3 fundamental biological pathways of the cell: autophagy, microbial sensing and endoplasmic reticulum stress⁷. Other factors that play an important role in the pathogenesis of IBD are hypoxia, metabolic factors⁸, inflammatory cytokines⁹, and disorders of homeostasis regulation¹⁰.

2. Anemia of IBD

Anemia is one of the most common extraintestinal manifestations of IBD, with a strong impact on quality of life. According to the World Health Organization (WHO), anemia is defined as hemoglobin level below 120 g/L in women and 130 g/L in men, at sea level. The main cause of anemia in IBD patients is iron deficiency due to chronic blood loss and decreased absorption of iron from the intestinal mucosa, due to inflammation. However, anemia in IBD appears to have a multifactorial etiology, and frequently appears as the result of a combination of iron deficiency (most common cause) and anemia of inflammation or anemia of chronic disease (second most common cause). Iron deficiency takes place when loss of iron exceeds the amount of iron absorbed from the intestine. This situation of negative iron balance occurs when not enough iron is consumed, when iron absorption is suspended, when body requirements in iron are increased (e.g. during pregnancy or puberty) or due to iron loss, because of bleeding/blood loss. The main cause of iron deficiency is blood loss from the urogenital system in women or the gastrointestinal tract in both sexes. The anemia of IBD is mainly due to iron deficiency. Many of the above pathogenetic mechanisms play a role in the development of iron deficit in IBD. Another factor that influences the absorption of food iron is increased levels of hepcidin (as a result of chronic inflammation), leading to reduced outflow of iron from enterocytes. However, chronic blood loss from ulcerated intestinal mucosa remains the main cause of negative iron balance in IBD¹¹.

Anemia of chronic disease (ACD) seems to be the result of stimulation of the immune system from the underlying process and specific inflammatory cytokines, including tumor necrosis factor-alpha (TNF α), interferon- γ (IFN γ) and interleukin (IL)-1, 6, 8 and 10. So far, 3 main pathophysiological factors, underlying ACD, have been identified. All are induced by stimulation of the intrinsic immune mechanism: First, inflammation leads to iron retention within cells of the reticuloendothelial system, resulting in limited availability of iron for erythropoietic progenitor cells. Secondly, proliferation and differentiation of erythropoietic progenitor cells are down-regulated by cytokines and acute phase proteins. Thirdly, reduced production and biological activity of endogenous EPO induces development of ACD. Briefly, in ACD, several different pathophysiological mechanisms (corresponding cytokines) seem to be involved^{12,13}:

1. Reduced life span of erythrocytes due to dyserythropoiesis, increased destruction rate and increased phagocytosis (TNF α).

2. Poor response of EPO production, for the corresponding degree of anemia, in many but not all patients (IL-1 & TNF α).
3. Decreased sensitivity of erythroid cells against EPO stimulation (IFN γ , IL-1, TNF α , hepcidin).
4. Inhibition of maturation and differentiation of erythroid cells (IFN γ , IL-1, TNF α , alpha1-antitrypsin).
5. Abnormal iron homeostasis due to increased expression of DMT1 (IFN γ) and TfR (IL-10) in macrophages, decreased expression of ferroportin 1 (elevated hepcidin concentration due to IFN γ and IL-6) in enterocytes (inhibition of iron absorption) and macrophages (suspension of iron recirculation), and increased rate of ferritin synthesis (TNF α , IL-1, IL-6, IL-10) (increased iron storage).

Diagnostic approach to anemia in IBD, particularly concerning distinguish of iron deficiency anemia (IDA) from ACD, includes many well established and new generation laboratory markers, which, in combination, may diagnose the degree of involvement of each type of anemia, with great accuracy. Ferritin, with transferrin saturation and CRP, is the minimum group of tests required for IBD patients with anemia. The combination of serum ferritin and soluble transferrin receptor (sTfR) levels, can be used to identify iron deficiency (high sTfR, low ferritin), inflammation (normal sTfR and ferritin) or mixed states (increased sTfR, normal ferritin). Moreover, ferritin levels <30 micrograms/L (in combination with transferrin saturation <16%) is an established marker of iron deficiency, in patients with inflammation. In the presence of inflammation, the lower limit of serum ferritin, which corresponds to normal iron stores, is 100 μ g/L, so that diagnostic criteria for ACD is serum ferritin >100 μ g/L and transferrin saturation <16%. When ferritin levels are between 30 and 100 μ g/L, a combination of true IDA and ACD is probable. Finally, serum ferritin can be used in the form of sTfR/log ferritin ratio, as a useful tool for IDA exclusion, when it is <1¹⁴. Iron metabolism regulators, hepcidin and prohepcidin, are under evaluation and it seems to play a central role in the development of anemia in IBD, but are rather inadequate to separate IDA from ACD. In addition, a variety of red cell and reticulocyte indices play a supporting role in the diagnosis of anemia in IBD, are still under evaluation, whereas some of them seem to reflect different pathophysiological mechanisms of anemia, very precisely¹⁵.

Therapeutic approach to anemia in IBD involves iron replacement therapy (oral or intravenous), administration of erythropoietic agents, while recent trends include treatment of ACD. Heparidin antagonists are expected to help patients with disorders of over-expression of this hormone, presented as IDA, on a basis of ACD¹⁶.

3. Clinical studies

The aims of clinical studies in this thesis were:

1. The survey of epidemiological, clinical and laboratory data on anemia in patients with IBD, who are monitored in the Gastroenterology Clinic at University Hospital of Heraklion.
2. The investigation of iron homeostasis disorders and their correlation with the mechanisms of inflammation in patients with IBD, with particular emphasis on the role of the protein hepcidin.
3. The investigation of erythropoiesis disorders in patients with IBD, with emphasis on the role of conventional and new generation blood markers in the diagnosis of erythropoiesis and iron homeostasis disorders.
4. The investigation of the effects of therapeutic interventions in the above mechanisms and parameters.

The aim of the **first study**¹⁷ was measurement of serum hepcidin and prohepcidin levels in patients with IBD, comparison with healthy controls (HC) and correlation with established parameters of anemia evaluation and inflammation profile of each patient. 100 patients with IBD were included in the study: 49 with ulcerative colitis [UC], 51 with Crohn's Disease [CD], mean age 49 years, male / female: 58/42, mean disease duration 8 years. These patients were compared with 102 HC of adjusted age. Serum concentrations of hepcidin-25 and prohepcidin were measured using a commercially available ELISA kit (enzyme-linked immunosorbent assay) (DRG International, Inc., New Jersey, USA). The prevalence of anemia in this group of patients with IBD was 42% (41.2% for UC and 42.9% for CD). Mean hepcidin levels were significantly higher in patients with UC and CD, compared to HC ($P < 0.0001$). Mean prohepcidin levels were significantly lower in patients with IBD, compared to HC ($P = 0.03$). In univariate analysis, there was a significant negative correlation ($r = -0.36$, $P = 0.0003$) of serum hepcidin and positive ($r = 0.65$, $P < 0.0001$) of serum prohepcidin

levels with hemoglobin levels. In patients with IBD, a significant correlation of hepcidin ($r = 0.34$, $P = 0.0007$) and prohepcidin ($r = -0.21$, $P = 0.04$) with ferritin levels was also found. Serum hepcidin correlated with disease activity (for UC, $r = 0.36$, $P = 0.009$) and C-reactive protein (CRP) ($r = 0.29$, $P = 0.004$). After multivariate analysis, serum hepcidin levels showed significant correlation with ferritin ($P = 0.0008$) and disease activity (for UC, $P = 0.004$). This is the first study that investigates both serum hepcidin and prohepcidin levels in patients with IBD. Higher levels of hepcidin and lower of prohepcidin in patients with IBD compared to HC, underline the crucial role played by these two hormones in IBD. The strong correlation (positive for hepcidin and negative for prohepcidin) with hemoglobin in univariate analysis indicates a significant contribution to anemia mechanisms, whereas multivariate analysis reveals that these levels per se seem inadequate in separating IDA from ACD. This is exacerbated by the lack of correlation between hepcidin / prohepcidin and Tsat & sTfR, which are well established indices for classification of anemia. In contrast, we found a positive correlation between hepcidin and ferritin, something that is rather expected, since both are acute phase proteins and their levels are increased during active inflammatory process.

In the **second study**¹⁸, in the same patient and HC population, the utility of a conventional index (RDW) and four new generation indices (IRF, RSF, RDWR-CV, RDWR-SD) in the evaluation of anemia of IBD was investigated. Red cell and reticulocyte indices were measured using the Coulter LH 780 hematology analyzer (Beckman Coulter, Inc., California, USA). 30 patients (30%) had IDA (ferritin <30 micrograms / L & Tsat <16%), 4 patients (4%) had ACD (ferritin > 100 micrograms / L & Tsat <16%) and 8 patients (8%) had mixed IDA / ACD (ferritin = 30-100 μg / L & Tsat <16%). We found a significant correlation between red cell distribution width (RDW), red blood cell size factor (RSF) and reticulocyte distribution width-coefficient of variation (RDWR-CV) with Tsat and sTfR, but not with ferritin levels. Patients with IDA had significantly higher levels of RDW and RDWR-CV and significantly lower levels of RSF, compared with patients without IDA. High values of RDW (sensitivity 93%, specificity 81%) and low values of RSF (sensitivity 83%, specificity 82%) were the best markers for diagnosis of IDA. There was a significant correlation of RDWR-CV and RDWR-SD (Standard Deviation) with disease activity and CRP levels. Concerning new indices, this is the first evaluation study in this group of patients. It seems that RDW may be proposed as a suitable index for the differential diagnosis between IDA

and ACD, in patients with active IBD. However, this study failed to confirm this hypothesis because of the small number of patients with ACD, making any clear conclusions unsafe. IRF is the ratio of immature reticulocytes to the total number of them. In our study, IRF was significantly increased in patients compared to HC, but both groups were within normal limits, according to manufacturer's range (0.20-0.40). This finding seems reasonable, taking into account the continuous blood loss in patients with IBD, often subclinical, as a result of chronic inflammation in the intestine, thus leading to increased driver signal for erythropoiesis in the bone marrow, even under conditions of low iron availability, due to reduced absorption. It seems that IRF is an indicator of rather limited utility in the evaluation of anemia in IBD, which was also confirmed by the results of our study, where there was no correlation with ferritin, Tsat and sTfR, and no difference between patients with and without IDA. RSF connects MCV with MRV. The results of our study support the hypothesis that RSF seems to be a sensitive real-time parameter for early detection of erythropoiesis disorders in functional iron deficiency, in patients with IBD. In our study RDWR-SD was significantly elevated in patients compared with HC ($p < 0.0001$), and RDWR-CV was increased both in patients (compared to HC) and patients with IDA (compared to those with non-IDA). Given the strong negative correlation of the latter with Tsat and positive correlation with sTfR, it seems that RDWR-CV is a sensitive indicator of the reticulocytes population dispersion, reflecting a real-time monitoring of reticulocytes production, beyond the established reticulocyte number index, which rather seems to correspond to a single moment in the reticulocytes life-cycle. Furthermore, both RDWR-CV and RDWR-SD correlated well with disease activity and CRP, a promising finding on the basis that these indices could be combined with others (corresponding only to iron deficiency), so to separate the subgroup of patients with pure IDA (not mixed with ACD). In conclusion, this is the first study to demonstrate the usefulness of the reticulocytes indices in the evaluation of anemia in patients with IBD. RSF and RDWR, alone or in combination with RDW and other well-established indices of anemia and inflammation (Tsat, sTfR, CRP), show great promise as new sensitive tools, providing the clinician with a lot of data from a fairly simple and inexpensive full blood count.

The **third study**^{19,20}, also in the same group of patients and HC, investigated the use of soluble transferrin receptor (sTfR) and sTfR-ferritin ratio (sTfR-F, sTfR/log₁₀ ferritin) in the evaluation of anemia in patients with IBD. In this study it was found that patients with IDA had significantly higher levels of sTfR, compared to those without

IDA (i.e. with other types of anemia or without anemia). Similarly, patients with IDA had significantly higher sTfR-F levels, compared to those without IDA. Furthermore, patients with IDA had significantly higher sTfR & sTfR-F levels, compared to patients with ACD (including mixed IDA / ACD) ($P < 0.0001$). The sensitivity of high sTfR for diagnosing IDA, with cutoff level 1.8 mg / L was 81%, specificity 80%, PPV 63% and NPV 91%. Similarly, the sensitivity of high sTfR-F for the diagnosis of IDA with 1.4 as cutoff limit was 91%, specificity 92%, while the PPV was 83% and NPV 96%. No significant correlation between sTfR or sTfR-F and CRP levels was found. This is the first study evaluating sTfR-F index in patients with IBD. This study showed that sTfR-F appears quite effective in the detection and diagnosis of IDA in patients with IBD. The detection rate is higher than that of sTfR and certainly higher than other existing indices. It is important to add that the clinical use of this index rather adds (and not replaces) to the value of other well established markers such as ferritin, transferrin and Tsat, in the diagnosis of IDA. Therefore, sTfR-F can be recommended as an additional parameter, which can improve the diagnosis of IDA in patients with IBD.

The **fourth study**²¹ was focused on the safety and efficacy of total dose low-MW iron dextran infusion in patients with anemia and IBD. The study included 50 patients with IBD (27 women, 35 with CD, 15 with UC). The [mean \pm standard deviation] of hemoglobin and ferritin level before infusion was 9.88 ± 1.42 g / dL and 13.9 ± 10.9 ng / ml, respectively. Following administration of a 25 mg test dose, low molecular weight iron dextran was then infused intravenously in one single session, with a dose calculated according to the iron deficit. In all patients clinical and laboratory parameters were recorded, before and 4 weeks after treatment. 4 patients (8%) experienced adverse events during the test dose and were not given full dose. Only one patient had an allergic reaction during infusion of total dose. In the remaining 45 patients, the mean dose of iron administered was 1075 ± 269 mg. The average rise in hematocrit and hemoglobin at week 4 was $4.9 \pm 1.9\%$ and 1.7 ± 0.8 g / dL, respectively. Hematopoietic response was observed in 23 of 45 patients (51.1%). The results of this study suggest that IV administration of low-MW iron dextran may be useful in the treatment of IDA in IBD. This approach is effective, simple, well accepted and friendly to patients. A minority of patients (approximately 10%) may develop allergic reactions, and should be excluded from total dose infusion.

4. References

1. Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2011 May;140(6):1785-94.
2. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2011;474:307-17.
3. Cho JH, Brant SR. Recent insights into the genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2011;140:1704-12.
4. Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C et al. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996; 379: 821-823.
5. Chassaing B, Darfeuille-Michaud A. The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 2011;140:1720-28.
6. Abraham C, Medzhitov R. Interactions between the host innate immune system and microbes in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 2011;140:1729-37.
7. Kaser A, Blumberg RS. Autophagy, microbial sensing, endoplasmic reticulum stress, and epithelial function in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 2011;140:1738-47.
8. Glover LE, Colgan SP. Hypoxia and metabolic factors that influence Inflammatory Bowel Disease pathogenesis. *Gastroenterology* 2011;140:1748-55.
9. Strober W, Fuss IJ. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* 2011;140:1756-67.
10. MacDonald TT, Monteleone I, Fantini MC, Monteleone G. Regulation of homeostasis and inflammation in the intestine. *Gastroenterology* 2011;140:1768-75.
11. Gasche C. Anemia in inflammatory bowel diseases. Bremen: UNI-MED, 2008: pp 46-47.
12. Weiss G, Goodnough LT. Anemia of chronic disease. *N Engl J Med*. 2005;352:1011–1023.
13. Muñoz M, García-Erce JA, Remacha AF. Disorders of iron metabolism. Part 1: molecular basis of iron homeostasis. *J Clin Pathol*. 2011;64:281-6.
14. Gasche C, Berstad A, Befrits R, Beglinger C, Dignass A, Erichsen K, Gomollon F, Hjortswang H, Koutroubakis I, Kulnigg S, Oldenburg B, Rampton D, Schroeder O, Stein J, Travis S, Van Assche G. Guidelines on the diagnosis and management of iron deficiency and anemia in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:1545–1553.
15. Oustamanolakis P, Koutroubakis IE, Kouroumalis EA. Diagnosing anemia in inflammatory bowel disease: Beyond the established markers. *Journal of Crohn's and Colitis* (2011), doi:10.1016/j.crohns.2011.03.010.
16. Nemeth E. Targeting the hepcidin-ferroportin axis in the diagnosis and treatment of anemias. *Adv Hematol*. 2010;2010:750643.

17. Oustamanolakis P, Koutroubakis IE, Messaritakis I, Malliaraki N, Sfiridaki A, Kouroumalis EA. Serum hepcidin and prohepcidin concentrations in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2011;23(3):262-268.
18. Oustamanolakis P, Koutroubakis IE, Messaritakis I, Kefalogiannis G, Niniraki M, Kouroumalis EA. Measurement of reticulocyte and red blood cell indices in the evaluation of anemia in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis.* 2011;5(4):295-300.
19. Oustamanolakis P, Koutroubakis IE, Messaritakis I, Niniraki M, Kouroumalis EA. Soluble transferrin receptor- ferritin index in the evaluation of anemia in inflammatory bowel disease: a case-control study. *Ann Gastroenterol* 2011;24(2):110-116
20. Oustamanolakis P, Koutroubakis IE. Soluble transferrin receptor- ferritin index is the most efficient marker for the diagnosis of iron deficiency anemia in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2011; in press.
21. Koutroubakis IE, Oustamanolakis P, Karakoidas C, Mantzaris GJ, Kouroumalis EA. Safety and Efficacy of Total-Dose Infusion of Low Molecular Weight Iron Dextran for Iron Deficiency Anemia in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Dig Dis Sci.* 2010; 55(8): 2327-31.