

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ - ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ
Δ/ντής Καθηγητής Γ. Ηλιόπουλος

**Διαγνωστική προσέγγιση και γονιδιακή
ανάλυση της α⁺-θαλασσαιμίας στον πληθυσμό
της Κρήτης**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ζωή Ρεπαίνου-Νεραντζουλάκη
Μικροβιολόγος
Αναπλ. Διευθύντρια Αιματολογικού Εργαστηρίου

Ηράκλειο 2007

**Διαγνωστική προσέγγιση και γονιδιακή
ανάλυση της α^+ -θαλασσαιμίας στον πληθυσμό
της Κρήτης**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γ. ΗΛΙΟΠΟΥΛΟΣ	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
Δ. ΜΑΥΡΟΥΔΗΣ	ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
Ε. ΠΑΠΑΔΑΚΗ	ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γ. ΣΑΜΩΝΗΣ	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
Δ. ΜΑΥΡΟΥΔΗΣ	ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
Ε. ΠΑΠΑΔΑΚΗ	ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
Δ. ΣΠΑΝΤΙΔΟΣ	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
Α. ΜΑΡΓΙΩΡΗΣ	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
Α. ΗΛΙΟΠΟΥΛΟΣ	ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
Χ. ΤΣΑΤΣΑΝΗΣ	ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Στη μνήμη του πατέρα μου

Στους γιους μου

Μενέλαο και Δημήτρη

Σύντομο Βιογραφικό σημείωμα

Όνοματεπώνυμο : Ζωή Δημητρίου Ρεπατίνου
Χρόνος και τόπος γέννησης : 16 Ιουνίου 1952 - Σπάρτη Λακωνίας
Οικογενειακή κατάσταση : Έγγαμη με δύο παιδιά
Διεύθυνση κατοικίας : Αναγεννήσεως 25, 71305 Ηράκλειο Κρήτης
τηλ. 2810-211020

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ - ΤΙΤΛΟΙ ΣΠΟΥΔΩΝ

- 1971-1977** : Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών (βαθμός πτυχίου «λίαν καλώς»).
- 1977-1978** : Υπηρεσία υπαίθρου στο Βενιζέλιο Νοσοκομείο Ηρακλείου
- 1978-1981** : Ειδίκευση στη Μικροβιολογία στο Γενικό Κρατικό Νοσοκομείο Αθηνών.
- 1981** : Απόκτηση τίτλου ειδικότητας στη Μικροβιολογία.
- 1981-1990** : Άσκηση ελεύθερου επαγγέλματος στους Μολάους Λακωνίας.
- 1990-σήμερα**: Υπεύθυνη ιατρός του Τμήματος Αιμολυτικού ελέγχου-Μεσογειακής αναιμίας του Αιματολογικού Εργαστηρίου του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου, ως Επιμελήτρια Α΄(1990-2002) και ως Αναπληρώτρια Διευθύντρια (2002-σήμερα).
- 2002-2005** : Μετεκπαίδευση στο Τμήμα Προγεννητικού Ελέγχου του Εθνικού Κέντρου Μεσογειακής αναιμίας του Γενικού Λαϊκού Νοσοκομείου Αθηνών με αντικείμενο τη γονιδιακή ανάλυση των θαλασσαιμικών συνδρόμων.

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ

Α) Σε Ελληνικά Περιοδικά και Συνέδρια

1. Καφιμάλη Β, Βαϊόπουλος Γ, Παπαδάκη Ε, **Ρεπαπίνου Ζ**, Ηλιόπουλος Γ. Λεμφοκυτταρικοί υποπληθυσμοί και κυτταρολυτική δραστηριότητα των ΝΚ-κυττάρων σε πάσχοντες από προχωρημένο πολλαπλούν μυέλωμα. Ιατρική 1993, 64(4): 377-381
2. Χατζής Χ, Καφάτος Α, Κυριάκου Δ, **Ρεπαπίνου Ζ**, Ξυλούρη Ε, Castenmiller J, West C. Σιδηροπενική αναιμία σε κορίτσια εφηβικής ηλικίας στην Κρήτη. Παιδιατρική 1998, 61: 573-584
3. Μελεσσανάκη Μ, Στειακάκη Ε, **Ρεπαπίνου Ζ**, Πρεμέτης Α, Σταμουλακάτου Α, Μαρκάκη Ε, Καλμαντή Μ. Συγγενής δυσερυθροποιητική αναιμία τύπου ΙΙ (CDA ΙΙ). 38^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο. 16-18 Ιουνίου 2000, Κως.
4. Κυριακάκης Η, **Ρεπαπίνου Ζ**, Γιαννοπούλου Ε, Μαθιουδάκη Ε, Τζεδάκη Σ, Προυκάκης Ν, Ηλιόπουλος Γ. Ευρήματα από τη δοκιμασία τιτλοποίησης ψυχροσυγκολλητινών στον ορό ασθενών κατα την τριετία 1998-2000. 27^ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο. 8-12 Μαΐου 2001, Αθήνα.
5. Καψωριτάκη Α, **Ρεπαπίνου Ζ**, Μπολωνάκη Ε, Γιαννοπούλου Ε, Χρονάκη Ε, Κανετάκης Μ, Μαυρουδής Δ, Ηλιόπουλος Γ. Επίπεδα μεθαιμοσφαιρίνης αίματος σε αιμοδότες. 12^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο. 22-25 Νοεμβρίου 2001, Αθήνα.
6. Μαθιουδάκη Ε, **Ρεπαπίνου Ζ**, Κυριακάκης Η, Γιαννοπούλου Ε, Τζεδάκη Σ, Προυκάκης Ν, Μαυρουδής Δ, Ηλιόπουλος Γ. Ολικές πορφυρίνες ούρων σε φυσιολογικά άτομα. 12^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο. 22-25 Νοεμβρίου 2001, Αθήνα.
7. **Ρεπαπίνου Ζ**, Γιαννοπούλου Ε, Ανδρουλάκης Ν, Κανετάκης Μ, Ηλιόπουλος Γ. Ανάπτυξη Τμήματος ειδικών εξετάσεων Αιμολυτικού ελέγχου στο Αιματολογικό Εργαστήριο. Δελτίον Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας 2001,46(2): 190-193
8. Στυλιανουδάκη Ε, **Ρεπαπίνου Ζ**, Διλιντάς Α, Λυδάκη Ε, Γιαννοπούλου Ε, Καψωριτάκη Α, Μαυρουδής Δ, Ηλιόπουλος Γ. Τιμές αιμοσφαιρίνης

πλάσματος σε αιμοδότες. 11^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο. 1-3 Νοεμβρίου 2002, Χανιά.

9. **Ρεπαπίνου Ζ**, Καραμπάμπα Φ, Γυπαράκι Μ, Καφαράκης Β, Παπαδάκη Ε.Α, Μαυρουδής Δ, Λουτράδη Α, Ηλιόπουλος Γ. Διαγνωστική αξία των μορφολογικών ερυθροκυτταρικών αλλοιώσεων και των εγκλείστων HbH στην εργαστηριακή προσέγγιση των ήπιων μορφών α-θαλασσαιμίας. 15^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο. 24-28 Νοεμβρίου 2004, Αθήνα.

Β) Σε Διεθνή Περιοδικά και Συνέδρια

1. **Repapinou Z**, Kyriakou D, Hatzis C, Kafatos A, Eliopoulos G.D. Haematological parameters in children of 6 years in the island of Crete. 4th Mediterranean Medical Congress. 13-17 November 1996, Limassol, Cyprus.
2. **Repapinou Z**, Xylouri I, Tzanakis N, Simandiraki M, Paraskakis M, Kyriakou D. Adhesion molecules in acute respiratory distress syndrome (ARDS). 5th Mediterranean Medical Congress. 25-27 September 1998, Samos, Greece.
3. **Repapinou Z**, Xylouri I, Niotis D, Spatharaki P, Paraskakis M, Kyriakou D, Bouros D. TNFa and sCD23 molecules as possible predictive factors in the development of acute respiratory distress syndrome (ARDS). 5th Mediterranean Medical Congress. 25-27 September 1998, Samos, Greece.
4. Xylouri I, **Repapinou Z**, Simandiraki M, Oeconomaki E, Tsiaousis J, Chalkiadakis G, Kyriakou D. Circulating anticoagulant against factor XII associated with liver metastasis of stomach adenocarcinoma. 5th Mediterranean Medical Congress. 25-27 September 1998, Samos, Greece.
5. Xylouri I, **Repapinou Z**, Neonakis I, Niniraki M, Katsanevaki Z, Kyriakou D, Kandidaki E. Antithrombin III, protein C and S in healthy adults. 5th Mediterranean Medical Congress. 25-27 September 1998, Samos, Greece.

-
6. Manoura A, Hatzidaki E, Christodoulaki M, Korakaki E, Galanaki H, **Repapinou Z**, Giannakopoulou G. Anaemia due to massive chronic foetomaternal hemorrhage. *Haematologia* 1999, 29(4):319-321
 7. **Repapinou Z**, Karababa Ph, Boussiou M, Kafarakis V, Papadaki HA, Mavroudis D, Eliopoulos GD, Loutradi-Anagnostou A. Diagnostic approach of the α^+ -thalassemia carriers. 10^o International Conference on Thalassaemia and Haemoglobinopathies. January 7-10, 2006, Dubai, United Emirates.
 8. **Repapinou Z**, Karababa Ph, Boussiou M, Kafarakis V, Papadaki HA, Mavroudis D, Eliopoulos GD, Loutradi-Anagnostou A. α -Thalassemia carriers in Crete. Haematological and molecular study. 11th Congress of the European Hematology Association. June 15-18, 2006, Amsterdam, the Netherlands.
 9. **Repapinou Z**, Karababa Ph, Boussiou M, Kafarakis V, Papadaki HA, Mavroudis D, Eliopoulos GD, Loutradi-Anagnostou A. An improved method for the diagnostic approach of α^+ -thalassemia. *International Journal of Laboratory Hematology* 2007, 29:45-51
 10. **Repapinou Z**, Karababa Ph, Neonakis I, Boussiou M, Papadaki HA, Mavroudis D, Eliopoulos GD, Loutradi-Anagnostou A. α -Thalassemia carriers in Crete: haematological and molecular study. *Haema* (in press).

Γ) Συγγραφή Σημειώσεων με τίτλο ΑΙΜΟΛΥΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ - ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ (ΘΕΩΡΙΑ-ΤΕΧΝΙΚΕΣ)

Αντί προλόγου

Με μεγάλη χαρά δέχτηκα από τον καθηγητή Αιματολογίας και Διευθυντή του Αιματολογικού Εργαστηρίου κύριο Γεώργιο Ηλιόπουλο και την κυρία Αφροδίτη Λουτράδη, Διευθύντρια του Κέντρου Μεσογειακής αναιμίας, την έγκριση της μετεκπαίδευσής μου στο Τμήμα Προγεννητικού ελέγχου του Εθνικού Κέντρου Μεσογειακής αναιμίας του Γενικού Λαϊκού Νοσοκομείου Αθηνών. Εκεί, κατά τους πρώτους μήνες της εκπαίδευσής μου στη DNA ανάλυση των θαλασσαιμικών συνδρόμων, άρχισα την εκπόνηση διδακτορικής διατριβής με θέμα τη γονιδιακή ανάλυση της α -θαλασσαιμίας στην Κρήτη, μελετώντας ενδιαφέροντα περιστατικά α -θαλασσαιμίας που είχαν εξετασθεί στο Αιματολογικό Εργαστήριο κατά το διάστημα 1990-2002. Θέλω ως εκ τούτου να ευχαριστήσω:

Τον κύριο Ηλιόπουλο που πάντα με ενεθάρρυνε και με τόσο ενθουσιασμό και εμπιστοσύνη δέχτηκε να με βοηθήσει και στην προσπάθειά μου αυτή ως πρόεδρος της Τριμελούς Επιτροπής.

Την κυρία Λουτράδη που με τόση ζεστασιά με δέχτηκε στο Κέντρο Μεσογειακής αναιμίας και με μεγάλη προθυμία μου προσέφερε κάθε βοήθεια κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής.

Την κυρία Φωτεινή Καραμπάμπα, Βιολόγο του Τμήματος Προγεννητικού ελέγχου, της οποίας η βοήθεια ήταν για μένα καθοριστική. Με την εμπειρία της πάνω στο συγκεκριμένο θέμα έκανε τις δύσκολες στιγμές μου εύκολες. Την ευχαριστώ ιδιαίτερα.

Τις Βιολόγους του Τμήματος Προγεννητικού ελέγχου κυρίες Μαρίνα Μπουσίου και Κλειώ Σινοπούλου για τις πολύτιμες συμβουλές τους.

Όλο το προσωπικό του Τμήματος Προγεννητικού ελέγχου για την καθημερινή τους βοήθεια στο Εργαστηριακό(τεχνικό) μέρος της εργασίας μου.

Τη Βιολόγο κυρία Μαριλένα Γυπαράκι, τον Αιματολόγο κύριο Παναγιώτη Τσαφταρίδη και όλο το προσωπικό του Τμήματος Πρόληψης για τη βοήθειά τους σε θέματα ηλεκτροφόρησης αιμοσφαιρίνης.

Τον κύριο Δημήτρη Μαυρουδή Αναπληρωτή Καθηγητή Παθολογικής Ογκολογίας, για τη σημαντική βοήθειά του στη δημοσίευση των εργασιών, και

την κυρία Ελένη Παπαδάκη Επίκουρη Καθηγήτρια Αιματολογίας, μέλη της Τριμελούς Επιτροπής.

Το προσωπικό του Αιματολογικού Εργαστηρίου και ιδιαίτερα τις συνεργάτιδες μου κυρίες Σωτηρία Τζεδάκη, Ελένη Χρονάκη και Αργυρώ Βασιλάκη για την πολύτιμη συμβολή τους στη διεκπεραίωση των εξετάσεων του Αιμολυτικού ελέγχου στο Αιματολογικό Εργαστήριο ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια της μετεκπαίδευσής μου στην Αθήνα.

Τους εξεταζόμενους για την προθυμία με την οποία δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην παρούσα μελέτη.

Όλους όσους συνέβαλαν με οποιοδήποτε τρόπο στην πραγματοποίηση της διδακτορικής μου διατριβής.

Ζωή Ρεπαπίνου

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

A	Αδερίνη
Arg	Αργινίνη
ASO	Ειδικά αλληλόμορφα ολιγονουκλεοτίδια
bp	ζεύγη βάσεων
C	Κυτοσίνη
cd	κωδικόνιο
del	έλλειψη
DNA	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
G	Γουανίνη
Gln	Γλουταμίνη
Glu	Γλουταμινικό οξύ
Hb	Αιμοσφαιρίνη
Hb/πάθεια	Αιμοσφαιρινοπάθεια
His	Ιστιδίνη
HPLC	Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης
Hph	ενδονουκλεάση Hph 1(Haemophilus parahaemolyticus)
HPFH	Κληρονομική παραμονή της εμβρυικής αιμοσφαιρίνης
IVS	Παρεμβαλλόμενη αλληλουχία
kb	χιλιοβάσεις
Leu	Λευκίνη
Lys	Λυσίνη
MCH	Μέση συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης ερυθροκυττάρων
MCV	Μέσος όγκος ερυθροκυττάρων
mRNA	αγγελιαφόρο RNA
PCR	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
Phe	Φαινυλαλανίνη
RBC	ερυθροκύτταρα
RNA	Ριβονουκλεϊκό οξύ
RFLP	Restriction Fragment Length polymorphism
Ser	Σερίνη
T	Θυμίνη
Tyr	Τυροσίνη
Val	Βαλίνη

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	14
1.1. ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗ	14
1.1.1. Γενικά.....	14
1.1.2. Αιμοσφαιρίνες του ανθρώπου.....	14
1.2. ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΕΣ.....	15
Ορισμός – Μορφές – Συχνότητα	15
1.3. α-ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΑ.....	17
1.3.1. Ορισμός – Μορφές – Συχνότητα.....	17
1.3.2. Συχνότητα και γονότυποι στον Ελληνικό πληθυσμό.....	19
1.4. ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΩΝ α-ΑΛΥΣΙΔΩΝ.....	23
Δομή - Λειτουργία - Ρύθμιση - Έκφραση των α-γονιδίων.....	23
1.5. ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΣΤΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ α-ΑΛΥΣΙΔΩΝ	25
1.5.1. Διαταραχές που δεν προκαλούν φαινότυπο α-θαλασσαιμίας.....	25
1.5.2. Διαταραχές που προκαλούν φαινότυπο α-θαλασσαιμίας.....	25
1.5.2. α. Ελλειπτικές μορφές α-θαλασσαιμίας	26
1.5.2. β. Μη ελλειπτικές μορφές α-θαλασσαιμίας.....	28
Α) Μεταλλαγές που επηρεάζουν την ωρίμανση του mRNA.....	28
Β) Μεταλλαγές που επηρεάζουν τη μετάφραση του mRNA.....	29
Γ) Μεταλλαγές που επηρεάζουν τη μεταμεταφραστική διαδικασία.....	30
1.5.2. γ. Κλινικοί φαινότυποι	31
1.6. ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ α-ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΑΣ.....	32
1.6.1. Αιματολογικός έλεγχος - Βιοχημικός έλεγχος.....	32
1.6.2. Μοριακή ανάλυση.....	36
1.6.3. Πρόληψη και προγεννητική διάγνωση	37
2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	40
2.1. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΘΕΜΑ	40
2.1.1. Σκοπός της μελέτης.....	40
2.1.2. Τα μέχρι τώρα δεδομένα.....	41
2.1.3. Ερευνητικό ερώτημα.....	41
2.2. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	42
2.2.1. Εξετασθέντα άτομα.....	42
2.2.2. Παράμετροι αναφοράς.....	43
2.2.2.α. Ερυθροκυτταρικές παράμετροι	43
2.2.2.β. Μορφολογία ερυθροκυττάρων	43
2.2.2.γ. Μέτρηση σιδήρου και φερριτίνης ορού.....	46
2.2.2.δ. Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των αιμοσφαιρινών.....	46
2.2.2.ε. Ανίχνευση ενδοερυθροκυτταρικών εγκλειστών HbH	47
2.2.3. Ειδικές μέθοδοι – Μοριακή ανάλυση	49
2.2.3.α. Απομόνωση DNA.....	50
2.2.3.β. Άμεση αποκάλυψη σημειακών υποκαταστάσεων ή μικρών ελλείψεων γενετικού υλικού.....	52

A) Ενζυμικός in vitro πολλαπλασιασμός του DNA (PCR).....	53
B) Μεταφορά και μονιμοποίηση του PCR προϊόντος σε ημιπερατή μεμβράνη...56	
Γ) Επιλογή και σήμανση συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων	56
Δ) Υβριδισμός του DNA που έχει μονιμοποιηθεί στην ημιπερατή μεμβράνη με ραδιενεργά σημασμένα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια	59
Ε) Ερμηνεία των αποτελεσμάτων	61
2.2.3.γ. Ανίχνευση της -α ^{3,7} έλλειψης με εκλεκτικό ενζυμικό πολλαπλασιασμό του DNA (gap PCR).....	61
2.2.4. Αντιδραστήρια	64
2.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	66
2.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	68
2.4.1. Συζήτηση.....	68
2.4.2. Συμπεράσματα	70
2.4.3. Τελικό συμπέρασμα.....	70
2.5. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	71
3. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	73
4. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	83
ABSTRACT.....	84

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗ

1.1.1. Γενικά

Η αιμοσφαιρίνη είναι μια σύνθετη πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 64.000 daltons της οποίας το μόριο είναι σχεδόν σφαιρικό, με μέγιστη διάμετρο περίπου 6,4 nm. Πρόκειται για ένα τετραμερές, αποτελούμενο από δύο ζεύγη πολυπεπτιδικών αλυσίδων σε κάθε μία από τις οποίες είναι προσκολλημένη μια προσθετική ομάδα έντονα χρωματισμένη, η αίμη, ένα σύμπλεγμα σιδήρου και πρωτοπορφυρίνης. Το πρωτεϊνικό τμήμα του μορίου ονομάζεται σφαιρίνη¹.

1.1.2. Αιμοσφαιρίνες του ανθρώπου

Οι φυσιολογικοί ενήλικες έχουν μια κύρια αιμοσφαιρίνη, την HbA, που αντιπροσωπεύει περίπου το 97% του συνόλου της αιμοσφαιρίνης και μια δευτερεύουσα, την HbA₂, σε ποσοστό 2-3%. Η κύρια αιμοσφαιρίνη κατά την εμβρυϊκή ζωή είναι η HbF, ίχνη της οποίας ανευρίσκονται και σε φυσιολογικούς ενήλικες. Υπάρχουν ακόμα τρεις εμβρυονικές αιμοσφαιρίνες, η Gower 1 και 2 και η Hb Portland. Η παραγωγή αυτών των διαφορετικών αιμοσφαιρινών αντικατοπτρίζει μια φυσιολογική διαδικασία προσαρμογής στις μεταβαλλόμενες απαιτήσεις για οξυγόνο, κατά τα διάφορα στάδια της ανάπτυξης.

Επιπλέον, υπάρχουν και κάποια δευτερεύοντα αιμοσφαιρινικά μόρια ως αποτέλεσμα μετασυνθετικών τροποποιήσεων οι οποίες μπορεί να λάβουν χώρα είτε *in vivo* είτε *in vitro*, κατά τη διάρκεια της φύλαξης των δειγμάτων στο Εργαστήριο. Συχνότερα ανιχνεύονται η HbA_{1c} (προϊόν αντίδρασης της HbA με τη γλυκόζη), η HbA₃ (προϊόν σύνδεσης της γλουταθειόνης με την αιμοσφαιρίνη) καθώς και η ακετυλιωμένη μορφή της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης (HbF₁).

Όλες οι φυσιολογικές αιμοσφαιρίνες του ανθρώπου είναι τετραμερή, αποτελούμενα από δύο ζεύγη ανόμοιων αλυσίδων σφαιρίνης. Οι αιμοσφαιρίνες των ενηλίκων και η εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη έχουν α αλυσίδες

συνδεδεμένες με β (HbA, $\alpha_2\beta_2$), δ (HbA₂, $\alpha_2\delta_2$) ή γ αλυσίδες (HbF, $\alpha_2\gamma_2$) ενώ στις εμβρυονικές αιμοσφαιρίνες συνδυάζονται ζ αλυσίδες με γ (Hb Portland, $\zeta_2\gamma_2$) ή ε (Hb Gower 1, $\zeta_2\varepsilon_2$) και α αλυσίδες με ε (Hb Gower 2, $\alpha_2\varepsilon_2$). Οι ζ και ε αλυσίδες είναι στην πραγματικότητα τα εμβρυϊκά ανάλογα των ενήλικων αλυσίδων α και β, γ, δ αλυσίδων, αντίστοιχα. Η αιμοσφαιρίνη HbF είναι ετερογενής και, τόσο στα έμβρυα όσο και στους ενήλικες, είναι ένα μείγμα από μόρια στα οποία α αλυσίδες συνδυάζονται με γ αλυσίδες που περιέχουν στη θέση 136 είτε γλυκίνη είτε αλανίνη και αναφέρονται αντίστοιχα ως $^G\gamma$ ή $^A\gamma$ αλυσίδες².

1.2. ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΕΣ

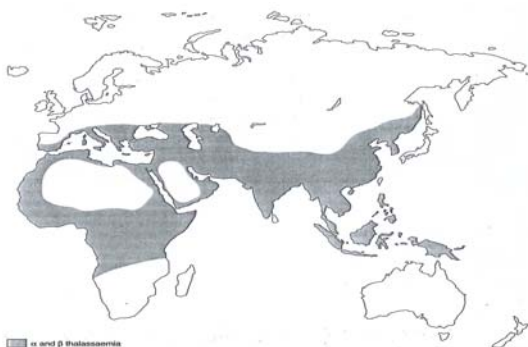
Ορισμός - Μορφές - Συχνότητα

Ο όρος «θαλασσαιμία» δεν αναφέρεται στην πραγματικότητα σε μία ασθένεια αλλά σε ομάδα ασθενειών, κάθε μια από τις οποίες είναι το αποτέλεσμα κληρονομικών διαταραχών της παραγωγής των σφαιρινών³ και αποτελούν μέρος μιας ομάδας διαταραχών που είναι γνωστές ως αιμοσφαιρινοπάθειες οι οποίες μπορούν αδρά να χωριστούν σε δύο κατηγορίες. Στην πρώτη ανήκουν διαταραχές, όπως η δρεπανοκυτταρική αναιμία, που προκύπτουν από μια κληρονομική δομική μεταβολή σε μια από τις σφαιρινικές αλυσίδες με αποτέλεσμα την παραγωγή παθολογικών αιμοσφαιρινών. Παρά το ότι αυτές οι παθολογικές αιμοσφαιρίνες μπορεί να παράγονται σε μειωμένη ποσότητα ή να αποδομούνται γρηγορότερα σε σχέση με τη φυσιολογική αιμοσφαιρίνη των ενηλίκων, η κλινική εικόνα που προκύπτει οφείλεται στις φυσικές ιδιότητες της παθολογικής αιμοσφαιρίνης. Στη δεύτερη μεγάλη κατηγορία των αιμοσφαιρινοπαθειών ανήκουν οι θαλασσαιμίες. Ο όρος «θαλασσαιμία» χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Whipple και Bradford το 1932, στην κλασσική εργασία τους για την παθολογία της νόσου. Η λέξη προέρχεται από την ελληνική λέξη «θάλασσα». Πρόκειται για μία τόσο συχνή διαταραχή, ιδίως στις περιοχές της Μεσογείου και της Ν.Α. Ασίας, ώστε είναι απίθανο να μην είχε παρατηρηθεί από τους γιατρούς της εποχής, πριν από τις πρώτες κλινικές περιγραφές, το 1925. Παρ'

όλα αυτά, υπάρχουν ελάχιστες ενδείξεις ότι είχε αναγνωριστεί ως ξεχωριστή οντότητα, πριν από εκείνη την περίοδο².

Οι κύριες μορφές θαλασσαιμίας είναι η β-, δβ-, γ-, δ-, εγδβ-, α-θαλασσαιμία (ανάλογα με το είδος των σφαιρινικών αλυσίδων των οποίων διαταράσσεται ο ρυθμός σύνθεσης) και η κληρονομική παραμονή της HbF κατά την ενήλικη ζωή (HPFH). Από τη στιγμή που οι δομικές παραλλαγές των αιμοσφαιρινών και οι θαλασσαιμίες εμφανίζονται με μεγάλη συχνότητα σε ορισμένους πληθυσμούς, είναι πιθανή η παρουσία των δύο αυτών μορφών γενετικής διαταραχής στο ίδιο άτομο. Από τις διάφορες γενετικές παραλλαγές θαλασσαιμίας και τους συνδυασμούς τους με τα γονίδια παθολογικών αιμοσφαιρινών προκύπτει μια ομάδα διαταραχών, γνωστών συνολικά ως θαλασσαιμικά σύνδρομα³.

Η θαλασσαιμία έχει υψηλή επίπτωση σε μια ευρεία περιοχή, η οποία περιλαμβάνει τη λεκάνη της Μεσογείου, τμήματα της Αφρικής, τη Μέση Ανατολή, την Ινδία τη Νοτιο-ανατολική Ασία και τη Μελανησία (εικ. 1). Στις περιοχές αυτές, όπου προκύπτουν τα περισσότερα προβλήματα δημόσιας υγείας, πρέπει να προστεθούν και μερικές χώρες της Κεντρικής και Νοτίου Αμερικής, οι οποίες δέχτηκαν ένα σημαντικό όγκο μεταναστών από την Ευρώπη (κυρίως από την Ιταλία) κατά τον προηγούμενο αιώνα. Η ύπαρξη της θαλασσαιμίας έχει τεκμηριωθεί, έστω και σε μικρές συχνότητες, σε πολλές άλλες περιοχές του κόσμου. Σχεδόν οπουδήποτε διεξήχθη κάποια σοβαρή έρευνα για την ανίχνευση της θαλασσαιμίας, αυτή είχε θετικά αποτελέσματα. Το 1949 ο J.B. Haldane υποστήριξε ότι η θαλασσαιμία εμφανίζει τις υψηλότερες συχνότητες της σε τροπικές περιοχές πιθανώς λόγω της προστασίας που απολαμβάνουν οι ετεροζυγώτες από την ελονοσία⁴.



Εικόνα 1. Παγκόσμια κατανομή α- και β-θαλασσαιμίας (Whaetherall D.J., 2001)

1.3. α-ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΑ

1.3.1. Ορισμός - Μορφές - Συχνότητα

Η α-θαλασσαιμία είναι μια συχνή κληρονομική διαταραχή η οποία οφείλεται σε μεταλλαγές σε ένα ή περισσότερα από τα 4 α-σφαιρινικά γονίδια με αποτέλεσμα τη μείωση ή την απουσία παραγωγής α-σφαιρινικών αλυσίδων^{5,6}. Εφόσον οι α αλυσίδες είναι παρούσες στις αιμοσφαιρίνες τόσο των εμβρύων όσο και των ενηλίκων, μια ανεπάρκεια στην παραγωγή τους θα επηρεάσει τη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης τόσο κατά την εμβρυϊκή όσο και κατά την ενήλικη ζωή. Μια ελάττωση στο ρυθμό παραγωγής των α αλυσίδων στην εμβρυϊκή ζωή, οδηγεί σε περίσσεια γ αλυσίδων οι οποίες σχηματίζουν γ₄ τετραμερή (αιμοσφαιρίνη Bart's). Στους ενήλικες, η μείωση α αλυσίδων οδηγεί σε περίσσεια β αλυσίδων οι οποίες σχηματίζουν β₄ τετραμερή (αιμοσφαιρίνη H).

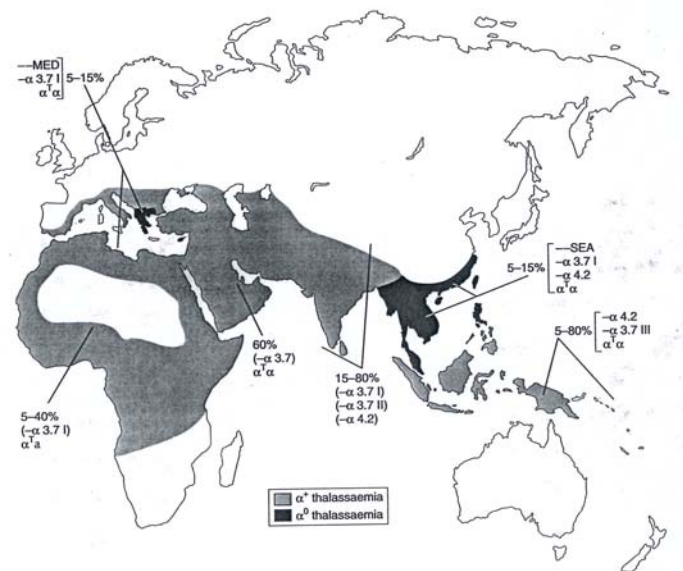
Δεδομένου ότι υπάρχουν δύο α-γονίδια σε κάθε χρωμόσωμα, η γενετική της α-θαλασσαιμίας είναι περισσότερο πολύπλοκη από αυτή της β-θαλασσαιμίας. Υπάρχουν δύο βασικές μορφές α-θαλασσαιμίας: α) η α⁰- (ή α-θαλασσαιμία 1), στην οποία δεν παράγονται α αλυσίδες από κανέναν από τους δύο α-γενετικούς τόπους του ελαττωματικού χρωμοσώματος και β) η α⁺- (ή α-θαλασσαιμία 2), στην οποία είναι επηρεασμένη η έκφραση του ενός μόνο από τα δύο α-σφαιρινικά γονίδια του παθολογικού χρωμοσώματος. Η α⁺-θαλασσαιμία περιλαμβάνει μορφές με έλλειψη (deletion types) και χωρίς έλλειψη γενετικού υλικού (non deletion types). Γενικά, όλοι οι τύποι α-θαλασσαιμίας είναι εξαιρετικά ετερογενείς σε μοριακό επίπεδο ενώ υπάρχουν δύο κύριοι κλινικοί φαινότυποι, ο εμβρυϊκός ύδρωπας με αιμοσφαιρίνη Bart's, ο οποίος συνήθως είναι το αποτέλεσμα ομοζυγωτίας για την α⁰-θαλασσαιμία και η Hb/πάθεια H, που συνήθως οφείλεται σε συνδυασμό α⁰- και α⁺-θαλασσαιμίας³.

Σήμερα είναι επίσης γνωστά δύο σύνδρομα στα οποία η α-θαλασσαιμία σχετίζεται με πνευματική καθυστέρηση (ATR)^{7,8}: α) το σύνδρομο ATR-16 το οποίο προκαλείται από μια μεγάλη έλλειψη στην τελομερική περιοχή του χρωμοσώματος 16 και β) το σύνδρομο ATRX το οποίο

προκαλείται από μεταλλαγές στο γονίδιο μιας πρωτεΐνης καλούμενης ATRX, η οποία ρυθμίζει την έκφραση των α -σφαιρικών γονιδίων. Πολύ σπάνια, ασθενείς με μυελοδυσπλασία εκδηλώνουν μια μορφή Hb/πάθειας H με σημαντική υπόχρωμη, μικροκυτταρική αναιμία, έγκλειστα HbH και ανιχνεύσιμα επίπεδα HbH στο περιφερικό αίμα⁹.

Λόγω των δυσκολιών της πρωτογενούς φαινοτυπικής ανίχνευσης (screening ελέγχου) της α -θαλασσαιμίας, όσα μέχρι σήμερα είναι γνωστά αναφορικά με την κατανομή και τη συχνότητά της προέρχονται από πληροφορίες από τη μέτρηση των επιπέδων της αιμοσφαιρίνης Bart's στα νεογνά σε συνδυασμό με τις διαθέσιμες πληροφορίες από μελέτες σε επίπεδο DNA.

Η συχνότητα των α -θαλασσαιμιών είναι ιδιαίτερα υψηλή στην Αφρική, τις Μεσογειακές χώρες, τη Μέση Ανατολή και τη Ν.Α. Ασία. Οι α^0 -θαλασσαιμίες είναι συχνότερες στους λαούς της Μεσογείου και της Άπω Ανατολής και εξαιρετικά σπάνιες στην Αφρική και τη Μέση Ανατολή ενώ οι μορφές της α^+ -θαλασσαιμίας με έλλειψη εμφανίζονται με μεγάλη συχνότητα στη Δυτική Αφρική, τη Μεσόγειο, τη Μέση Ανατολή και τη Ν.Α. Ασία (εικ. 2). Σε ορισμένες περιοχές στην Παπούα Νέα Γουϊνέα, πάνω από το 80% του πληθυσμού είναι φορείς α -θαλασσαιμίας με έλλειψη. Σχετικά με τις μορφές της α^+ -θαλασσαιμίας χωρίς έλλειψη, δεν έχει προσδιοριστεί επακριβώς η συχνότητά τους σε κάποιο πληθυσμό, ωστόσο έχουν σαφώς εντοπιστεί σε ορισμένες περιοχές των νησιών της Μεσογείου, καθώς επίσης της Μέσης Ανατολής και της Ν.Α. Ασίας. Δεδομένου ότι ο εμβρυϊκός ύδρωπας με αιμοσφαιρίνη Bart's και η Hb/πάθεια H προϋποθέτουν την ύπαρξη φορέων α^0 -θαλασσαιμίας, αυτές οι διαταραχές παρατηρούνται σε σημαντικό βαθμό μόνο στη Ν.Α. Ασία και σε περιοχές της Μεσογείου. Οι μεταλλαγές τερματισμού των α αλυσίδων, όπως η αιμοσφαιρίνη Constant Spring, φαίνεται ότι είναι ιδιαίτερα συχνές στη Ν.Α. Ασία και την Ταϊλάνδη (περίπου το 5% του πληθυσμού είναι φορείς αυτής της μεταλλαγής)³.



Εικόνα 2. Παγκόσμια κατανομή α^+ - και α^0 -θαλασσαιμίας (Whaetherall D.J., 2001)

1.3.2. Συχνότητα και γονότυποι στον Ελληνικό πληθυσμό

Στην Ελλάδα, η πρώτη περιγραφή της αιμοσφαιρινοπάθειας Η έγινε από τον Γούττα και τους συνεργάτες του ενώ ο Φέσσας ήταν από τους πρώτους που ασχολήθηκαν με τη γενετική της νόσου². Γενικά πάντως, οι πληροφορίες σχετικά με τη συχνότητα της α -θαλασσαιμίας στην Ελλάδα είναι περιορισμένες. Πριν από την εφαρμογή των μοριακών τεχνικών και την πλήρη διευκρίνιση των μοριακών βλαβών που προκαλούν α -θαλασσαιμία, ο υπολογισμός της συχνότητας των θαλασσαιμικών βλαβών στηρίχθηκε κυρίως στη μέτρηση των επιπέδων της αιμοσφαιρίνης Bart's στο αίμα του ομφάλιου λώρου νεογέννητων βρεφών. Μία μελέτη 500 δειγμάτων αίματος από ομφάλιο λώρο έδειξε ότι ένα ποσοστό περίπου 0,3% είχε υψηλά επίπεδα αιμοσφαιρίνης Bart's¹⁰. Μεταγενέστερη μελέτη επί 1600 ενηλίκων ατόμων επιβεβαίωσε την προηγούμενη μελέτη, καθορίζοντας τη συχνότητα της α -θαλασσαιμίας σε ποσοστό μικρότερο από 0,5%. Η διάγνωση βασίστηκε στους χαμηλούς ερυθροκυτταρικούς δείκτες και στην ταυτόχρονη παρουσία εγκλειστών HbH, ανιχνεύοντας έτσι κυρίως τους φορείς κάποιας α^0 -θαλασσαιμικής διαταραχής¹¹.

Σύμφωνα με μια άλλη έρευνα με βάση την αιματολογική εικόνα σε έναν πληθυσμό στην περιοχή της Άρτας, η συχνότητα της α -θαλασσαιμίας φάνηκε να φτάνει στα επίπεδα του 5%¹². Μεταγενέστερη μελέτη σε 70.000 άτομα από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας, που έγινε από τη Μονάδα Πρόληψης Μεσογειακής αναιμίας του Λαϊκού Νοσοκομείου, καθόρισε το ποσοστό των α -θαλασσαιμικών φορέων περίπου σε 0,6% με αυξημένη συχνότητα στη Θεσσαλία, Άρτα, Δ. Πελοπόννησο καθώς και στα νησιά Κρήτη, Ρόδο και Λέσβο¹³. Η ανίχνευση των φορέων βασίστηκε στους αιματολογικούς δείκτες, τη μορφολογία των ερυθροκυττάρων, τον αποκλεισμό β - ή $\delta\beta$ -θαλασσαιμίας ή σιδηροπενίας, την παρουσία εγκλείστων α -θαλασσαιμίας, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις προσδιορίστηκε και ο βιοσυνθετικός λόγος β/α των σφαιρινικών αλυσίδων.

Άλλη μελέτη συνέκρινε τη συχνότητα της α -θαλασσαιμίας, όπως αυτή προσδιορίστηκε από τη μέτρηση της Hb Bart's σε 227 δείγματα αίματος ομφαλίου λώρου στην Αθήνα, με τα αποτελέσματα από την DNA ανάλυση των ίδιων δειγμάτων¹⁴. Από τα 227, τα 5 δείγματα (2,2%) παρουσίασαν επίπεδα αιμοσφαιρίνης Bart's >1%, ενώ υπήρχαν και 19 αδιαμφισβήτητοι φορείς α -θαλασσαιμίας (κυρίως $-\alpha/\alpha$) με τη συνολική συχνότητα της α -θαλασσαιμίας να φτάνει το 8,4%. Από τα παραπάνω γίνεται φανερό ότι με μόνο κριτήριο τα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης Bart's, μπορεί να οδηγηθούμε σε μια ουσιαστική υποτίμηση της πραγματικής επίπτωσης της α -θαλασσαιμίας, ιδίως όταν η συνολική της συχνότητα είναι πολύ χαμηλή (και επομένως, ο αριθμός των $-\alpha/\alpha$ ομοζυγωτών ή $--\alpha\alpha$ ετεροζυγωτών είναι μικρός).

Όπως και σε άλλα μέρη της Μεσογείου, έτσι και στην Ελλάδα πολλοί διαφορετικοί γονότυποι αλληλεπιδρούν για την εμφάνιση της αιμοσφαιρινοπάθειας H. Οι Τζότζος και συν.¹⁵ εξέτασαν το DNA 16 ασθενών με αιμοσφαιρινοπάθεια H. Από αυτούς 8 είχαν γονότυπο $--Med/-\alpha^{3.7}$, 4 είχαν γονότυπο $-\alpha^{20.5}/-\alpha^{3.7}$, 3 είχαν γονότυπο $--Med/\alpha\alpha^T$ και ένας είχε δύο πιθανούς γονότυπους ($\alpha\alpha^T/\alpha\alpha^T$ ή $--\alpha\alpha^T$). Σε μια μετέπειτα εργασία από την ίδια ομάδα (Traeger - Συνοδινού και συν.)¹⁶ διερευνήθηκαν λεπτομερώς 16 μη ελλειπτικά χρωμοσώματα. Εννέα από αυτά αποδείχθηκε ότι έφεραν τη μεταλλαγή PolyA(TSaudi), δύο έφεραν την IVS1 5' πεντανουκλεοτιδική έλλειψη, δύο βρέθηκαν με HbIcaria, ένα με μεταλλαγή Nco1, ενώ δύο δεν αναγνωρίστηκαν.

Με βάση τις εργασίες αυτές φαίνεται ότι η α -MA είναι αρκετά συχνή στην Ελλάδα με επικρατέστερη την έλλειψη ή την καταστολή λειτουργίας του ενός μόνο α γονιδίου. Το αποτέλεσμα είναι η χαμηλή συχνότητα ασθενών με αιμοσφαιρινοπάθεια H και η ακόμα σπανιότερη εμφάνιση του συνδρόμου του εμβρυϊκού ύδρωπα με αιμοσφαιρίνη Bart's. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μεταγενέστερης μελέτης¹⁷ οι πλέον κοινές στον Ελληνικό πληθυσμό α -γονιδιακές διαταραχές είναι οι ελλειπτικές μορφές α -θαλασσαιμίας $-\alpha^{3.7}$, --MED, $-\alpha^{20.5}$ και οι μη ελλειπτικές μορφές PolyA(AATAAA>AATAAG)TSaudi, IVS1 5'πεντανουκλεοτιδική έλλειψη, Hb Agrinio και PolyA(AATAAA>AATGAA).

Η $-\alpha^{3.7}$ έλλειψη είναι η συχνότερη μορφή α -θαλασσαιμίας και προέρχεται από άνισο χiasμό στις ομόλογες περιοχές του DNA των α -γονιδίων, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός χρωμοσώματος με $-\alpha^{3.7}$ έλλειψη¹⁸ και ενός άλλου με περίσσεια ενός γονιδίου ($\alpha\alpha^{\text{ανπ } 3.7}$). Στο ελλειπτικό χρωμόσωμα δημιουργείται ένα υβρίδιο α -γονιδίου (5'-3') ανάλογο με το γονίδιο $\delta\beta$ -Leroge. Οι ετεροζυγώτες συνήθως έχουν φαινότυπο σιωπηλού φορέα ενώ οι ομοζυγώτες εμφανίζουν συχνά φαινότυπο α^+ -θαλασσαιμίας¹⁹.

Η --MED έλλειψη είναι συχνή στους Μεσογειακούς λαούς και οφείλεται σε μη ομόλογο ανασυνδυασμό από τον οποίο προκύπτει έλλειψη που περιλαμβάνει τα δύο α -γονίδια, τα ψευδογονίδια ($\psi\zeta_1$, $\psi\alpha_2$, $\psi\alpha_1$) ενώ αφήνει ανέπαφο το ζ_2 γονίδιο²⁰. Αποτέλεσμα αυτής της μεγάλης έλλειψης είναι η πλήρης αδυναμία παραγωγής α -σφαιρινικής αλυσίδας από το ελλειπτικό χρωμόσωμα.

Η $-\alpha^{20.5}$ έλλειψη προκύπτει από την έλλειψη τμήματος μεγέθους 20,5 kb που περιλαμβάνει τα $\psi\zeta_1$, $\psi\alpha_2$, $\psi\alpha_1$, α_2 γονίδια και μικρό τμήμα από το α_1 γονίδιο²¹ με αποτέλεσμα την αδυναμία παραγωγής α -αλυσίδας από το ελλειπτικό χρωμόσωμα.

Η IVS1 5' πεντανουκλεοτιδική έλλειψη οφείλεται σε μεταλλαγή του α_2 γονιδίου και συγκεκριμένα σε απώλεια πέντε νουκλεοτιδίων (GGTGA) από το 5' άκρο της πρώτης παρεμβαλλόμενης περιοχής του α_2 γονιδίου που θεωρείται σημαντική για τη συρραφή (splicing) του α -mRNA. Η μεταλλαγή

αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την αδυναμία παραγωγής λειτουργικού mRNA από το μεταλλαγμένο γονίδιο και πρωτοπεριγράφηκε σε άτομα στη Νότια Ιταλία²². Οι ετεροζυγώτες έχουν φαινότυπο α^+ -θαλασσαιμίας και οι ομοζυγώτες εμφανίζουν ένα πιο βαρύ φαινότυπο α^0 -θαλασσαιμίας².

Η PolyA(TSaudi) μεταλλαγή είναι σημειακή μεταλλαγή στη συντηρητική αλληλουχία AATAAA του α_2 γονιδίου (AATAAA>AATAAG) που επηρεάζει την προσθήκη της polyA αλληλουχίας με αποτέλεσμα το mRNA να είναι ελαττωματικό επειδή δεν σχηματίζει σταθερές 3' περιοχές²³. Οι ετεροζυγώτες έχουν φαινότυπο α^+ -θαλασσαιμίας, ενώ οι ομοζυγώτες εμφανίζουν Hb/πάθεια H με 5-15% HbH στο περιφερικό αίμα²⁴. Πρωτοπεριγράφηκε σε ασθενείς με Hb/πάθεια H στη Σαουδική Αραβία αλλά έχει βρεθεί και σε άλλους πληθυσμούς της Μεσογείου και της Μέσης Ανατολής²³. Μια διαφορετική PolyA μεταλλαγή (AATAAA>AATGAA) έχει περιγραφεί σε μια οικογένεια Τούρκων²⁵.

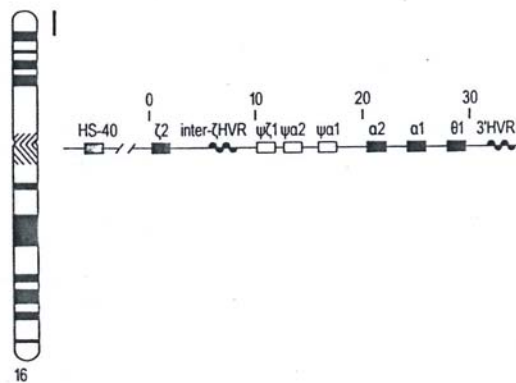
Η Hb Agrinio οφείλεται σε μεταλλαγή (T>C) στο κωδικόνιο 29 του α_2 γονιδίου που οδηγεί στην παραγωγή προλίνης αντί λευκίνης με αποτέλεσμα να παράγεται σε φυσιολογικά ποσά α -αλυσίδα ανώμαλης δομής που είναι ιδιαίτερα ασταθής και καταστρέφεται με πρωτεόλυση²⁶ όπως ασταθής είναι και η παραγόμενη αιμοσφαιρίνη. Τα αιματολογικά ευρήματα των ετεροζυγωτών είναι αυτά των α -θαλασσαιμικών φορέων. Ο συνδυασμός της Hb Agrinio με α^0 -θαλασσαιμική διαταραχή, όπως η --MED έλλειψη και η $-\alpha$ ^{20,5} έλλειψη, μπορεί να προκαλέσει σοβαρή μορφή αιμοσφαιρινοπάθειας H²⁶.

Η Hb Icaria οφείλεται σε μεταλλαγή (TAA>AAA) στο κωδικόνιο 142 (κωδικόνιο τερματισμού) η οποία επιτρέπει τη μετάφραση του μεταλλαγμένου mRNA μέχρι το επόμενο κωδικόνιο τερματισμού με αποτέλεσμα να παράγεται σε μειωμένη ποσότητα α -παραλλαγμένη σφαιρινική αλυσίδα με 31 αμινοξέα περισσότερα από τη φυσιολογική. Πρωτοπεριγράφηκε σε μια Ελληνίδα γυναίκα από την Ικαρία με Hb/πάθεια H²⁷ και αργότερα σε ένα ασθενή από τη Γιουγκοσλαβία²⁸.

1.4. ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΩΝ α -ΑΛΥΣΙΔΩΝ

Δομή - Λειτουργία - Ρύθμιση - Έκφραση των α -γονιδίων

Τα γονίδια των α και β -σφαιρινικών αλυσίδων σχηματίζουν δύο συμπλέγματα στα χρωμοσώματα 16 και 11, αντίστοιχα. Το σύμπλεγμα των α -γονιδίων αποτελείται από τμήμα DNA μήκους περίπου 30.000 ζευγών βάσεων (30 kb), εντοπίζεται κοντά στο τελομερίδιο του βραχέος σκέλους του χρωμοσώματος 16 και περιλαμβάνει την παρακάτω ακολουθία γονιδίων: ζ_2 , $\psi\zeta_1$, $\psi\alpha_2$, $\psi\alpha_1$, α_2 , α_1 και θ_1 (εικ. 3). Η διάταξη αυτή αντικατοπτρίζει τη σειρά έκφρασή τους κατά τη διάρκεια της οντογένεσης, εκτός από το γονίδιο θ_1 , ο ρόλος του οποίου παραμένει ασαφής. Τα γονίδια ψ (από την ελληνική λέξη ψευδο-) δεν εκφράζονται καθόλου.



Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση του συμπλέγματος των α -σφαιρινικών γονιδίων και η θέση τους στο χρωμόσωμα 16 (Higgs D.R., 1990)

Κάθε α -γονίδιο έχει μήκος περίπου 850 ζευγών βάσεων (bp), διευθετημένων σε ευδιάκριτες ομάδες με την ακόλουθη σειρά (από το 5' προς το 3' άκρο) :

α) μία αλληλουχία περίπου 150 bp, η οποία δεν μεταγράφεται αλλά περιλαμβάνει σημαντικά ολιγονουκλεοτιδικά τμήματα (όπως τα τμήματα CAT box και ATA box), τα οποία προάγουν και ρυθμίζουν την μεταγραφή.

β) μία αλληλουχία 40 bp, που ξεκινά με την περιοχή CAP, η οποία αντιστοιχεί στην πρώτη 5' βάση του πρόδρομου mRNA και τελειώνει με το κωδικόνιο ATG που κωδικοποιεί για τη μεθειονίνη στη θέση 1, με την οποία ξεκινάει η

σύνθεση του πολυπεπτιδίου. Η αλληλουχία αυτή μεταγράφεται αλλά δεν μεταφράζεται.

γ) το εξόνιο 1, μια ακολουθία 93 bp που κωδικοποιεί για τα πρώτα 31 αμινοξέα της α -σφαιρινικής αλυσίδας.

δ) την πρώτη παρεμβαλλόμενη αλληλουχία (IVS1), ένα τμήμα 117 bp που αποβάλλεται κατά τη διαδικασία ωρίμανσης του mRNA

ε) το εξόνιο 2, με μήκος 201 bp, που κωδικοποιεί για τα αμινοξέα 32 - 99.

στ) τη δεύτερη παρεμβαλλόμενη αλληλουχία (IVS2), με 149 ή 142 bp (α_1 ή α_2 -γονίδιο, αντίστοιχα) που επίσης αποκόπτεται κατά την ωρίμανση του mRNA.

ζ) το εξόνιο 3, με μήκος 126 bp, που κωδικοποιεί για τα αμινοξέα 100 - 141

η) το κωδικόνιο τερματισμού της σύνθεσης της σφαιρίνης (TAA, 3 bp) και

θ) μια μη μεταφραζόμενη αλληλουχία (110 bp), κοντά στο 3' άκρο, που περιλαμβάνει την αλληλουχία AATAAA η οποία δίνει το σήμα για την αποκοπή του πρόδρομου mRNA και την προσθήκη μιας «ουράς» πολυαδενυλικού οξέος (polyA), στοιχείου σημαντικού για την σταθερή δίοδο και λειτουργία του ώριμου mRNA στο κυτταρόπλασμα, με μήκος περίπου 200 bp.

Οι παρεμβαλλόμενες αλληλουχίες (ιντρόνια) μεταγράφονται στο αρχικό ετερογενές mRNA του πυρήνα αλλά ακολούθως, κατά τη διαδικασία ωρίμανσής του, αποκόπτονται. Αυτό γίνεται με τη βοήθεια συγκεκριμένων ενζύμων που αναγνωρίζουν τα 5' και 3' άκρα των ιντρονίων, τα αποκόπτουν και επανασυνδέουν τα ανοικτά άκρα των εξονίων (splicing) προκειμένου να σχηματίσουν το ώριμο mRNA. Η εντυπωσιακή ακρίβεια της όλης διαδικασίας εξασφαλίζεται από το γεγονός ότι τα ιντρόνια αφορίζονται από πολύ συντηρημένες (consensus) αλληλουχίες, οι οποίες σταθερά περιλαμβάνουν τα δινουκλεοτίδια GT στο 5' άκρο τους (περιοχή δότη) και AG στο 3' άκρο τους (περιοχή δέκτη). Η συνολική διαδικασία της μεταγραφής ρυθμίζεται επίσης και από άλλα νουκλεοτιδικά στοιχεία, τα οποία έχουν ταυτοποιηθεί κατά μήκος του DNA, ένθεν και ένθεν των δομικών γονιδίων. Τα δομικά τμήματα των γονιδίων α_1 και α_2 είναι πανομοιότυπα, ωστόσο το επίπεδο έκφρασης τους διαφέρει σημαντικά, προφανώς λόγω διαφορετικής έκφρασης (το α_2 γονίδιο παράγει 2,6 φορές περισσότερο α -mRNA από ότι το α_1 γονίδιο)²⁹.

1.5. ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΣΤΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ α -ΑΛΥΣΙΔΩΝ

1.5.1. Διαταραχές που δεν προκαλούν φαινότυπο α -θαλασσαιμίας

Οι κοινές “σιωπηλές” ή “ουδέτερες” παραλλαγές του DNA που χαρακτηρίζουν το κάθε άτομο και οι οποίες κατά κανόνα δεν επιδρούν στη δομή ή στο ρυθμό σύνθεσης των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τα αντίστοιχα γονίδια στα οποία απαντούν ονομάζονται πολυμορφισμοί. Η συχνότητά τους είναι >1-2% και δεν πρέπει να συγχέονται με τις σπάνιες γενετικές παραλλαγές οι οποίες απαντούν με συχνότητα <1-2%. Η ποικιλία των πολυμορφισμών στο α -σύμπλεγμα γονιδίων αλλά και η σημασία τους στην έρευνα είναι μεγάλη.

Ο πιο κοινός τύπος DNA πολυμορφισμού είναι ο πολυμορφισμός μήκους των κομματιών που προκύπτουν μετά από τεμαχισμό του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες (Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP). Οι πολυμορφισμοί αυτοί είναι σημειακοί, προέρχονται δηλαδή από την αλλαγή μιας και μόνο βάσης με αποτέλεσμα να τροποποιείται, να δημιουργείται ή να καταργείται η θέση αναγνώρισης μιας περιοριστικής ενδονουκλεάσης.

Μια πολυμορφική θέση οποιουδήποτε τύπου δεν εξετάζεται μεμονωμένα αλλά σε συνδυασμό με άλλες τέτοιες θέσεις που υπάρχουν στο χρωμόσωμα ενός ατόμου. Το πρότυπο ή ο συνδυασμός των πολυμορφικών περιοριστικών θέσεων για κάθε χρωμόσωμα ονομάζεται απλότυπος.

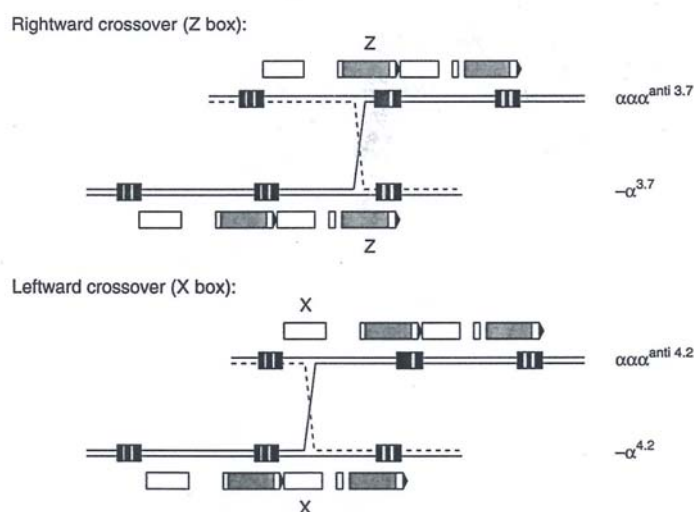
1.5.2. Διαταραχές που προκαλούν φαινότυπο α -θαλασσαιμίας

Η κλινική έκφραση της α -θαλασσαιμίας είναι αρκετά πολύπλοκη, όχι μόνο λόγω του ότι οι υποκείμενες μοριακές διαταραχές είναι ετερογενείς αλλά και επειδή τα εμπλεκόμενα γονίδια είναι τέσσερα, με διαφορετικό βαθμό έκφρασης και αντιστάθμισης. Η βαρύτητα του α -θαλασσαιμικού φαινότυπου σχετίζεται άμεσα με τη μείωση της α -σφαιρινικής σύνθεσης, η οποία εξαρτάται από τρεις κυρίως παράγοντες: α) τον αριθμό των προσβληθέντων γονιδίων, β) τον βαθμό στον οποίο η μεταλλαγή μειώνει την έκφραση του προσβληθέντος γονιδίου και γ) τον βαθμό στον οποίο το προσβληθέν γονίδιο φυσιολογικά συμμετέχει στη σύνθεση α -αλυσίδων. Δεδομένου ότι το α_2 -

σφαιρικό γονίδιο εκφράζεται 2,6 φορές περισσότερο από το α_1 -γονίδιο, η απώλεια του α_2 -γονιδίου θα έχει μεγαλύτερες συνέπειες στη σφαιρική σύνθεση³⁰.

1.5.2. α. Ελλειπτικές μορφές α-θαλασσαιμίας

Όπως και στη β-θαλασσαιμία, η μειωμένη σύνθεση των α αλυσίδων μπορεί να οφείλεται σε ελλείψεις ή μεταλλαγές στα α -γονίδια και στα παράπλευρα ρυθμιστικά στοιχεία. Οι ελλείψεις περιλαμβάνουν το ένα (- α), ή και τα δύο α -γονίδια (- -) κάθε χρωμοσώματος. Οι (- α) θαλασσαιμίες οφείλονται σε ομόλογους άνισους χιασμούς (εικ. 4), η εμφάνιση των οποίων διευκολύνεται από τη μεγάλη ομολογία των DNA αλληλουχιών που υπάρχουν κατά μήκος του συμπλέγματος των δύο α -γονιδίων (τμήματα x, y, z).



Εικόνα 4. Οι επιχιασμοί που οδηγούν στη δεξιόστροφη $-\alpha^{3.7}$ και στην αριστερόστροφη $-\alpha^{4.2}$ έλλειψη (Whaetherall D.J., 2001)

Οι χιασμοί γονιδίων (crossovers) συμβαίνουν είτε ανάμεσα στο τμήμα x πριν από το α_2 γονίδιο του ενός χρωμοσώματος και στο ομόλογο τμήμα πριν από το α_1 γονίδιο του άλλου χρωμοσώματος, είτε ανάμεσα στο τμήμα z που περιέχει το α_2 γονίδιο του ενός χρωμοσώματος με κάθε άλλο ομόλογο τμήμα που περιέχει το α_1 γονίδιο του άλλου χρωμοσώματος. Ο πρώτος τύπος χιασμού γονιδίων (συνήθως αναφέρεται ως αριστερόστροφος) ολοκληρώνεται με ένα χάσμα μήκους 4,2 kb και ένα άθικτο α -γονίδιο στο θαλασσαιμικό

χρωμόσωμα και την ακολουθία α_2 , α_2 , α_1 στο άλλο χρωμόσωμα. Ο δεύτερος τύπος χιασμού γονιδίων (δεξιόστροφος) δημιουργεί ένα χάσμα 3,7 kb και ένα α -γονίδιο στο θαλασσαιμικό χρωμόσωμα και τρία α -γονίδια στο άλλο χρωμόσωμα. Η $(-\alpha^{3.7})$ έλλειψη μπορεί περαιτέρω να υποδιαιρεθεί με βάση την ακριβή θέση του χιασμού μέσα στο τμήμα z (τύπος I, II, III). Η $(-\alpha)$ έλλειψη είναι η πιο διαδεδομένη μορφή α -θαλασσαιμίας παγκοσμίως και έχει ανιχνευθεί όχι μόνο σε φυσιολογικές α -αλυσίδες αλλά και σε παραλλαγές των α -σφαιρινικών αλυσίδων (α G Philadelphia, α J Tongariki, α Hasaron και άλλες). Η τελευταία αυτή παρατήρηση συμφωνεί με την θεωρία ότι ο χιασμός έχει συμβεί ανεξάρτητα, σε πολλές διαφορετικές περιπτώσεις. Τα εναπομείναντα στο θαλασσαιμικό χρωμόσωμα α -γονίδια παράγουν περισσότερο α -mRNA από ότι τα αντίστοιχα φυσιολογικά, πιθανότατα λόγω τοπογραφικών μεταβολών σε διάφορα ρυθμιστικά στοιχεία. Αυτό εξηγεί και το γεγονός ότι οι ερυθροκυτταρικοί δείκτες των φορέων πολύ συχνά παραμένουν εντός φυσιολογικών ορίων (σιωπηλοί φορείς). Οι $(-\alpha)$ ελλείψεις αναφέρονται ως α^+ -θαλασσαιμίες ή θαλασσαιμίες τύπου 2. Σπάνιες τέτοιες ελλείψεις που έχουν παρατηρηθεί είναι η $-\alpha^{5.3}$ έλλειψη σε μια οικογένεια Ιταλών³¹, η $-\alpha^{3.5}$ έλλειψη σε Ινδιάνους της Ασίας³² και η $-\alpha^{2.7}$ έλλειψη σε ένα Κινέζο ασθενή³³.

Ελλείψεις και στα δύο α -γονίδια (- -) στο ένα χρωμόσωμα (α^0 - ή θαλασσαιμία-1) οφείλονται είτε σε άνισους χιασμούς αλληλουχιών με μεγάλη ομολογία (μικρές ελλείψεις) είτε σε απώλεια ολόκληρων θηλειών (αναδιπλώσεων) DNA ή σε άλλες διεργασίες (μεγάλες ελλείψεις). Το μήκος της έλλειψης ποικίλλει και μπορεί να περιλαμβάνει μόνο τα 2 α -γονίδια (Ισπανικός τύπος), τα 2 α -γονίδια και επιπλέον τα πριν από αυτά γονίδια $\psi\alpha_2$, $\psi\alpha_1$ (τύπος της Ν.Α. Ασίας), τα 2 α^- , τα 2 $\psi\alpha$ και $\psi\zeta_1$ γονίδια (Μεσογειακός τύπος), όλα τα του Μεσογειακού τύπου και επιπλέον μια μεγάλη αλληλουχία πριν από το $\psi\zeta_1$ γονίδιο (τύπος της Σαουδικής Αραβίας) ή και ακόμη μεγαλύτερες αλληλουχίες πριν από τα α -γονίδια. Σε δύο περιπτώσεις, οι ελλείψεις τελειώνουν (3' άκρο) μέσα στα α -γονίδια, είναι δηλαδή μερικές [$(-\alpha)^{5.2}$ και $(-\alpha)^{20.5}$]. Οι διάφοροι τύποι ελλείψεων α^0 -θαλασσαιμίας χαρακτηρίζονται από ένα ευρύ φάσμα μεγεθών που ποικίλουν από σχετικά μικρές ελλείψεις (5.2 kb) μέχρι την έλλειψη ολόκληρου του α -γονιδιακού

συμπλέγματος (α^{THAI} , α^{FIL}). Μία ιδιαίτερη μορφή α^0 -θαλασσαιμίας οφείλεται σε μια έλλειψη 62 kb η οποία αφήνει μεν άθικτα και τα δύο α -γονίδια αλλά ταυτόχρονα φαίνεται να τα αδρανοποιεί απόλυτα, πιθανότατα λόγω απώλειας κάποιων σημαντικών ρυθμιστικών στοιχείων. Κατά κανόνα, τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των φορέων α^0 -θαλασσαιμίας προσομοιάζουν με αυτά των φορέων β -θαλασσαιμίας (υποχρωμία και μικροκυττάρωση). Ωστόσο στους α^0 -θαλασσαιμικούς φορείς η τιμή της HbA₂ βρίσκεται εντός φυσιολογικών ορίων και ο βιοσυνθετικός λόγος β/α αλυσίδων είναι σαφώς υψηλότερος από τη μονάδα²⁹.

1.5.2.β. Μη ελλειπτικές μορφές α -θαλασσαιμίας

Ο κατάλογος των μορφών α -θαλασσαιμίας χωρίς έλλειψη είναι μικρότερος από τον αντίστοιχο για τη β -θαλασσαιμία, πιθανόν λόγω του ότι πολλές από αυτές, και ιδίως εκείνες που αφορούν στο α_1 -γονίδιο, αντισταθμίζονται επαρκώς και παραμένουν μη ανιχνεύσιμες. Οι τύποι της α -θαλασσαιμίας στους οποίους δεν παρατηρούνται ελλείψεις γενετικού υλικού, οφείλονται είτε σε σημειακές μεταλλάξεις είτε σε προσθήκη/αφαίρεση ολιγονουκλεοτιδίων στις αλληλουχίες, οι οποίες φυσιολογικά ελέγχουν την έκφραση του γονιδίου. Σ' αυτές τις παραλλαγές της α -θαλασσαιμίας, οι οποίες χαρακτηρίζονται ως μη ελλειπτικές α -θαλασσαιμίες, το σχετικό γονίδιο αναγράφεται ως α^T . Περιγράφησαν για πρώτη φορά το 1977³⁴ και μέχρι σήμερα είναι γνωστές 41 καλά τεκμηριωμένες περιπτώσεις μη-ελλειπτικής α -θαλασσαιμίας. Εικοσιπέντε από αυτές σχετίζονται με το α_2 -γονίδιο, επτά με το α_1 , έξι βρέθηκαν σε ένα α -χρωμόσωμα ενώ σε τρεις περιπτώσεις η μεταλλαγή δεν έχει πλήρως διευκρινισθεί. Σαν ομάδα οι μη ελλειπτικές διαταραχές φαίνεται να έχουν σοβαρότερες συνέπειες στην έκφραση του α -γονιδίου της σφαιρίνης και στον αιματολογικό φαινότυπο σε σχέση με την έλλειψη του ενός ή του άλλου γονιδίου⁵. Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει:

A) Μεταλλαγές που επηρεάζουν την ωρίμανση του mRNA.

Μεταλλαγές που επιδρούν στη συρραφή (splicing) του mRNA. Υπάρχουν τρεις τέτοιες α -θαλασσαιμικές διαταραχές:

α) μικρή έλλειψη ενός πεντανουκλεοτιδίου, του GGTGA (IVS1;5 bp del) στη 5' θέση δότη του α_2 γονιδίου²².

β) σημειακή μεταλλαγή A>G στη θέση 116 της IVS1 [IVS1; 116(A > G)] του α_2 γονιδίου³⁵.

γ) σημειακή μεταλλαγή G > A στη θέση 117 της IVS1 [IVS1; 117(G > A)] του α_1 γονιδίου³⁶.

Μεταλλαγές που επιδρούν στο σήμα της πολυαδενυλίωσης. Δέκα με τριάντα ζεύγη βάσεων πριν από τις περισσότερες περιοχές προσθήκης poly(A) υπάρχει η εξαιρετικά συντηρημένη αλληλουχία AATAAA, η οποία αποτελεί το σημείο αναγνώρισης για την τομή του mRNA και την προσθήκη μιας «ουράς» πολυαδενυλικού οξέος η οποία αυξάνει τη σταθερότητα του ώριμου mRNA. Αυτή η αλληλουχία είναι απαραίτητη για τον τερματισμό της μεταγραφής. Μέχρι σήμερα είναι γνωστές τέσσερις μεταλλαγές στο σήμα για την πολυαδενυλίωση του α_2 -γονιδίου. Η πρώτη (AATAAA > AATAAG) βρέθηκε στον πληθυσμό της Σαουδικής Αραβίας. Οι ετεροζυγώτες εμφανίζουν αιματολογικό φαινότυπο α -θαλασσαιμικών φορέων, ενώ οι ομοζυγώτες εμφανίζουν Hb/πάθεια H με 5-15% HbH στο περιφερικό τους αίμα²⁴. Η δεύτερη μεταλλαγή (AATAAA > AATGAA) βρέθηκε σε άτομα Μεσογειακής καταγωγής²⁵. Η τρίτη μεταλλαγή είναι μια δινουκλεοτιδική έλλειψη στην ίδια αλληλουχία (AATAAA > AATA--)^{37,38}. Η τέταρτη μεταλλαγή είναι μια έλλειψη 16 νουκλεοτιδίων που περιλαμβάνει το πρώτο νουκλεοτίδιο της αλληλουχίας AATAAA > -ATAAA³⁹. Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις ανιχνεύεται ελαττωμένο α_2 mRNA λόγω αστάθειας της 3' περιοχής του.

B) Μεταλλαγές που επηρεάζουν τη μετάφραση του mRNA.

Μεταλλαγές οι οποίες επιδρούν στην έναρξη της μετάφρασης του mRNA. Πέντε μεταλλαγές (Nco1) τροποποιούν τη συντηρημένη αλληλουχία έναρξης CCRCCATG. Αυτές είναι οι

IN; A>G σημειακή μεταλλαγή σε θαλασσαιμικό γονίδιο (- α)⁴⁰

IN; 2 bp del μικρή έλλειψη σε θαλασσαιμικό γονίδιο (- α ^{3.7II})⁴¹

IN; T>C σημειακή μεταλλαγή στο α_2 γονίδιο⁴²

IN; A>G σημειακή μεταλλαγή στο α_1 γονίδιο^{43,44}

IN; 1 bp del μικρή έλλειψη στο α_2 γονίδιο⁴⁵

Μεταλλαγές οι οποίες προκαλούν πρόωρο κωδικόνιο λήξης. Μια μεταλλαγή στο κωδικόνιο 116 του α_2 -γονιδίου, δημιουργεί κωδικόνιο πρόωρου τερματισμού της μετάφρασης (GAG>TAG) με αποτέλεσμα μειωμένη παραγωγή αλυσίδων από το α_2 -γονίδιο⁴⁶. Μια έλλειψη 2 βάσεων στο κωδικόνιο 31 σε $-\alpha^{3.7}$ γονίδιο (AGG>--G), οδηγεί σε αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης της μετάφρασης με αποτέλεσμα ένα πρόωρο κωδικόνιο λήξης 3' και σύνθεση μικρότερης πολυπεπτιδικής αλυσίδας⁴⁷.

Μεταλλαγές οι οποίες επιδρούν στον τερματισμό της μετάφρασης. Από τις 6 παραλλαγές του κωδικονίου λήξης στο γονίδιο της α_2 -σφαιρίνης, οι πέντε έχουν ήδη περιγραφεί. Κάθε μια παρουσιάζει ένα διαφορετικό αμινοξύ στη θέση $\alpha 142$. Αυτές οι παραλλαγές είναι η Hb Constant Spring ($\alpha 142$ Gln)⁴⁸ η Hb Icaria ($\alpha 142$ Lys)⁴⁹, η Hb Koya Dora ($\alpha 142$ Ser)⁵⁰, η Hb Seal Rock ($\alpha 142$ Glu)⁵¹ και η Hb Paksé ($\alpha 142$ Tyr)⁵².

Γ) Μεταλλαγές που επηρεάζουν τη μεταμεταφραστική διαδικασία

Μεταλλαγές που οδηγούν σε αντικατάσταση ενός αμινοξέος με αποτέλεσμα τη φυσιολογική παραγωγή παραλλαγμένης αλυσίδας η οποία είναι ασταθής και καταστρέφεται με πρωτεόλυση. Παραδείγματα τέτοιων αιμοσφαιρινών είναι η Hb Agrinio (CD29; T > C) και η Hb Evaston (CD14; T > C)⁵³.

Μεταλλαγές που οδηγούν σε αδυναμία συγκρότησης τετραμερούς με αποτέλεσμα αστάθεια της παραλλαγμένης αιμοσφαιρίνης. Παραδείγματα τέτοιων αιμοσφαιρινών είναι η Hb Quong Sze (CD125; T > C)⁵⁴ και η Hb Suan Dok (CD109; T > G)⁵⁵.

Μεταλλαγές που οδηγούν σε αντικαταστάσεις ή ελλείψεις αμινοξέων στην περιοχή πρόσδεσης της αίμης με αποτέλεσμα αστάθεια του μορίου της αιμοσφαιρίνης και σχηματισμό σωματίων Heinz, τα οποία προκαλούν βλάβη στη μεμβράνη του ερυθροκυττάρου. Παραδείγματα τέτοιων αιμοσφαιρινών είναι η Hb Torino ($\alpha 43$ Phe > Val) και η Hb Boston ($\alpha 58$ His > Tyr).

Μεταλλαγές που οδηγούν σε αντικαταστάσεις αμινοξέων στην περιοχή επαφής των υπομονάδων α και β με αποτέλεσμα αλλαγή στη λειτουργικότητα και σταθερότητα του μορίου της αιμοσφαιρίνης και αύξηση συνήθως της

συγγενείας της προς το οξυγόνο. Παράδειγμα τέτοιας αιμοσφαιρίνης είναι η Hb Chesapeake ($\alpha 92 \text{ Arg} > \text{Leu}$).

Μεταλλαγές που οδηγούν σε δομικές τροποποιήσεις του μορίου της αιμοσφαιρίνης με αποτέλεσμα την ελάττωση της συγγενείας της προς το οξυγόνο. Παράδειγμα τέτοιας αιμοσφαιρίνης είναι η Hb Shetif ($\alpha 94 \text{ Asp} > \text{Tyr}$).

1.5.2.γ. Κλινικοί φαινότυποι

Η συνύπαρξη των ανωτέρω μορφών α -θαλασσαιμίας στο ίδιο άτομο οδηγεί στην εμφάνιση δύο σημαντικών κλινικών ομάδων, της Hb/πάθειας H και του εμβρυϊκού ύδρωπα. Γενικά, η παθοφυσιολογία της Hb/πάθειας H προσομοιάζει με αυτήν της ενδιάμεσης β -θαλασσαιμίας. Οι ασθενείς έχουν ομαλή ανάπτυξη, ήπια υπερπλασία μυελού, ενδείξεις αιμολυτικής αναιμίας και ορισμένες φορές διόγκωση του σπληνός. Οι β αλυσίδες, βρισκόμενες σε περίσσεια, σχηματίζουν τετραμερή (HbH) που είναι διαλυτά, τουλάχιστον στα νεαρά ερυθροκύτταρα. Κατά τη γήρανση όμως των ερυθροκυττάρων παρατηρείται ενδοκυττάρια καθίζηση των τετραμερών και πρόωρος κυτταρικός θάνατος. Η κατακρημνισμένη HbH αναγνωρίζεται με τη μορφή ενδοερυθροκυτταρικών εγκλείστων σε σπληνεκτομηθέντες ασθενείς, ενώ η διαλυτότητά της στα νεαρά ερυθροποιητικά κύτταρα εξηγεί την απουσία εμφανούς ανεπάρκειας στην ερυθροποίηση του ασθενούς. Ωστόσο, η αιμοσφαιρίνη H είναι ουσιαστικά άχρηστη, λόγω της υψηλής συγγενείας της (10 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με την αιμοσφαιρίνη A) με το οξυγόνο⁵⁶. Αυτό σημαίνει ότι κατά τον προσδιορισμό των επιπέδων αιμοσφαιρίνης σε έναν ασθενή, το μη-λειτουργικό ποσοστό της HbH θα πρέπει να ληφθεί υπ' όψιν.

Συγκρίνοντας τους φαινότυπους της Hb/πάθειας H που προκύπτουν από συμμετοχή α -ελλείψεων (ιδίως του τύπου $-\alpha^{3.7}$) με αυτούς που προκύπτουν από συμμετοχή μη ελλειπτικών διαταραχών, διαπιστώνεται ότι στους πρώτους η κλινική εικόνα είναι ηπιότερη και οι ερυθροκυτταρικοί δείκτες υψηλότεροι. Αυτό συμφωνεί με την παρατήρηση ότι, γενικά, τα ($-\alpha$) γονίδια είναι σε θέση να αυξήσουν την παραγωγή α -mRNA ενώ δεν φαίνεται να υπάρχουν ανάλογοι αντισταθμιστικοί μηχανισμοί στην περίπτωση που τα α_1 ή α_2 γονίδια υφίστανται κάποια μεταλλαγή. Η επιλεκτική επιστράτευση ερυθροποιητικών κυττάρων που παράγουν γ αλυσίδες δεν είναι ένα σταθερό

εύρημα στην Hb/πάθεια H αλλά παρατηρείται περιστασιακά με τη μορφή ποικίλων (χαμηλών) ποσοτήτων αιμοσφαιρίνης Bart's (γ_4) στο αίμα των ασθενών. Η παρουσία ελάχιστης ποσότητας αιμοσφαιρίνης Bart's στο αίμα ομφάλιου λώρου αποτελεί ένα στοιχείο για τη διάγνωση των φορέων α -θαλασσαιμίας κατά τη γέννηση, ενώ αν η ποσότητα είναι μεγαλύτερη, αυτό συνηγορεί υπέρ της Hb/πάθειας H. Από την άλλη πλευρά, φαίνεται ότι σε περιπτώσεις όπου οι ελλείψεις αφήνουν ανέπαφα τα ζ γονίδια, τα τελευταία συνεχίζουν να παράγουν μικρές ποσότητες ζ αλυσίδων οι οποίες είναι ανιχνεύσιμες, όχι μόνο στον εμβρυϊκό ύδρωπα και την Hb/πάθεια H αλλά και στους φορείς της α -θαλασσαιμίας.

Ομόζυγη απουσία ή σοβαρή αδρανοποίηση όλων των α -γονιδίων είναι καταστάσεις ασύμβατες με τη ζωή. Η πρώτη από αυτές τις δύο καταστάσεις είναι η κύρια αιτία του εμβρυϊκού ύδρωπα στην Άπω Ανατολή ενώ η δεύτερη αντιστοιχεί σε λιγότερο συχνές μορφές. Και στις δύο περιπτώσεις πάντως διαπιστώνεται εκσεσημασμένη υπερπλασία ερυθροποιητικού μυελού στο ήπαρ και τον σπλήνα και ενδομήτριος θάνατος, ή θάνατος κατά τη γέννηση ή λίγες ώρες μετά τον τοκετό⁵⁷, αφού τα γ_4 τετραμερή (το μοναδικό σφαιρινικό προϊόν που δύναται να παραχθεί) δεν είναι σε θέση να μεταφέρουν οξυγόνο στους ιστούς.

1.6. ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ α -ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΑΣ

1.6.1. Αιματολογικός έλεγχος - Βιοχημικός έλεγχος

Η διάγνωση της α -θαλασσαιμίας περιλαμβάνει τρεις φάσεις. Αρχικά, γίνεται μία πρώτη εκτίμηση βασισμένη στις τιμές των αιματολογικών παραμέτρων. Αυτό προϋποθέτει ακριβείς μετρήσεις σε σωστά ρυθμισμένο ηλεκτρονικό αναλυτή. Ακολουθεί μικροσκοπική εξέταση επιχρίσματος περιφερικού αίματος μετά από χρώση. Άτομα με υποχρωμία (MCH < 27 pg), μικροκυττάρωση (MCV < 83 fl) και μορφολογικές ερυθροκυτταρικές αλλοιώσεις εξετάζονται περαιτέρω. Η δεύτερη φάση διερεύνησης περιλαμβάνει μετρήσεις της τιμής HbA₂, και μερικές φορές και της HbF, και ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης προκειμένου να εντοπιστούν πιθανές δομικές αιμοσφαιρινικές παραλλαγές. Τα αυτοματοποιημένα συστήματα HPLC

παρέχουν ποσοτική και ποιοτική ανάλυση της αιμοσφαιρίνης, με ακρίβεια και επαναληψιμότητα⁵⁸, θα πρέπει όμως πάντοτε να προηγείται έλεγχος των λειτουργικών παραμέτρων του μηχανήματος².

Επίσης, σε αυτή τη φάση διερεύνησης, μπορεί να γίνουν και κάποιες επιπλέον αιματολογικές εξετάσεις που περιλαμβάνουν έλεγχο για ερυθροκυτταρικά έγκλειστα και, ορισμένες φορές, ισοηλεκτρική εστίαση ή μελέτη της βιοσύνθεσης σφαιρινών. Σε αυτό το στάδιο, είναι δυνατή η διάγνωση πολλών από τις διαφορετικές μορφές θαλασσαιμίας ενώ για άλλες θα πρέπει ο έλεγχος να προχωρήσει ένα βήμα παραπέρα προκειμένου να δοθεί μια οριστική διάγνωση, δηλ. θα πρέπει να γίνει ταυτοποίηση της υποκείμενης διαταραχής με DNA ανάλυση.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι ερυθροκυτταρικοί δείκτες είναι συμβατοί με θαλασσαιμία και τα επίπεδα της HbA₂ είναι φυσιολογικά, οριακά ή χαμηλά. Σ' αυτές τις περιπτώσεις, είναι σημαντικό να αποκλείσουμε την πιθανότητα σιδηροπενίας, δεδομένου ότι σοβαρή σιδηροπενία μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς χαμηλές τιμές HbA₂. Εάν υπάρχει σιδηροπενία θα πρέπει πρώτα να διορθώνεται και μετά να επαναλαμβάνεται η μέτρηση της HbA₂. Μερικοί από αυτούς με επάρκεια σιδήρου και χαμηλή ή φυσιολογική τιμή HbA₂, έχουν αυξημένα επίπεδα HbF, στοιχείο που αποτελεί ένδειξη ετεροζυγωτίας για δβ-θαλασσαιμία. Από τους υπόλοιπους, η πλειοψηφία θα είναι α⁰- ή ομοζυγώτες α⁺- θαλασσαιμικοί φορείς ή ετερόζυγοι για τις μορφές εκείνες της β-θαλασσαιμίας με φυσιολογική τιμή HbA₂. Άτομα με α⁰- και πιο σπάνια με α⁺-θαλασσαιμία μπορεί να έχουν ερυθροκύτταρα με έγκλειστα HbH ενώ η απουσία τέτοιων εγκλειστών δεν αποκλείει την παρουσία α-θαλασσαιμίας. Η διάκριση των α-θαλασσαιμικών φορέων από τους ετεροζυγώτες β-θαλασσαιμίας με φυσιολογικές τιμές HbA₂, είναι δυνατή με μελέτη της σφαιρινικής σύνθεσης².

Παρά το ότι αρκετοί α-θαλασσαιμικοί φορείς εμφανίζουν σημαντικά ελαττωμένο βιοσυνθετικό λόγο α/β, αυτή η μέθοδος δεν φαίνεται να επαρκεί για τον ακριβή προσδιορισμό των α-θαλασσαιμικών γονιδίων που είναι κάθε φορά παρόντα, λόγω της σημαντικής επικάλυψης ανάμεσα σε α⁰/α⁺-θαλασσαιμικές και α⁺-θαλασσαιμικές/φυσιολογικές καταστάσεις. Ωστόσο,

μέχρι την εμφάνιση της DNA τεχνολογίας, αυτός παρέμενε ο μοναδικός τρόπος προσέγγισης του ακριβούς status των α -θαλασσαιμικών φορέων².

Ένα χαρακτηριστικό διαγνωστικό στοιχείο της α -θαλασσαιμίας είναι η παρουσία εγκλείστων HbH. Η αιμοσφαιρίνη H είναι ένα αδιάλυτο τετραμερές αποτελούμενο από 4 β -σφαιρινικές αλυσίδες οι οποίες περισσεύουν λόγω μειωμένης παραγωγής α -αλυσίδων. Η απουσία εγκλείστων HbH δεν αποκλείει την παρουσία α -θαλασσαιμίας αλλά η παρουσία τυπικών εγκλείστων μπορεί να φανεί χρήσιμη στην επιβεβαίωση μιας πιθανής διάγνωσης⁵⁹. Τα έγκλειστα της HbH («προκλητά») πρέπει να διακρίνονται από τα ενδοερυθροκυτταρικά έγκλειστα που παρατηρούνται σε άλλες καταστάσεις («προϋπάρχοντα»).

«Προϋπάρχοντα» έγκλειστα. Δημιουργούνται λόγω της κατακρήμνισης in vivo σχηματισθείσας ασταθούς Hb. Ανιχνεύονται στο αίμα ασθενών με αιμοσφαιρινοπάθεια H, χωρίς προηγούμενη επώαση, με χρωστική methyl-violet η οποία δίνει πολύ καλύτερη εικόνα σε σχέση με τις χρωστικές brilliant cresyl-blue (BCB) and new methylene blue (NMB)⁶⁰. Τέτοια έγκλειστα παρατηρούνται και σε άλλες καταστάσεις όπως η μείζων β -θαλασσαιμία σε σπληνεκτομηθέντες ασθενείς, αιμοσφαιρινοπάθειες οφειλόμενες σε δομικές διαταραχές και κατακρήμνιση της φυσιολογικής αιμοσφαιρίνης λόγω οξειδωτικής κρίσης σε άτομα με έλλειψη του ενζύμου G-6PD.

«Προκλητά» έγκλειστα. Δημιουργούνται in vitro με επώαση των ερυθροκυττάρων στους 37⁰ C. Ανιχνεύονται στο αίμα ασθενών με Hb/πάθεια H, φορέων α -θαλασσαιμίας κυρίως α^0 και σπανιότερα α^+ -θαλασσαιμίας, με χρώσεις όπως brilliant cresyl-blue ή new methylene blue (ερυθροκύτταρα με εικόνα «μπάλας του γκολφ»). Εναλλακτικά, με πολύ καλά αποτελέσματα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η χρώση methyl-violet¹³ (ερυθροκύτταρα με κοκκία ποικίλου μεγέθους, σχήματος και αριθμού και βαθύ πορφυρό χρώμα). Η επιλογή της χρώσης methyl-violet για την ανίχνευση εγκλείστων HbH σε α -θαλασσαιμικούς φορείς δίνει τη δυνατότητα διάκρισης μεταξύ εγκλείστων HbH των α -θαλασσαιμικών φορέων («προκλητά» έγκλειστα) και εγκλείστων που παρατηρούνται σε άλλες καταστάσεις («προϋπάρχοντα» έγκλειστα) (πιν.1). Επιπλέον η χρώση methyl-violet σε αντίθεση με τις χρώσεις brilliant

cresyl-blue και new methylene blue δεν βάφει τα δικτυοερυθροκύτταρα (ΔΕΚ)³.

Πίνακας 1. Διαφορές μεταξύ «προκλητών» και «προϋπαρχόντων» έγκλειστων

«Προκλητά» έγκλειστα	«Προϋπάρχοντα» έγκλειστα
β ₄ τετραμερή (HbH)	κατακρημισθείσα ασταθής Hb (σωμάτια Heinz) ή α-σφαιρινικές αλυσίδες
σχηματίζονται in vitro Παρατηρούνται σε :	σχηματίζονται in vivo Παρατηρούνται σε :
α-θαλασσαιμικούς φορείς Hb/πάθεια H	Hb/πάθεια H αιμοσφαιρινοπάθειες (δομικές διαταραχές) κατακρήμιση φυσιολογικής Hb λόγω οξειδωτικής κρίσης σε άτομα με έλλειψη G-6PD λήψη χημικών ή φαρμάκων (φαιλυδραζίνη) μείζονα β-θαλασσαιμία με σπληνεκτομή
ανιχνεύονται με : BCB ή NMB: επώαση σε 37 ⁰ C εικόνα μπάλας του γκολφ (πολλαπλά πρασινο-μπλε κοκκία) βάφονται και τα ΔΕΚ methyl violet: META ΕΠΩΑΣΗ (παρουσία οξειδωτικού παράγοντα NaNO ₂) σε 37 ⁰ C κοκκία ποικίλου μεγέθους, σχήματος και αριθμού με βαθύ πορφυρό χρώμα δεν βάφονται τα ΔΕΚ	ανιχνεύονται με : methyl violet ή crystal violet: ΧΩΡΙΣ ΕΠΩΑΣΗ σε θερμοκρασία δωματίου μικρά πορφυρά κοκκία συνήθως στην περιφέρεια του ερυθροκυττάρου

1.6.2. Μοριακή ανάλυση

Η ανάπτυξη της τεχνολογίας της γονιδιακής ανάλυσης ανέδειξε νέες τεχνικές αναγνώρισης των διαφόρων μορφών α-σφαιρινικών γενετικών διαταραχών.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) : η ανάπτυξη της PCR επέφερε σημαντικές αλλαγές στη μελέτη και ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων. Με τη χρήση μιας θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης της *Taq* πολυμεράσης (από το βακτηρίδιο *Thermus aquaticus*), η PCR οδηγεί στη δημιουργία πολλαπλών αντιγράφων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA, έτσι ώστε αυτό να μπορεί να γίνει ορατό με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου σε γέλη αγαρόζης⁶⁰.

Gap PCR : είναι η πιο απλή από τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τις ελλειπτικές μορφές θαλασσαιμίας, με χρήση δύο εκκινητών (primers) συμπληρωματικών των DNA περιοχών παραπλεύρως της έλλειψης. Τα αντίγραφα που αποκτώνται προέρχονται μόνο από τα ελλειπτικά θαλασσαιμικά αλληλία, καθώς οι εκκινητές είναι πολύ μακριά ο ένας από τον άλλο ώστε να οδηγήσουν σε αντιγραφή των φυσιολογικών DNA αλληλουχιών. Έτσι, το φυσιολογικό α-αλληλίο ανιχνεύεται με αντιγραφή των DNA αλληλουχιών που συνδέονται με ένα από τα σημεία τομής της έλλειψης, χρησιμοποιώντας έναν εκκινητή συμπληρωματικό της ακολουθίας που αποκόπηκε².

Χαρτογράφηση χρωμοσώματος (Southern blot ανάλυση) : η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό συγκεκριμένων αλληλουχιών σε διάφορα τμήματα DNA που διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης και υβριδίσθηκαν με γνωστούς ανιχνευτές. Το μέγεθος κάθε τέτοιου τμήματος DNA ενός ατόμου μπορεί να καθοριστεί με βάση την κινητικότητα του κατά την ηλεκτροφόρηση⁶⁰.

Υβριδισμός με ειδικά αλληλόμορφα ολιγονουκλεοτίδια (ASO) : κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, μικρά ολιγονουκλεοτιδικά probes (ανιχνευτές) μπορούν να συνδεθούν με μία αλληλουχία απόλυτα συμπληρωματική προς αυτά. Έτσι, ένα τέτοιο ζεύγος ολιγονουκλεοτιδίων χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της παρουσίας ή μη μιας σημειακής μεταλλαγής⁶⁰.

Επώαση με ενδονουκλεάσες περιορισμού (Restriction Enzyme Digestion) : πολλές από τις μη ελλειπτικές μεταλλαγές διαφέρουν στην DNA

περιοχή η οποία αποτελεί σημείο αναγνώρισης για κάποια ενδονουκλεάση. Οι μεταλλαγές αυτές μπορούν να μελετηθούν με πολλαπλασιασμό (PCR) του τμήματος του DNA που περιέχει την υπό αναζήτηση μεταλλαγή και επώαση του προϊόντος της PCR με την κατάλληλη ενδονουκλεάση².

Ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτική γέλη ακρυλαμίδης με κλίση πυκνότητας (Denaturing Gradient-Gel Electrophoresis - DGGE) : χρησιμοποιείται για την προκαταρκτική ανίχνευση σημειακών μεταλλαγών σε επίπεδο μαζικού ελέγχου ενώ ο ακριβής προσδιορισμός της μοριακής βλάβης ελέγχεται με ανάλυση της πρωτοδιάταξης του DNA. Η μέθοδος βασίζεται στην ηλεκτροφορητική κινητικότητα ενός δίκλωνου μορίου DNA κατά μήκος γραμμικά αυξανόμενων συγκεντρώσεων αποδιατακτικών ουσιών. Η μέθοδος DGGE έχει τυποποιηθεί για την ανίχνευση σημειακών μεταλλαγών και πολυμορφισμών στα α -σφαιρινικά γονίδια⁶¹.

Ανάλυση στερεοδιαμόρφωσης μονής αλυσίδας (Single Strand Conformation Analysis - SSCA) : χρησιμοποιείται όπως και η DGGE για την προκαταρκτική ανίχνευση σημειακών μεταλλαγών και πολυμορφισμών στα α -σφαιρινικά γονίδια⁶¹ και έχει επίσης τυποποιηθεί. Η μέθοδος βασίζεται στο γεγονός ότι η αντικατάσταση μιας βάσης μπορεί να οδηγήσει σε μια τροποποιημένη μονόκλινη διαμόρφωση (conformation) η οποία ακινητοποιείται σε διαφορετική από τη φυσιολογική θέση, σε ένα μη αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

Ανάλυση της πρωτοδιάταξης του DNA (DNA sequencing) : Η μέθοδος επιτρέπει την ακριβή ανάλυση και αναγνώριση των νουκλεοτιδίων ενός γονιδίου ή μιας περιοχής ενός γονιδίου και επομένως την άμεση ανίχνευση των σημειακών μεταλλαγών. Δύο είναι οι μέθοδοι αυτής της ανάλυσης, η χυμική μέθοδος⁶² και η ενζυμική μέθοδος⁶³ η οποία χρησιμοποιείται ευρύτερα και βασίζεται στην ενζυμική σύνθεση ραδιενεργά σημασμένων αλυσίδων DNA με μήτρα τη μία από τις δύο αλυσίδες του χρησιμοποιούμενου υποστρώματος.

1.6.3. Πρόληψη και προγεννητική διάγνωση

Η κληρονομικότητα της α -θαλασσαιμίας είναι περισσότερο πολύπλοκη λόγω του ότι αφορά στα προϊόντα ενός ζεύγους συνδεδεμένων α -γονιδίων

(αα). Οι δύο κύριες κλινικές μορφές της α-θαλασσαιμίας, ο εμβρυϊκός υδρωπας με αιμοσφαιρίνη Bart's και η Hb/πάθεια H μπορεί να αποδοθούν σε ανάλογο συνδυασμό των μορφών α^0 - και α^+ -θαλασσαιμίας. Η πρώτη οφείλεται στην ομόζυγη μεταβίβαση της α^0 -θαλασσαιμίας (--/--), ενώ η δεύτερη συνήθως στη συνδυασμένη ετερόζυγη μεταβίβαση α^0 - και α^+ -θαλασσαιμίας (--/-α ή --/α^Tα). Σπανιότερα, η Hb/πάθεια H οφείλεται σε ομόζυγη μεταβίβαση μιας μη ελλειπτικής μορφής α-θαλασσαιμίας (α^Tα/ α^Tα). Γενικά, η παραγωγή α αλυσίδων από ένα α^Tα ζεύγος γονιδίων είναι μικρότερη από την παραγωγή από ένα -α γονίδιο. Η ομοζυγωτία -α/-α όπως και η ετεροζυγωτία -/αα της α^0 -θαλασσαιμίας, οδηγεί σε μια ασυμπτωματική ήπια αναιμία ενώ οι φορείς α^+ -θαλασσαιμίας (-α/αα ή α^Tα /αα) είναι συνήθως κλινικά και αιματολογικά «σιωπηλοί»².

Η προγεννητική διάγνωση εφαρμόζεται ευρέως σε ζευγάρια με πιθανότητα γέννησης παιδιού ομόζυγου για α^0 -θαλασσαιμία, λόγω των πιθανών επιπλοκών για τη μητέρα, κυρίως της τοξιναιμίας της κύησης και δυσκολιών που μπορεί να προκύψουν από έναν διογκωμένο εύθρυπτο πλακούντα και από τον τοκετό ενός υδρωπικού εμβρύου, καθώς και της ψυχολογικής επιβάρυνσης από την πιθανότητα θνησιγενούς εμβρύου. Τις περισσότερες φορές δεν απαιτείται προγεννητική διάγνωση για την Hb/πάθεια H, δεδομένου ότι συνήθως πρόκειται για μια σχετικά ήπια κατάσταση με ικανοποιητική ποιότητα ζωής. Παρ' όλα αυτά, γίνεται ολοένα σαφέστερο ότι υπάρχουν και σοβαρές μορφές της νόσου και ότι όσο περισσότερα μαθαίνουμε σχετικά με τη μοριακή της βάση, ίσως προκύψει μεγαλύτερη ανάγκη για προγεννητική διάγνωση. Τα α-θαλασσαιμικά σύνδρομα που συνοδεύονται από πνευματική καθυστέρηση, και ιδιαίτερα η Hb/πάθεια H η σχετιζόμενη με το X χρωμόσωμα, μπορούν πλέον να εντοπιστούν στο έμβρυο, από τη στιγμή που έχουν γίνει γνωστά τα εμπλεκόμενα γονίδια. Η προγεννητική διάγνωση γι' αυτήν την κατάσταση συνιστάται όλο και περισσότερο².

Αρχικά, εμβρυϊκό DNA μπορούσε να ληφθεί μόνο από κύτταρα του αμνιακού υγρού αλλά η ανάπτυξη της τεχνικής της δειγματοληψίας χοριακών λαχνών έκανε δυνατή τη λήψη εμβρυϊκού DNA σε πολύ πιο πρώιμα στάδια της κύησης. Οι μέθοδοι προγεννητικής διάγνωσης βελτιώνονται συνεχώς από

τα τέλη της δεκαετίας του '70, λόγω ραγδαίας βελτίωσης στις τεχνικές γενετικής ανάλυσης κατά το διάστημα αυτό, με πολύ καλά αποτελέσματα². Τα πλέον αξιοσημείωτα αποτελέσματα καταγράφηκαν στην Κύπρο και τη Σαρδηνία, όπου η συχνότητα γέννησης νοσούντων παιδιών ελαττώθηκε σημαντικά από τη στιγμή που καθιερώθηκε ο screening έλεγχος και η προγεννητική διάγνωση². Η τακτική αυτή ώθησε την έρευνα προς την κατεύθυνση της προγεννητικής διάγνωσης με έλεγχο εμβρυϊκών κυττάρων του μητρικού αίματος και της διάγνωσης πριν από την εμφύτευση του εμβρύου². Από όλα τα παραπάνω γίνεται καταφανής η ανάγκη για μια εύκολη και αξιόπιστη μέθοδο ανίχνευσης των α -θαλασσαιμικών φορέων προκειμένου να επιλεγούν αυτοί που θα εξεταστούν περαιτέρω καθώς και οι περιπτώσεις κυήσεων που χρήζουν προγεννητικού ελέγχου.

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΘΕΜΑ

2.1.1. Σκοπός της μελέτης

Ένα από τα συχνότερα προβλήματα που ανακύπτουν στην καθ' ημέρα πράξη σχετικά με τον εργαστηριακό έλεγχο της θαλασσαιμίας είναι η απουσία σαφών διαγνωστικών ευρημάτων στους φορείς α^+ -θαλασσαιμίας. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα οι φορείς αυτοί να διαφεύγουν ή να αξιολογούνται ως αδιευκρίνιστοι ή ως πιθανοί φορείς α^+ -θαλασσαιμίας. Παρά το γεγονός ότι η οριστικοποίηση της διάγνωσής τους δεν είναι πάντοτε αναγκαία, στις περιπτώσεις ζευγαριών στα οποία πρέπει να δοθεί γενετική συμβουλή, αυτή γίνεται απαραίτητη. Το ζευγάρι οδηγείται σε παραπέρα έλεγχο, αρχικά με βιοσύνθεση Hb και στη συνέχεια με DNA ανάλυση, όπου αυτό κριθεί απαραίτητο για την αποφυγή κατάστασης επικίνδυνης για το παιδί ή τη μητέρα. Είναι όμως γνωστό ότι η μεν βιοσύνθεση αιμοσφαιρίνης σε ορισμένες περιπτώσεις αδυνατεί να δώσει λύση, η δε μοριακή ανάλυση, που θέτει την οριστική διάγνωση, μπορεί να γίνει μόνο σε εξειδικευμένα Κέντρα. Για τους λόγους αυτούς η διάγνωση των φορέων α^+ -θαλασσαιμίας, βασίζεται αρχικά στην ήπια μικροκυττάρωση, τις ήπιες ερυθροκυτταρικές μορφολογικές αλλοιώσεις και τον αποκλεισμό σιδηροπενίας ή άλλης μορφής θαλασσαιμίας⁶⁰. Ιδιαίτερο διαγνωστικό στοιχείο της α -θαλασσαιμίας αποτελεί η παρουσία ενδοερυθροκυτταρικών εγκλείστων HbH με μειωμένη όμως αξία στη διάγνωση των φορέων της α^+ -θαλασσαιμίας όπου αυτά εμφανίζονται σπάνια.

Υποθέσαμε λοιπόν ότι μια βελτίωση της μεθόδου ανίχνευσης των εγκλείστων HbH, ως προς την ευαισθησία και την ειδικότητά της, σε συνδυασμό με τις παραπάνω αναφερόμενες διαγνωστικές παραμέτρους, μπορεί να προσφέρει σημαντικά στη διαγνωστική προσέγγιση των φορέων της α^+ -θαλασσαιμίας. Μια τέτοια προσέγγιση επιχειρήθηκε στους εξεταζόμενους μας, συγκρινόμενη με τη μοριακή ανάλυση των δειγμάτων, και απετέλεσε τη βάση αυτής της εργασίας με σκοπό να προταθεί μια απλή, αξιόπιστη και ευαίσθητη μέθοδος εντοπισμού των α^+ -θαλασσαιμικών φορέων.

2.1.2. Τα μέχρι τώρα δεδομένα

Η α -θαλασσαιμία χαρακτηρίζεται από μεγάλη μοριακή και αντίστοιχη φαινοτυπική ετερογένεια, από τους φορείς της α^+ -θαλασσαιμίας με πενιχρά έως ανύπαρκτα εργαστηριακά ευρήματα έως τους ασθενείς με Hb/πάθεια H με ποικίλου βαθμού αιμολυτική αναιμία και τον εμβρυϊκό ύδρωπα με αιμοσφαιρίνη Bart's, κατάσταση ασυμβίβαστη με τη ζωή. Είναι γνωστό ότι οι μέθοδοι μαζικού ελέγχου που έχουν προταθεί και εφαρμόζονται καλύπτουν διαγνωστικά τους φορείς α^0 -θαλασσαιμίας και τους ασθενείς με Hb/πάθεια H ή εμβρυϊκό ύδρωπα ενώ δεν ανιχνεύουν ένα μεγάλο μέρος των φορέων α^+ -θαλασσαιμίας, οι οποίοι μένουν αδιάγνωστοι. Είναι επίσης γνωστό ότι από τον συνδυασμό α^+ -θαλασσαιμίας και α^0 -θαλασσαιμίας μπορεί να γεννηθεί παιδί με Hb/πάθεια H της οποίας η βαρύτητα ποικίλει. Σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη προτείνεται διατύπωση γενετικής συμβουλής στις περιπτώσεις που υπάρχει κίνδυνος γέννησης παιδιού με ήπια Hb/πάθεια H με την τελική απόφαση να ανήκει στους γονείς ενώ για τις περιπτώσεις που διαπιστώνεται πιθανότητα για Hb/πάθεια H με αμφιβολίες ως προς τη βαρύτητα της νόσου, δίνεται οδηγία για προγεννητικό έλεγχο¹⁷.

Αν και η επιβεβαίωση της διάγνωσης των α -θαλασσαιμικών φορέων, όπου αυτή κριθεί απαραίτητη, γίνεται με μοριακή ανάλυση, αυτό δεν μειώνει την αξία της διαγνωστικής προσέγγισής τους με απλή μέθοδο αφού έτσι προσανατολίζεται σωστά ο εργαστηριακός έλεγχος και αποφεύγονται πολύπλοκες και χρονοβόρες εξετάσεις γεγονός που έχει ιδιαίτερη σημασία σε περίπτωση κύησης.

2.1.3. Ερευνητικό ερώτημα

Το ερώτημα που τέθηκε για διερεύνηση και απετέλεσε το αντικείμενο της παρούσας μελέτης είναι εάν και σε ποιο βαθμό η παρουσία ήπιων μορφολογικών αλλοιώσεων των ερυθροκυττάρων σε συνδυασμό με την παρουσία ενδοερυθροκυτταρικών εγκλείστων HbH, σε άτομα μη σιδηροπενικά, με φυσιολογικές ή ελαφρά μειωμένες τιμές ερυθροκυτταρικών παραμέτρων και φυσιολογικά χρωματογραφικά ευρήματα, αποτελεί ένδειξη για α^+ -θαλασσαιμία.

Μελετήθηκαν για το σκοπό αυτό πιθανοί α^+ -θαλασσαιμικοί φορείς, οι οποίοι επελέγησαν τυχαία με βάση τα παραπάνω κριτήρια από το σύνολο των εξετασθέντων για θαλασσαιμία στο Αιματολογικό Εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου κατά το χρονικό διάστημα 1998-2002. Η μελέτη περιέλαβε:

- α) τη μορφολογία των ερυθροκυττάρων. Μελετήθηκε προσεκτικά η μορφολογία των ερυθροκυττάρων και αξιολογήθηκαν ακόμα και ήπιες μορφολογικές αλλοιώσεις οι οποίες σε μερικές περιπτώσεις απετέλεσαν τη μόνη ένδειξη για την αναζήτηση ενδοερυθροκυτταρικών εγκλείστων HbH.
- β) τον προσδιορισμό των ερυθροκυτταρικών παραμέτρων. Επελέγησαν άτομα με φυσιολογικές ή ελαφρά μειωμένες τιμές ερυθροκυτταρικών δεικτών MCV και MCH.
- γ) τον αποκλεισμό της σιδηροπενίας. Επελέγησαν άτομα με φυσιολογικές τιμές σιδήρου και φερριτίνης στον ορό.
- δ) τον έλεγχο με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC). Επελέγησαν άτομα χωρίς παθολογικά χρωματογραφικά ευρήματα.
- ε) την αναζήτηση ενδοερυθροκυτταρικών εγκλείστων HbH, με methyl violet χρώση, πριν και μετά επώαση παρουσία οξειδωτικού παράγοντα, στους επιλεγέντες με τα παραπάνω κριτήρια επιλογής. Η παρουσία ενδοερυθροκυτταρικών εγκλείστων HbH μόνο στο μετά επώαση και όχι στο πριν την επώαση παρασκεύασμα, θεωρήθηκε ως ένδειξη α -θαλασσαιμίας.
- στ) τη μοριακή ανάλυση. Έγινε στα δείγματα με ένδειξη πιθανής α^+ -θαλασσαιμίας για επιβεβαίωση της διάγνωσης.

2.2. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1. Εξετασθέντα άτομα

Μελετήθηκαν 58 υγιείς, χωρίς μεταξύ τους συγγενική σχέση, πιθανοί φορείς α^+ -θαλασσαιμίας οι οποίοι επελέγησαν από σύνολο 5223 εξετασθέντων για θαλασσαιμία στο Αιματολογικό Εργαστήριο με κριτήρια α) την παρουσία ήπιων μορφολογικών ερυθροκυτταρικών αλλοιώσεων, β) τις φυσιολογικές ή ελαφρά μειωμένες τιμές ερυθροκυτταρικών δεικτών MCV και MCH, γ) τα φυσιολογικά χρωματογραφικά ευρήματα, δ) την απουσία

σιδηροπενίας και ε) την παρουσία ενδοερυθροκυτταρικών εγκλείστων HbH στο μετά, αλλά όχι στο πριν την επώαση παρασκεύασμα. Από τους εξετασθέντες 32 ήταν άνδρες και 26 γυναίκες (διάμεση ηλικία 30,5 έτη).

2.2.2. Παράμετροι αναφοράς

Στους εξετασθέντες μελετήθηκαν ο αριθμός των ερυθροκυττάρων, η συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης, ο μέσος όγκος των ερυθροκυττάρων και η μέση συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης, η μορφολογία των ερυθροκυττάρων, τα χρωματογραφικά ευρήματα (ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των αιμοσφαιρινών), η παρουσία ενδοερυθροκυτταρικών εγκλείστων HbH και τα επίπεδα φερριτίνης και σιδήρου στον ορό. Με εξαίρεση τους προσδιορισμούς σιδήρου και φερριτίνης στον ορό, που είχαν γίνει στο Βιοχημικό και το Ορμονολογικό Εργαστήριο αντίστοιχα, ο υπόλοιπος έλεγχος έγινε στο Αιματολογικό Εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου ενώ τα χρωματογραφικά ευρήματα επιβεβαιώθηκαν με την ίδια μέθοδο στο Εθνικό Κέντρο Μεσογειακής Αναιμίας του Γενικού Λαϊκού Νοσοκομείου Αθηνών.

2.2.2.α. Ερυθροκυτταρικές παράμετροι

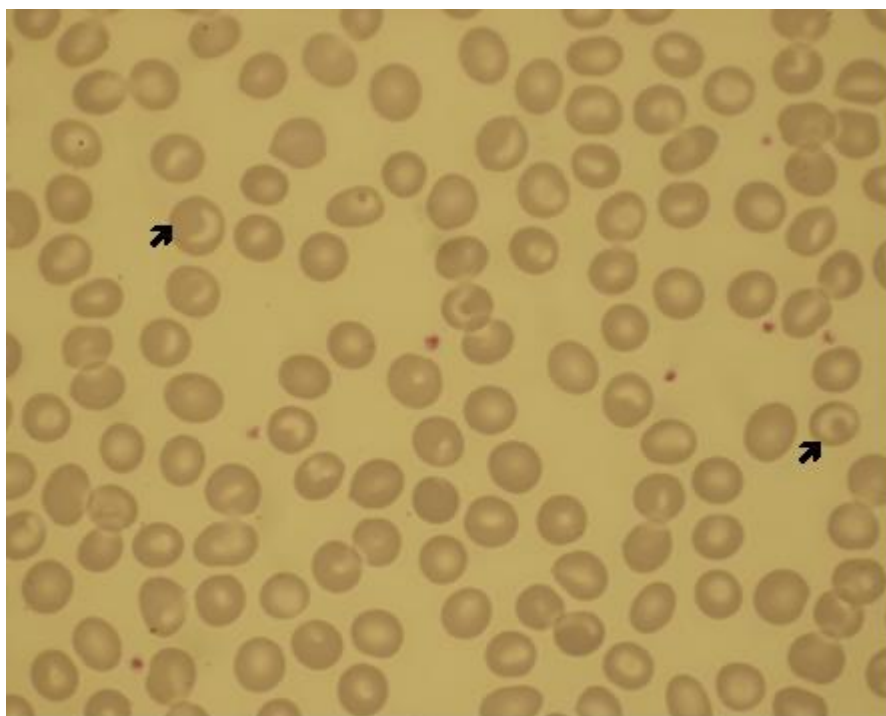
Προσδιορίστηκαν ο αριθμός ερυθροκυττάρων (RBC), η συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης (Hb), ο μέσος όγκος των ερυθροκυττάρων (MCV) και η μέση περιεκτικότητα της αιμοσφαιρίνης (MCH), σε αυτόματο αιματολογικό αναλυτή Coulter LH 750. Οι φυσιολογικές τιμές που δίνονται από το Εργαστήριο είναι για τον αριθμό των ερυθροκυττάρων $4,5-5,5 \times 10^6/\mu\text{l}$ (για τους άνδρες) και $3,8-4,8 \times 10^6/\mu\text{l}$ (για τις γυναίκες), για την Hb 14-18 g/dl (για τους άνδρες) και 12-16 g/dl (για τις γυναίκες), για το MCV 83-101 fl και για το MCH 27-32 pg.

2.2.2.β. Μορφολογία ερυθροκυττάρων

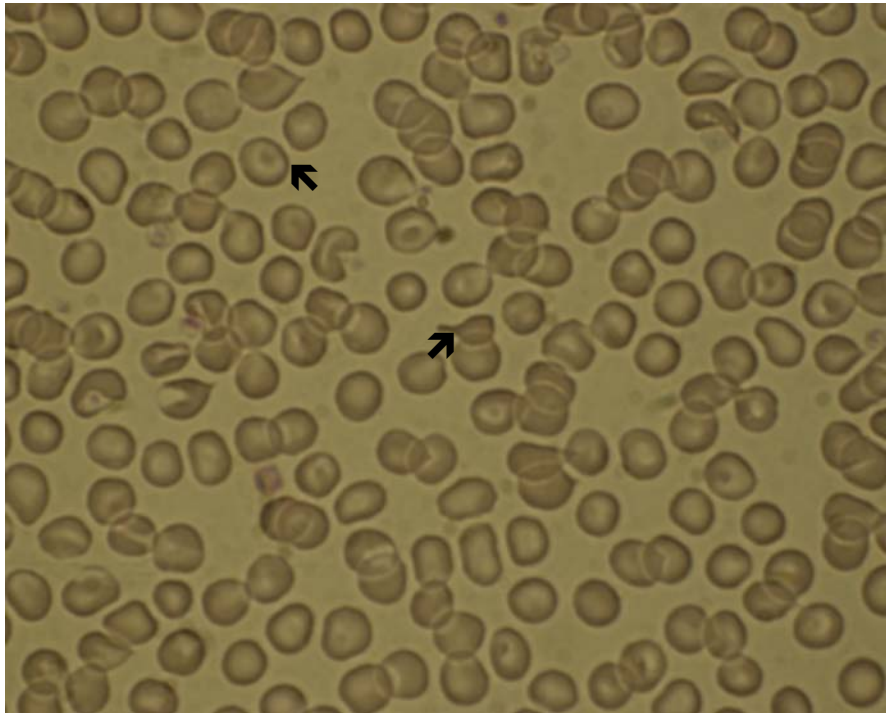
Εξετάστηκε η μορφολογία των ερυθροκυττάρων σε παρασκεύασμα πρόσφατου ολικού αίματος, ληφθέντος με αντιπηκτικό K_3EDTA , μετά από χρώση. Η χρώση έγινε με χρωστικές May Grünwald - Giemsa. Η τεχνική έχει ως εξής:

Γίνεται λεπτή επίστρωση πρόσφατου ολικού αίματος σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Το παρασκεύασμα στεγνώνει στον αέρα, μονιμοποιείται σε μεθανόλη για 6 min και στη συνέχεια εμβαπτίζεται διαδοχικά

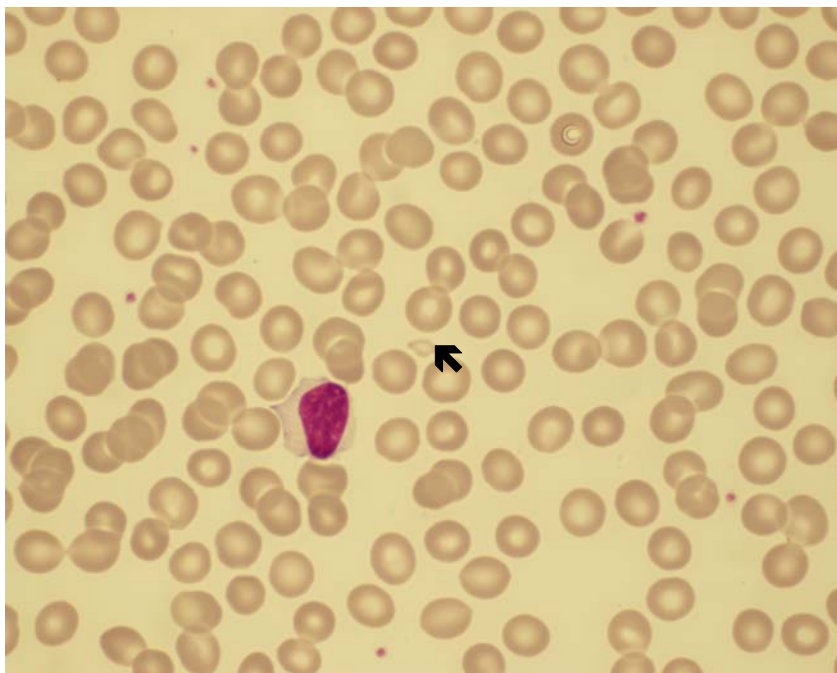
για χρώση σε διάλυμα χρωστικής May-Grünwald για 6 min και σε διάλυμα χρωστικής Giemsa για 30 min. Η μεθανόλη χρησιμοποιείται αδιάλυτη ενώ τα διαλύματα των χρωστικών παρασκευάζονται ως εξής. Παρασκευάζεται φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 10X με διάλυση 66,3 g δισόξινου φωσφορικού καλίου (KH_2PO_4) και 25,6 g μονόξινου φωσφορικού νατρίου (Na_2HPO_4) σε 1 lt απεσταγμένο νερό. Από αυτό παρασκευάζεται διάλυμα 1X με αρραίωση 1:10 και το διάλυμα αυτό ρυθμίζεται σε pH 7 με διάλυμα NaOH 5N. Για την παρασκευή του διαλύματος της χρωστικής May-Grünwald λαμβάνονται 100 ml πυκνής χρωστικής και 100 ml φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος 1X ενώ για την παρασκευή του διαλύματος της χρωστικής Giemsa λαμβάνονται 30 ml πυκνής χρωστικής και 200 ml φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος 1X. Μετά τη χρώση το παρασκεύασμα ξεπλένεται με νερό της βρύσης, στεγνώνει στον αέρα και μικροσκοπείται με καταδυτικό φακό (100X). Εκτιμήθηκαν προσεκτικά κατά τη μικροσκόπηση ακόμα και ήπιες μορφολογικές ερυθροκυτταρικές αλλοιώσεις (εικ. 5) προκειμένου να επιλεγούν τα δείγματα για έλεγχο εγκλείστων HbH.



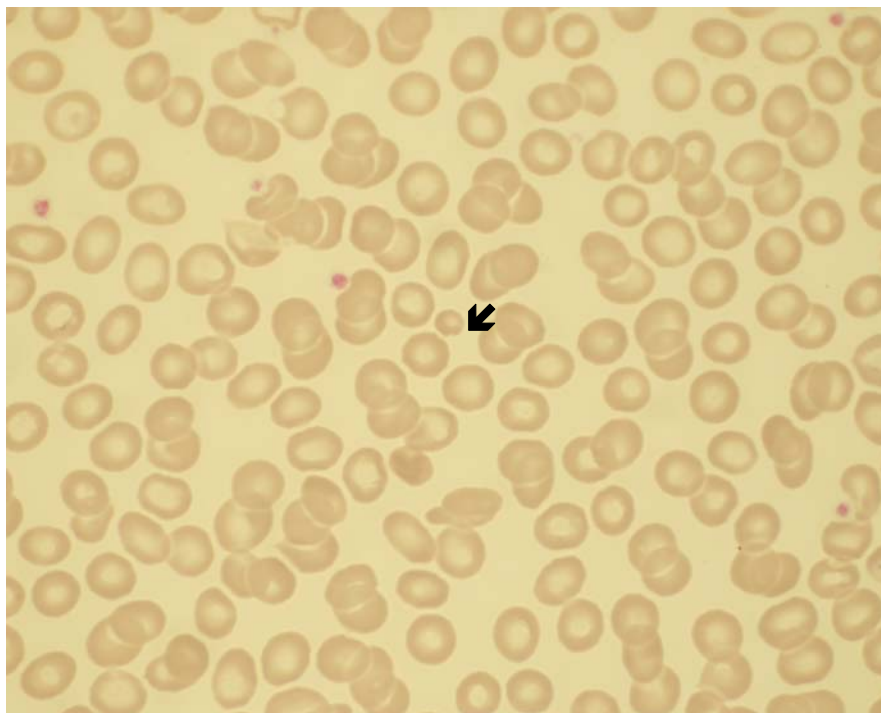
(α) $\alpha^{\text{Hph}}\alpha/\alpha\alpha$ MCV=81.8 fl MCH=26.2 pg



(β) $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ MCV=83.9 fl MCH=27.1 pg



(γ) $\alpha^{1c}/\alpha\alpha$ MCV=84.2 fl MCH=27.2 pg



(δ) $\alpha^{\text{TSaudi}}\alpha/\alpha\alpha$ MCV=82.4 fl MCH=26.9 pg

Εικόνα 5 (α, β, γ, δ). Μορφολογία ερυθροκυττάρων, γονότυποι και ερυθροκυτταρικοί δείκτες (MCV και MCH) τεσσάρων α^+ -θαλασσαιμικών φορέων.

2.2.2.γ. Μέτρηση σιδήρου και φερριτίνης ορού

Ο σίδηρος ορού προσδιορίστηκε με χρωματομετρική μέθοδο σε αναλυτή AU 5400 Olympus Medicon eG, Tuttlingen, Germany. Τιμές 60-130 $\mu\text{g/dl}$ για τους άνδρες και 50-130 $\mu\text{g/dl}$ για τις γυναίκες θεωρήθηκαν φυσιολογικές.

Η φερριτίνη ορού προσδιορίστηκε με ανοσοενζυμική μέθοδο (AxSYM Ferritin assay, Abbott Laboratories, IL, USA). Τιμές 15-300 ng/ml για τους άνδρες και 15-200 ng/ml για τις γυναίκες θεωρήθηκαν φυσιολογικές⁶⁰.

2.2.2.δ. Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των αιμοσφαιρινών

Η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των αιμοσφαιρινών έγινε με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (High Performance Liquid Chromatography-

HPLC) με αναλυτή Variant Hemoglobin Testing System (Biorad Lab., Hercules, CA, USA).

Ο διαχωρισμός των αιμοσφαιρινών με τη μέθοδο της χρωματογραφίας βασίζεται στην αρχή της ιοντοανταλλαγής. Οι ιοντοανταλλαγείς οι οποίοι χρησιμοποιούνται είναι είτε κατιονικοί (carboxymethyl-cellulose -CMC) είτε ανιονικοί (Diethylaminoethyl-cellulose -DEAE cellulose). Όλες οι μέθοδοι είναι αξιόπιστες με μεγάλη διαχωριστική ικανότητα, αλλά είναι αρκετά χρονοβόρες για να εφαρμοστούν ως μέθοδοι ανάλυσης μεγάλου αριθμού δειγμάτων. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης είναι ιοντοανταλλακτική υγρή χρωματογραφία με κατιονικούς ιοντοανταλλάκτες. Η τεχνική αυτή χαρακτηρίζεται από μεγάλη ταχύτητα, ευαισθησία, ειδικότητα και επαναληψιμότητα και με τον πλήρη αυτοματισμό της τείνει να αντικαταστήσει πλήρως τις συμβατικές τεχνικές για την ποιοτική μελέτη των αιμοσφαιρινών και την ποσοτική μέτρηση της αιμοσφαιρίνης A₂ και F. Με το σύστημα αυτό μπορούν να αναλυθούν τόσο οι αιμοσφαιρίνες του αίματος όσο και οι αλυσίδες αιμοσφαιρίνης που ανιχνεύονται σε κάθε δείγμα μέσω δύο διαφορετικών προγραμμάτων. Τα αποτελέσματα καταγράφονται αυτόματα με μορφή γραφικής παράστασης, ενώ ταυτόχρονα καταγράφεται και ο χρόνος απομόνωσης των αιμοσφαιρινικών κλασμάτων. Ωστόσο, είναι απαραίτητος ο έλεγχος της καμπύλης και η διακριτικότητα της χρωματογραφίας, ώστε να εξασφαλίζεται η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων⁵⁸.

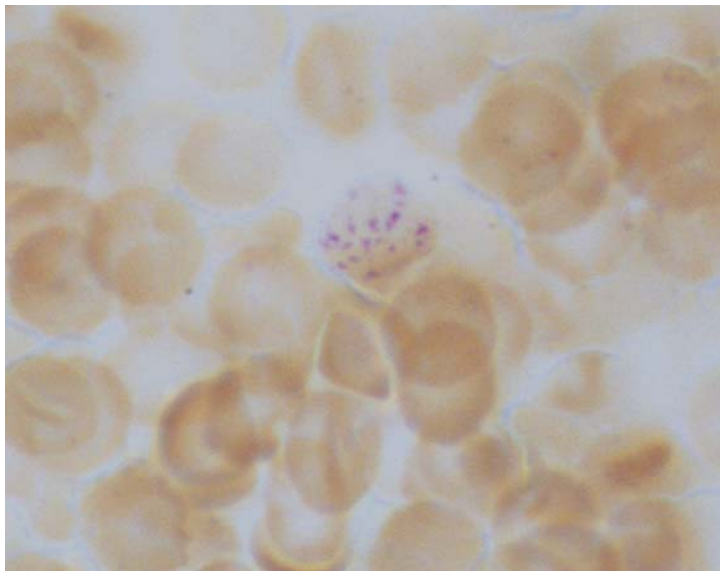
Οι φυσιολογικές τιμές του Εργαστηρίου μας είναι για την HbA₂ 1,8-3,3% και για την HbF 0-2%.

2.2.2.ε. Ανίχνευση ενδοερυθροκυτταρικών εγκλείστων HbH

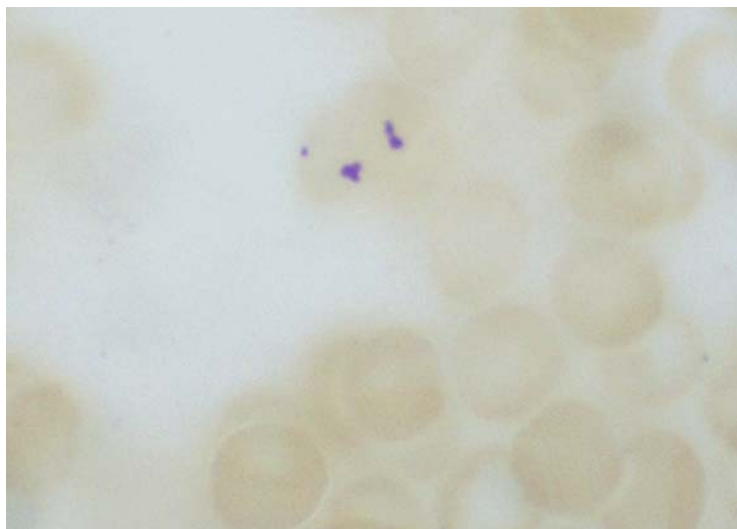
Περιγραφή της τεχνικής που εφαρμόστηκε:

Σε σωληνάριο Wassermann 100 μl πρόσφατου ολικού αίματος ληφθέντος με αντιπηκτικό K₃EDTA αναμειγνύονται με 100 μl διαλ. χρωστικής (methyl violet 6B Merck 1% σε φυσιολογικό ορό) και αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min⁶⁴. Μετά από ανακίνηση στρώνονται λεπτές επιστρώσεις σε αντικειμενοφόρες πλάκες που στεγνώνουν στον αέρα. Η μικροσκόπηση γίνεται με φακό 40X σε περίπου 50.000 ερυθροκύτταρα. Σε άλλο σωληνάριο Wassermann 500 μl ολικού αίματος από το ίδιο δείγμα αναμειγνύονται με 100 μl διαλ. NaNO₂ (1280 mg NaNO₂ σε 100 ml

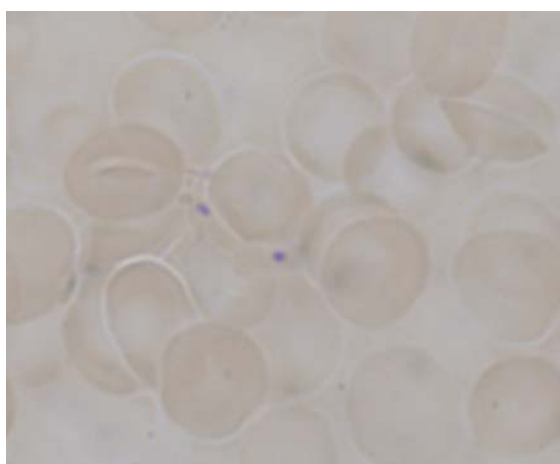
απεσταγμένο νερό) και επωάζονται σε θερμοκρασία 37° C για 30 min. Ακολούθως 100 μl ιζήματος επωασθέντων ερυθροκυττάρων αναμειγνύονται με 100 μl διαλ. χρωστικής (methyl violet 6B Merck 1% σε φυσιολογικό ορό) και αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min¹³. Η διαδικασία που ακολουθεί είναι η ίδια με τη διαδικασία για τη χρώση χωρίς επώαση. Τα έγκλειστα φαίνονται σαν αδρά ιώδη κοκκία, ποικίλου αριθμού, μεγέθους και σχήματος (εικ. 6). Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι με τη χρώση methyl violet τα έγκλειστα των α -θαλασσαιμικών φορέων ανιχνεύονται μόνο στο μετά επώαση παρασκεύασμα σε αντίθεση με τα έγκλειστα που παρατηρούνται σε άλλες καταστάσεις τα οποία ανιχνεύονται τόσο στο πριν όσο και στο μετά επώαση παρασκεύασμα. Τέτοιες καταστάσεις είναι η αιμοσφαιρινοπάθεια H, η μείζων β -θαλασσαιμία σε σπληνεκτομηθέντες ασθενείς, αιμοσφαιρινοπάθειες οφειλόμενες σε δομικές διαταραχές και η κατακρήμνιση φυσιολογικής αιμοσφαιρίνης σε έλλειψη ενζύμου G-6PD μετά από οξειδωτική κρίση. Στη μελέτη μας αξιολογήθηκε σαν θετικό αποτέλεσμα για α^+ -θαλασσαιμία η παρουσία εγκλείστων (έστω και ενός ερυθροκυττάρου με έγκλειστα), μόνο στη μετά επώαση χρώση.



(α)



(β)



(γ)

Εικόνα 6 (α, β, γ). Ερυθροκύτταρα με έγκλειστα HbH μετά από επώαση του δείγματος με NaNO_2 και χρώση με methyl violet

2.2.3. Ειδικές μέθοδοι – Μοριακή ανάλυση

Έγινε γονιδιακή ανάλυση όλων των δειγμάτων στην περιοχή του α_2 και του α_1 -γονιδίου. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε στο Εθνικό Κέντρο Μεσογειακής Αναιμίας του Λαϊκού Νοσοκομείου Αθηνών με τις τεχνικές του Τμήματος Προγεννητικού ελέγχου και περιέλαβε:

2.2.3.α. Απομόνωση DNA

Η απομόνωση DNA έγινε από λευκοκύτταρα περιφερικού αίματος με μέθοδο κατακρήμνισης των πρωτεϊνών σε κορεσμένο διάλυμα άλατος⁶⁵ που περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- Οσμωτική λύση των ερυθροκυττάρων και συγκέντρωση των εμπύρηνων λευκών.
- Διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών των λευκοκυττάρων με απορρυπαντικά μέσα και συλλογή των πυρήνων με φυγοκέντρωση.
- Λύση των πυρηνικών μεμβρανών με μηχανική ανάδευση παρουσία απορρυπαντικού και πρωτεϊνάσης για την άμεση καταστροφή των νουκλεασών.
- Κατακρήμνιση των πρωτεϊνών με κορεσμένο διάλυμα NaCl.
- Κατακρήμνιση του απομονωμένου DNA και διάλυση σε υδατικό διάλυμα.
- Έλεγχος της καθαρότητας και υπολογισμός της συγκέντρωσης του DNA.

Αντιδραστήρια

- Αιθυλενοδιαμινοοξικό νάτριο (Na₂EDTA) (διάλ. 10% w/v σε απεσταγμένο νερό) Lysis 1 (0,83g 155 mM NH₄Cl – 0,1g 10 mM KHCO₃ – 0,037g 1 mM Na₂EDTA σε 100 ml απεσταγμένο νερό- pH7,4)
- Lysis 2 (0,12G 10mM Tris – 2,32G 400 mM NaCl – 0,074g 2mM Na₂EDTA σε 100 ml απεσταγμένο νερό - pH8,2)
- Δωδεκακυλοθειϊκό νάτριο (SDS) 10%
- Πρωτεϊνάση K 20mg/ml
- NaCl 6M
- Αιθανόλη (διαλ.100%)
- Αγαρόζη (gel αγαρόζης 2%)
- Βρωμιούχο αιθίδιο
- DNA του βακτηριοφάγου ΦX-174 HaeIII

Τεχνική

- Λήψη 7-8 ml αίματος σε σωληνάριο των 10ml (ανθεκτικό στους -80°C) με 200 μl αντιπηκτικό EDTA 10% w/v και φύλαξη στους -80°C .
- Απόψυξη των δειγμάτων. Προσθήκη απεσταγμένου νερού. Καλή ανακίνηση με αναστροφή. Φυγοκέντρηση για 20 min στις 3000 στρ/min στους 4°C .
- Απόρριψη του υπερκειμένου με προσοχή. Προσθήκη απεσταγμένου νερού. Καλή ανακίνηση. Φυγοκέντρηση για 20 min στις 3000 στρ/min στους 4°C .
- Απόρριψη του υπερκειμένου με προσοχή. Προσθήκη 9 ml διαλύματος Lysis 1. Καλή ανακίνηση. Φυγοκέντρηση για 20 min στις 3000 στρ/min στους 4°C .
- Απόρριψη του υπερκειμένου με προσοχή. Προσθήκη 3 ml Lysis 1. Καλή ανακίνηση. Φυγοκέντρηση για 20 min στις 3000 στρ/min στους 4°C .
- Απόρριψη του υπερκειμένου με προσοχή. Προσθήκη 4 ml Lysis 2. Ανακίνηση χωρίς αναστροφή.
- Μεταφορά του περιεχομένου σε αριθμημένες κωνικές φιάλες των 50 ml που περιέχουν 400 μl διαλύματος SDS και 60 μl διαλύματος πρωτεΐνάσης K. Κάλυψη των φιαλών με παραφίλμ. Τοποθέτηση των φιαλών στους 37°C με ανακίνηση O/N (over night).
- Μεταφορά του περιεχομένου των φιαλών σε διαφανή πλαστικά σωληνάκια των 10 ml. Προσθήκη 1 ml διαλύματος NaCl 6M (κορεσμένο). Καλή ανακίνηση για 15 sec. Φυγοκέντρηση για 20 min στις 4000 στρ/min σε θερμοκρασία δωματίου 20°C .
- Μεταφορά του υπερκειμένου σε άλλα σωληνάκια. Απόρριψη των σωληναρίων με το ίζημα. Προσθήκη αιθανόλης (σε διπλάσιο όγκο του υπερκειμένου) στα σωληνάκια με το υπερκείμενο. Καλή ανακίνηση. Σχηματισμός λεπτού νήματος DNA. Λήψη του DNA με πιπέτα με γυρισμένο άκρο.
- Μεταφορά του DNA σε σωληνάκια βαθειάς κατάψυξης των 2 ml που περιέχουν 1ml απεσταγμένο νερό. Ανακίνηση O/N.

Ο ποιοτικός έλεγχος του απομονωμένου DNA γίνεται με οριζόντια ηλεκτροφόρηση του σε πήκτωμα 2% αγαρόζης παράλληλα με μάρτυρα μεγάλου μοριακού βάρους γραμμικού DNA (λ φάγος) γνωστής συγκέντρωσης. Το DNA εμφανίζεται ως μία ζώνη μεγάλου μοριακού βάρους όταν η πηκτική βάφεται με βρωμιούχο αιθίδιο που έχει την ιδιότητα να φθορίζει με έντονο πορτοκαλί χρώμα όταν είναι δεσμευμένο σε διπλά ελικωμένο DNA. Η χρώση επιτυγχάνεται με εμβάπτιση της πηκτής αγαρόζης σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου επί 15 min. Η παρατήρηση γίνεται με τοποθέτηση της πηκτής σε οθόνη υπεριώδους ακτινοβολίας 302 nm (U.V. Transilluminator, UVP Inc, USA) και φωτογραφίζεται με αυτόματη φωτογραφική μηχανή (Polaroid).

Η καθαρότητα του DNA ελέγχεται με την οπτική πυκνότητα (Optical Density, OD) αραιωμένου διαλύματος DNA στα 260 και 280 nm. Σε μήκος κύματος 260 nm, η απορρόφηση αντιστοιχεί στο εμπεριεχόμενο DNA, ενώ στα 280 απορροφούν οι πρωτεΐνες. Μεγάλη καθαρότητα του DNA αντιστοιχεί σε λόγο απορρόφησης OD (260nm) /OD (280 nm) μεταξύ 1.70 και 1.90.

Η συγκέντρωση του DNA στο διάλυμα υπολογίζεται από την απορρόφηση του διαλύματος στα 260 nm και με δεδομένο ότι διάλυμα δίκλωνου DNA συγκέντρωσης 50 µg/ml εμφανίζει απορρόφηση στα 260 nm ίση με 1. Ισχύει δηλαδή ο τύπος: Συγκέντρωση DNA = 50 µg/ml X OD (260 nm) δείγματος.

2.2.3.β. Άμεση αποκάλυψη σημειακών υποκαταστάσεων ή μικρών ελλείψεων γενετικού υλικού

Η αποκάλυψη σημειακών αντικαταστάσεων ή ελλείψεων λίγων μόνο βάσεων σε ένα γονίδιο με τα κατάλληλα ολιγονουκλεοτίδια, είναι γενικά δύσκολη γιατί η σχέση της αλληλουχίας του γονιδίου (στην προκειμένη περίπτωση του α- γονιδίου) με το συνολικό μήκος του γονιδιώματος είναι πολύ μικρή και το ραδιενεργό σήμα που αποδίδεται με τις συμβατικές τεχνικές, δύσκολα ανιχνεύεται. Το εμπόδιο αυτό παρακάμφθηκε τα τελευταία χρόνια με την τεχνολογία του ενζυμικού in vitro πολλαπλασιασμού του DNA

των υπό μελέτη γονιδίων, με την οποία επιτυγχάνεται ενίσχυση του DNA της υπό μελέτη περιοχής σε ποσότητα που επιτρέπει τον εύκολο υβριδισμό του με τα κατάλληλα ραδιενεργά νουκλεοτίδια.

A) Ενζυμικός in vitro πολλαπλασιασμός του DNA (PCR)

Ο ενζυμικός πολλαπλασιασμός του DNA (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης -PCR) είναι μία εργαστηριακή μέθοδος που επιτρέπει την ενζυμική σύνθεση συγκεκριμένου τμήματος αλληλουχίας DNA μεγέθους από 50 bp έως και περισσότερες από 2000 bp σε σύντομο χρονικό διάστημα. Με τη μέθοδο αυτή αναπαράγονται πολλαπλά αντίγραφα του συγκεκριμένου τμήματος DNA με καθορισμένο μήκος και αλληλουχία. Η μέθοδος αυτή⁶⁶ προκάλεσε πραγματική επανάσταση στον τρόπο διάγνωσης των γενετικών νοσημάτων επιτρέποντας την άμεση αναγνώριση των σημειακών μεταλλαγών ή ελλείψεων λίγων νουκλεοτιδίων σε μικρό χρονικό διάστημα. Εφαρμόστηκε αρχικά στο β- γονίδιο για την προγεννητική διάγνωση της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας και της β-θαλασσαιμίας⁶⁷ και στη συνέχεια επεκτάθηκε και σε άλλα γενετικά νοσήματα.

Η μέθοδος στηρίζεται στην ιδιότητα των DNA πολυμερασών να συνθέτουν συμπληρωματική έλικα DNA σε κατεύθυνση 5'→3', χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα μονόκλωνο DNA ξεκινώντας από μια περιοχή δίκλωνου DNA. Χρησιμοποιούνται δύο εκκινητές (19μερή ή 20μερή συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια) με συμπληρωματική αλληλουχία προς τις αντίθετες αλυσίδες του DNA, το οποίο έχει αποδιαταχθεί σε υψηλή θερμοκρασία. Οι εκκινητές αναδιατάσσονται με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες, στα όρια της υπό μελέτης περιοχής και δίνουν έναυσμα για τη δράση της πολυμεράσης η οποία αντιγράφει την αλυσίδα DNA προς τον αντίθετο εκκινητή. Έτσι το τμήμα του DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί, οριοθετείται δεξιά και αριστερά από τους δύο εκκινητές. Η αντίδραση επαναλαμβάνεται για 30 κύκλους, καθένας εκ των οποίων περιλαμβάνει τρία στάδια, την αποδιάταξη (denaturation) του DNA, τη σύνδεση των δύο εκκινητών με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλυσίδες του DNA (annealing) και τη σύνθεση DNA και επιμήκυνση των αλυσίδων με τη βοήθεια της πολυμεράσης (extention). Μετά το τέλος της αντίδρασης, η

συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος έχει αυξηθεί εκθετικά μέχρι και ένα εκατομμύριο φορές.

Στις αρχικές εφαρμογές της μεθόδου, το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το τμήμα Klenow της DNA πολυμεράσης της *E. coli*. Το ένζυμο όμως αυτό αδρανοποιείται από την υψηλή θερμοκρασία με αποτέλεσμα να απαιτείται εκ νέου προσθήκη του ενζύμου σε κάθε κύκλο. Γρήγορα αντικαταστάθηκε από τη θερμοανθεκτική πολυμεράση που είχε απομονωθεί ήδη από το 1976 από το θερμοφιλο βακτηρίδιο *Thermus aquaticus*, το οποίο ευδοκίμει σε θερμοκρασίες 70-75⁰ C και η οποία ονομάζεται Taq DNA πολυμεράση⁶⁸.

Επί πλέον, η εκλεκτική ενίσχυση με τη δράση της Taq DNA πολυμεράσης είναι αποτελεσματικότερη, γιατί κατά τη διάρκεια της μεταφοράς του δείγματος από τους 55⁰ C (στάδιο σύνδεσης) στους 72⁰ C (στάδιο επιμήκυνσης), τα υβρίδια εκκινητών-υποστρώματος που δεν είναι ειδικά συνδεδεμένα αποσυνδέονται, ενώ τα απολύτως συμπληρωματικά παραμένουν σταθερά, με αποτέλεσμα να αυξάνεται σημαντικά η ειδικότητα της αντίδρασης⁶⁹. Η χρησιμοποίηση της Taq DNA πολυμεράσης επέτρεψε την αυτοματοποίηση της αντίδρασης με την κατασκευή ειδικών θερμικών κυκλοποιητών (Thermal cyclers), που μεταβάλλουν τη θερμοκρασία με ηλεκτρονικό πρόγραμμα.

Αντιδραστήρια:

- Εξεταζόμενο DNA ως υπόστρωμα της αντίδρασης.
- Εκκινητές:
- Κοινός 5' α-γονιδίου A:5' – TGG AGG GTG GAG ACG TCC TG-3'(Dode)
- Ειδικός α₂ γονιδίου B:5' – ATT CCG GGA CAG AGA GAA CC-3'
- Ειδικός α₁ γονιδίου C:5' – GCT TGG CAC GTT TGC TGA GG-3'
- Δεοξυνουκλεοτίδια (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) σε συγκέντρωση 100 mM.
- Ένζυμο Taq DNA πολυμεράση σε διάλυμα συντήρησης (50% γλυκερόλη, 20mM Tris-HCl pH 8, 0.1 mM EDTA, 1mM DTT, 200 μg/ml ζελατίνη με συγκέντρωση 5 μονάδες/μl).

-
- 10X διάλυμα εργασίας με σύσταση 166 mM θειϊκό αμμώνιο (NH₄)₂SO₄, 0.67 M Tris-HCl pH 8.4, 67 mM EDTA, 100 mM β-μερκαπτοαιθανόλη και 160 μg/ml BSA.
 - Χλωριούχο μαγνήσιο MgCl₂ 25mM.
 - Dimethyl sulfoxide (DMSO).
 - Απεσταγμένο, αποστειρωμένο νερό.
 - Παραφινέλαιο.
 - DNA του βακτηριοφάγου ΦΧ-174 το οποίο επωασμένο με ένζυμο περιορισμού Hae III αποδίδει τμήματα 1.35, 1.07, 0.87, 0.6, 0.31, 0.28, 0.27, 0.23, 0.19, 0.11 και 0.07 kb.

Τεχνική:

- Η αντίδραση έχει τελικό όγκο 100 μl. Σε σωληνάριο 0,5 ml (Eppendorf) τοποθετούνται 0,5-1 μg DNA και προστίθενται 10 μl 10X διάλυμα εργασίας, 200 μM από έκαστο δεοξυνουκλεοτίδιο, 10% DMSO, 2,5 mM MgCl₂, 50 pmols από κάθε εκκινητή και 2,5 μονάδες ενζύμου. Συμπληρώνουμε με νερό μέχρι τον τελικό όγκο αντίδρασης, αναμειγνύουμε ήπια, προσθέτουμε 2 σταγόνες παραφινέλαιου για να αποφευχθεί η εξάτμιση του υλικού και τοποθετούμε στον κυκλοποιητή.
- Η αντίδραση γίνεται σε αυτόματο θερμικό κυκλοποιητή (M.J. Reasearch). Προγραμματισμός των θερμοκρασιών και των απαιτούμενων χρόνων των τριών σταδίων της ενζυμικής αντίδρασης ως εξής: Αρχική αποδιάταξη στους 95° C επί 10' και 30 διαδοχικοί κύκλοι με αποδιάταξη στους 95° C επί 2', αναδιάταξη στους 60° C επί 2' και επιμήκυνση στους 72° C επί 3'. Μετά την ολοκλήρωση των 30 κύκλων προγραμματίζουμε τελική επιμήκυνση στους 72° C επί 7' και συντήρηση στους 4° C.
- Το προϊόν της αντίδρασης ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2%, η οποία εμβαπτίζεται σε βρωμιούχο αιθίδιο. Παράλληλα ηλεκτροφορείται και DNA του βακτηριοφάγου ΦΧ-174 Hae III για τη σύγκριση του μεγέθους των ζωνών που εμφανίζονται. Το προϊόν της αντίδρασης φυλάσσεται στους -20° C για μεγάλο χρονικό διάστημα.

B) Μεταφορά και μονιμοποίηση του PCR προϊόντος σε ημιπερατή μεμβράνη

Η μέθοδος στηρίζεται στην κατακράτηση του DNA κατά τη διέλευση του από ημιπερατή μεμβράνη, σε ειδική συσκευή υπό κενό.

Αντιδραστήρια:

- Προϊόν της ενζυμικής αντίδρασης (PCR).
- Διάλυμα 20XSSC (3 M NaCl, 0.3 M Na Citrate pH 7).
- Διάλυμα αποδιάταξης (0.4 N NaOH και 0.6 M NaCl).
- Ημιπερατή μεμβράνη διαστάσεων 9X12 εκατοστά (BIORAD).

Τεχνική:

- Η μεταφορά του προϊόντος PCR γίνεται σε ειδική συσκευή προσρόφησης (dot-blot, BRL) συνδεδεμένη με αντλία κενού.
- Η μεμβράνη χωρίζεται σε δύο όμοια τμήματα και εμβαπτίζεται διαδοχικά σε απεσταγμένο νερό επί 5' και σε 2XSSC μέχρι τη χρήση της.
- 10-30 μl προϊόντος PCR αραιώνονται με 338-318 μl απεσταγμένου νερού σε σωληνάριο 1,5 ml και προστίθενται 52 μl διαλύματος αποδιάταξης, με καλή ανάδευση. Το μείγμα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου επί 10' ακριβώς, για την πλήρη αποδιάταξη του DNA.
- Τοποθέτηση της μεμβράνης στη συσκευή, σύνδεση με την αντλία κενού και εφαρμογή του κενού.
- Προσθήκη 200 μl από κάθε δείγμα σε δύο υποδοχές της συσκευής σε συμμετρικές θέσεις πάνω στα δύο τμήματα της μεμβράνης αντίστοιχα και προσρόφηση υπό κενό επί 30'.
- Η μεμβράνη αφαιρείται από τη συσκευή, στεγνώνει στον αέρα και τοποθετείται σε ξηρό κλίβανο 80⁰ C επί δύο ώρες, για τη μονιμοποίηση του DNA στη μεμβράνη.

Γ) Επιλογή και σήμανση συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων

Τα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση των μεταλλαγών ή μικρών ελλείψεων βάσεων. Για κάθε γενετική βλάβη χρησιμοποιούνται δύο ειδικά νουκλεοτίδια (πιν. 2). Το ένα αποτελεί αντίγραφο της περιοχής του φυσιολογικού γονιδίου και το άλλο, αντίγραφο του μεταλλαγμένου γονιδίου. Σε κάθε πείραμα, το αποτέλεσμα θα είναι θετικό με

το ένα ή το άλλο νουκλεοτίδιο (ομόζυγη κατάσταση για το φυσιολογικό ή το μεταλλαγμένο) ή και με τα δύο (ετερόζυγη κατάσταση). Η εφαρμογή των συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων ως ανιχνευτών υβριδισμού βασίζεται:

- Στη δυνατότητα σήμανσης τους με ραδιενεργό ^{32}P , που επιτρέπει την ανίχνευση τους.

Πίνακας 2. Αλληλουχίες ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση μεταλλαγών στα α_2 και α_1 -γονίδια.

Μεταλλαγή	DNA αλληλουχία
IVS1 5' πεντανουκλεοτιδική έλλειψη	Nl: 5'-GCC CTG GAG AGG TGA GGC T-3' Mt: 5'-AGG CCC TGG AGA GGC TCC C-3'
Μεταλλαγή σήματος Poly(A)TSaudi [AATAAA > AATAAG]	Nl: 5'-TGA ATA AAG TCT GAG TGG G- 3' Mt: 5'-TGA ATA AGG TCT GAG TGG G- 3'
μεταλλαγή σήματος Poly(A) [AATAAA > AATGAA]	Nl: 5'-TGA ATA AAG TCT GAG TGG G- 3' Mt: 5'-TGA ATG AAG TCT GAG TGG G- 3'
Σημειακή μεταλλαγή στη θέση 29 T > C (Agrinio)	Nl: 5'-GAG GCC CTG GAG AGG TGA-3' Mt: 5'-GAG GCC CCG GAG AGG TGA- 3'
Σημειακή μεταλλαγή στη θέση 142 T > A (Icaria)	Nl: 5'-CTC CAG CTT AAC GGT ATT T- 3' Mt: 5'-AAA TAC CGT AAA GCT GGA G- 3'

-
- Στην ικανότητα των μορίων αυτών να σχηματίζουν υδρογονικούς δεσμούς με συμπληρωματικές αλληλουχίες DNA και ο σχηματισμός του υβριδίου ολιγονουκλεοτιδίου-DNA να είναι αντιστρεπτός.

Ο σχηματισμός σταθερών υβριδίων εξαρτάται από το μήκος του ολιγονουκλεοτιδίου (δεν πρέπει να είναι μικρότερο από 17 βάσεις αλλά να κυμαίνεται μεταξύ 19 και 21 βάσεων), τη σειρά των βάσεων, την παρουσία αποσταθεροποιητικών παραγόντων, τη θερμοκρασία και την ιονική ισχύ του διαλύματος υβριδισμού. Έχει διαπιστωθεί ότι η μεγάλη περιεκτικότητα των ολιγονουκλεοτιδίων σε βάσεις G και C εξασφαλίζει τη μεγαλύτερη σταθερότητα των υβριδίων, λόγω του τριπλού δεσμού που αναπτύσσεται μεταξύ αυτών και των συμπληρωματικών τους βάσεων.

Στη μέθοδο αυτή, το ένζυμο T_4 πολυνουκλεοτιδική κινάση δρα σε μονόκλωνο υπόστρωμα καταλύοντας την ανταλλαγή του γ-φωσφόρου του γ- ^{32}P ATP με τον φώσφορο του 5' άκρου του DNA. Η αντίδραση επιτυγχάνεται με περίσσεια γ- ^{32}P ATP και ADP. Αυτό οδηγεί την αντίδραση, ώστε το ένζυμο να μεταφέρει τον 5' φώσφορο του DNA στο ADP και το DNA να φωσφορυλιώνεται με τον γ-φωσφόρο του γ- ^{32}P ATP⁷⁰. Η απομάκρυνση των ελεύθερων ραδιενεργών νουκλεοτιδίων επιτυγχάνεται με διαχωρισμό σε προκατασκευασμένη στήλη με ρητίνη Sephadex G25.

Αντιδραστήρια:

- Ολιγονουκλεοτίδια σε συγκέντρωση 1,5 μg/μl.
- γ- ^{32}P ATP 3000 Ci/mmol (AMERSHAM).
- T_4 πολυνουκλεοτιδική κινάση 10 μονάδες /μl (BRL).
- 10X διάλυμα εργασίας ενζύμου (700 mM Tris-HCl pH 7.6, 100mM MgCl_2 , 50 mM DTT).
- Στήλη Sephadex G-25 (PHARMACIA).

Τεχνική:

- Προσθήκη σε σωληνάριο 1,5 ml (Eppendorf), 150 ng συνθετικού ολιγονουκλεοτιδίου, 1/10 του τελικού όγκου (2 μl) 10X διάλυμα εργασίας, 20 μονάδες ενζύμου T_4 κινάση, 10 μl γ- ^{32}P ATP και απεσταγμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 20 μl.

- Επώαση του μίγματος στους 37⁰ C επί 40', προσθήκη 1 μl 0.5 M EDTA για τη διακοπή της αντίδρασης και 479 μl απεσταγμένου νερού.
- Προετοιμασία της στήλης ρητίνης Sephadex G-25, με πλύσιμο 3 φορές με απεσταγμένο νερό. Μόλις στεγνώσει η στήλη προσθέτουμε το δείγμα (500 μl), του οποίου γίνεται προσρόφηση στη ρητίνη. Έκλουση του σημασμένου μορίου με 1 ml απεσταγμένου νερού, ενώ τα ελεύθερα νουκλεοτίδια παραμένουν δεσμευμένα μέσα στη στήλη. Προσθήκη του εκλούσματος σε 40 ml υγρό υβριδισμού σε ειδικά σωληνάρια των 50 ml (Falcon) και φύλαξη σε θερμοκρασία δωματίου.
- 40 μl ραδιενεργού ανιχνευτή διαλύονται σε 5 ml σπινθηριστικού υγρού (Luma gel), μετρούνται σε απαριθμητή β-ακτινοβολίας σε πρόγραμμα μέτρησης ³²P και υπολογίζεται η απόδοση της αντίδρασης σε cpm ανά μg DNA. Η απόδοση αναμένεται στο 35-50% της αρχικής ραδιενέργειας.
- Αναγωγή της ειδικής ραδιενέργειας στα ζεύγη νουκλεοτιδίων, ώστε να εξισωθεί η ειδική ραδιενέργεια στο φυσιολογικό και μεταλλαγμένο ειδικό νουκλεοτίδιο, που θα χρησιμοποιηθεί για υβριδισμό των φίλτρων.

Δ) Υβριδισμός του DNA που έχει μονιμοποιηθεί στην ημιπερατή μεμβράνη με ραδιενεργά σημασμένα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια

Ο υβριδισμός του DNA, ο σχηματισμός δηλαδή σταθερών υβριδίων DNA-ολιγονουκλεοτιδίων, εξαρτάται εκτός από το μήκος του ολιγονουκλεοτιδίου και τη σειρά των βάσεων, από την παρουσία αποσταθεροποιητικών παραγόντων, τη θερμοκρασία και την ιονική ισχύ του διαλύματος υβριδισμού. Η θερμοκρασία υβριδισμού είναι σημαντική, όταν η ιονική ισχύς του διαλύματος υβριδισμού παραμένει σταθερή. Η θερμοκρασία υβριδισμού προσδιορίζεται με βάση τη θερμοκρασία τήξης του ολιγονουκλεοτιδίου (T_m , melting temperature), τη θερμοκρασία δηλαδή στην οποία το 50% των μορίων του DNA βρίσκονται σε μονόκλινη μορφή και το άλλο 50% σε δίκλινη μορφή. Η θερμοκρασία υβριδισμού επιλέγεται να κυμαίνεται από 1 έως 3 βαθμούς κάτω του T_m .

Σημαντική είναι και η θερμοκρασία στην οποία γίνονται τα πλυσίματα μετά τον υβριδισμό, για το διαχωρισμό των υβριδίων που δεν έχουν απόλυτη

ομολογία στην αλληλουχία τους ενώ παραμένουν ενωμένα μόνο αυτά που είναι απολύτως συμπληρωματικά. Η θερμοκρασία κριτικού πλυσίματος επιλέγεται 2 βαθμούς πάνω από το T_m του ολιγονουκλεοτιδίου υβριδισμού.

Ο χρόνος υβριδισμού, που απαιτείται για τα ολιγονουκλεοτίδια, είναι μικρότερος από τον απαιτούμενο για άλλους ανιχνευτές, λόγω της μεγαλύτερης μοριακής συγκέντρωσης.

Αντιδραστήρια:

- 20X SSPE pH 7.4 (3.6M NaCl, 0.2M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 20 mM EDTA).
- Διάλυμα προϋβριδισμού - υβριδισμού: 5X SSPE, 5X Denhard's, 0.5% SDS. Για την παρασκευή ενός λίτρου υγρού υβριδισμού αναμειγνύονται: 1 gr Ficoll 400, 1 gr PVP 360, 1 gr BSA, 250 ml 20XSSPE, 50 ml 10% SDS και 700 ml απεσταγμένου νερού. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 37⁰ C.
- Διάλυμα προετοιμασίας και συντήρησης των φίλτρων : 6X SSC, 0.5% SDS.
- Διάλυμα πλυσιμάτων A: 2X SSPE, 0.1% SDS.
- Διάλυμα κριτικού πλυσίματος B: 5X SSPE, 0.1% SDS.
- Διάλυμα αποϋβριδισμού: 10mM Tris-HCl pH 8.0, 0.2% SDS.

Τεχνική:

- Τα φίλτρα εμβαπτίζονται στο διάλυμα προετοιμασίας επί 10' στη θερμοκρασία υβριδισμού. Τοποθέτηση των NI και Mt φίλτρων για υβριδισμό σε προθερμασμένα ραδιοσημασμένα ολιγονουκλεοτίδια για το φυσιολογικό και μεταλλαγμένο γονίδιο αντίστοιχα, στα ειδικά δοχεία στα οποία φυλάσσονται. Ο υβριδισμός διαρκεί τουλάχιστον 1 ώρα.
- Μετά το τέλος του υβριδισμού, οι μεμβράνες απομακρύνονται με λαβίδες από τα ραδιοσημασμένα ολιγονουκλεοτίδια, τα οποία φυλάσσονται για να επαναχρησιμοποιηθούν.
- Τα φίλτρα πλένονται με το διάλυμα A, με συνεχή ανακίνηση, τέσσερις φορές επί 10' για την απομάκρυνση των μη υβριδοποιημένων ολιγονουκλεοτιδίων.

-
- Ανακίνηση των φίλτρων με το διάλυμα B επί 15' ακριβώς, σε θερμοκρασία 2 βαθμούς μεγαλύτερη του T_m , για την απομάκρυνση των μη ειδικά συνδεδεμένων ολιγονουκλεοτιδίων.
 - Οι δύο μεμβράνες Mt και Ni ενώνονται και κλείνονται μέσα σε θήκη από πλαστικό χωρίς να στεγνώσουν και τοποθετούνται πάνω σε ακτινογραφικό φιλμ μέσα σε θήκη αυτοραδιογραφίας. Ο χρόνος έκθεσης εξαρτάται από το χρόνο ημιζωής του ραδιενεργού ολιγονουκλεοτιδίου και από την ποσότητα του προσδεμένου στο φίλτρο προϊόντος του PCR και κυμαίνεται από 15' έως 16 ώρες.
 - Τα ίδια φίλτρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για έλεγχο διαφορετικών μεταλλαγών, με απο-υβριδοποίηση ανάμεσα στους διαδοχικούς υβριδισμούς αρκεί να μην στεγνώσουν σε κάποια φάση της διαδικασίας. Ο απο-υβριδισμός επιτυγχάνεται με βρασμό επί 10-15' σε διάλυμα απο-υβριδισμού και διατήρηση της θερμοκρασίας στους 65^0 C επί 1 έως 2 ώρες.

E) Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Κάθε εξεταζόμενο δείγμα DNA τοποθετείται σε συμμετρικές θέσεις επί του φίλτρου, έτσι ώστε μετά το χωρισμό των φίλτρων σε Mt και Ni να υπάρχει η ίδια ποσότητα αρχικού δείγματος και στα δύο φίλτρα και να υβριδοποιούνται, τόσο με το φυσιολογικό όσο και με το μεταλλαγμένο ολιγονουκλεοτίδιο, για κάθε συγκεκριμένη μεταλλαγή. Η αμαύρωση του ακτινογραφικού φιλμ στην αντίστοιχη θέση αποτελεί απόδειξη παρουσίας μόνο της φυσιολογικής ή της μεταλλαγμένης αλληλουχίας (ομόζυγη κατάσταση) ή και των δύο (ετερόζυγη κατάσταση).

2.2.3.γ. Ανίχνευση της $-\alpha^{3.7}$ έλλειψης με εκλεκτικό ενζυμικό πολλαπλασιασμό του DNA (gap PCR)

Η διάγνωση γίνεται με διπλό PCR. Το ένα PCR αφορά στη φυσιολογική αλληλουχία ενώ το άλλο στην παρουσία $-\alpha^{3.7}$ έλλειψης διαπιστώνοντας τη δημιουργία του υβριδίου $\alpha_{2\alpha_1}$ λόγω του άνισου χιασμού.

Οι συνδυασμοί των εκκινητών που χρησιμοποιούνται είναι: $\alpha_2\text{prof} + \alpha_3$ για τη φυσιολογική αλληλουχία και $\alpha_2\text{prof} + \alpha_1\text{-126}$ για την παρουσία $-\alpha^{3.7}$ έλλειψης.

Αντιδραστήρια:

- Εξεταζόμενο DNA ως υπόστρωμα της αντίδρασης.
- Εκκινητές:
 - $\alpha_2\text{prof}$: 5'– CTT TCC CTA CCC AGA GCC AGG TT-3'
 - α_3 : 5'– CCA TTG TTG GCA CAT TCC GG-3' ($\alpha_2\text{-126 NI}$)
 - $\alpha_1\text{-126}$: 5'– GCT TGG CAC GTT TGC TGA GG-3' (Mt)
- Δεοξυνουκλεοτίδια (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) σε συγκέντρωση 100 mM.
- Ένζυμο Taq DNA πολυμεράση σε διάλυμα συντήρησης (50% γλυκερόλη, 20mM Tris-HCl pH 8, 0.1 mM EDTA, 1mM DTT, 200 μg/ml ζελατίνη με συγκέντρωση 5 μονάδες/μl).
- 10X διάλυμα εργασίας με σύσταση 166 mM Θειϊκό αμμώνιο $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.67 M Tris-HCl pH 8.4, 67 mM EDTA, 100 mM β-μερκαπτοαιθανόλη και 160 μg/ml BSA.
- Χλωριούχο μαγνήσιο MgCl_2 25mM.
- Dimethyl sulfoxide (DMSO).
- Απεσταγμένο, αποστειρωμένο νερό.
- Παραφινέλαιο.
- DNA του βακτηριοφάγου ΦX-174 το οποίο επωασμένο με ένζυμο περιορισμού Hae III αποδίδει τμήματα 1.35, 1.07, 0.87, 0.6, 0.31, 0.28, 0.27, 0.23, 0.19, 0.11 και 0.07 kb.

Τεχνική:

- Η αντίδραση έχει τελικό όγκο 100 μl. Σε σωληνάριο 0,5 ml (eppendorf) τοποθετούνται 0,5-1 μg DNA και προστίθενται 10 μl 10X διάλυμα εργασίας, 200 μM από έκαστο δεοξυνουκλεοτίδιο, 10% DMSO, 2.5 mM MgCl_2 , 50 pmols από κάθε εκκινητή και 2,5 μονάδες ενζύμου. Συμπληρώνουμε με νερό μέχρι τον τελικό όγκο αντίδρασης, αναμειγνύουμε ήπια, προσθέτουμε 2 σταγόνες παραφινέλαιου για να αποφευχθεί η εξάτμιση του υλικού και τοποθετούμε στον κυκλοποιητή.
- Η αντίδραση γίνεται σε αυτόματο θερμικό κυκλοποιητή (M.J. Research). Προγραμματισμός των θερμοκρασιών και των

απαιτούμενων χρόνων των τριών σταδίων της ενζυμικής αντίδρασης ως εξής: Αρχική αποδιάταξη στους 95° C επί 10' και 30 διαδοχικούς κύκλους με αποδιάταξη στους 95° C επί 3', αναδιάταξη στους 60° C επί 2' και επιμήκυνση στους 72° C επί 3'. Μετά την ολοκλήρωση των 30 κύκλων προγραμματίζουμε τελική επιμήκυνση στους 72° C επί 10' και συντήρηση στους 4° C.

- Το προϊόν της αντίδρασης ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2%, η οποία εμβαπτίζεται σε βρωμιούχο αιθίδιο. Παράλληλα ηλεκτροφορείται και DNA του βακτηριοφάγου ΦΧ-174 Hae III για τη σύγκριση του μεγέθους των ζωνών που εμφανίζονται. Το προϊόν της αντίδρασης φυλάσσεται στους -20° C για μεγάλο χρονικό διάστημα.

2.2.4. Αντιδραστήρια

Αγαρόζη τύπου Ι (Type Ι : Low EEO)	SIGMA
Αιθανόλη	BDH
Αιθυλενο-διαμινο-τετραοξεικό κάλιο (K ₃ EDTA)	MERCK
Αιθυλενο-διαμινο-τετραοξεικό νάτριο (Na ₂ EDTA)	MERCK
Αιθυλενο-διαμινο-τετραοξεικό οξύ (EDTA)	MERCK
Βόειος αλβουμίνη (BSA)	SIGMA
β-μερκαπτοαιθανόλη	SIGMA
Βορικό οξύ	MERCK
Βρωμιούχο αιθίδιο	SIGMA
Βρωμοφαινόλη μπλε	SIGMA
γ- ³² P ATP	AMERSHAM
Δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs)	INVITROGEN
Διθειοθρεϊτόλη (DTT)	BDH
Διμεθυλ-σουλφοξειδίο (DMSO)	BDH
DNA του βακτηριοφάγου ΦΧ-174 HaeIII	BRL
Δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH ₂ PO ₄)	MERCK
Δισόξινο φωσφορικό νάτριο (NaH ₂ PO ₄)	MERCK
Δωδεκακυλοθειϊκό νάτριο (SDS)	BDH
Ημιπερατή μεμβράνη	BIORAD
Θειϊκό αμμώνιο (NH ₄) ₂ SO ₄	MERCK
Καυστικό νάτριο (NaOH)	MERCK
Μεθανόλη	MERCK
Methyl violet (ιώδες του μεθυλίου) 6B	MERCK
Μονόξινο φωσφορικό νάτριο (Na ₂ HPO ₄)	MERCK
Νιτρώδες νάτριο (NaNO ₂)	MERCK

Όξινο ανθρακικό κάλιο (KHCO ₃)	BDH
Παραφινέλαιο	BDH
Polyvinyl-pyrrolidone (PVP-360)	SIGMA
Πρωτεΐνάση K	SIGMA
Saline-sodium citrate buffer (SSC buffer)	SIGMA
SSPE buffer	INVITROGEN
Στήλη ρητίνης Sephadex G-25	PHARMACIA
Συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (Mt,NI)	MWG
Taq DNA πολυμεράση	BRL
T ₄ πολυνουκλεοτιδική κινάση-αντίστ. διάλ. εργασίας ενζύμου	BIOLABS- BRL
Ficoll 400	PHARMACIA
Χλωριούχο αμμώνιο (NH ₄ Cl)	MERCK
Χλωριούχο μαγνήσιο (MgCl ₂)	BDH
Χλωριούχο νάτριο (NaCl)	MERCK
Χρωστική Giemsa	MERCK
Χρωστική May-Grünwald	MERCK
Υδροξυ-μεθυλ-μεθυλαμίνη (Tris)	BDH
Υδροχλωρικό οξύ (HCl)	SERVA
Εκκινητές (primers) :	MWG
α ₂ -κοινός εκκινητής : 5'-CTT TCC CTA CCC AGA GCC AGG TT-3' (α ₂ prof)	
α ₂ -ειδικός εκκινητής : 5'-CCA TTG TTG GCA CAT TCC GG-3' (α ₃ ή α ₂ -126)	
α ₁ -ειδικός εκκινητής : 5'-GCT TGG CAC GTT TGC TGA GG-3' (α ₁ -126)	
Ανιχνευτές (probes)	MWG
<i>IVS1 5' πεντανουκλεοτιδική έλλειψη</i>	
NI: 5'-GCC CTG GAG AGG TGA GGC T-3'	
Mt: 5'-AGG CCC TGG AGA GGC TCC C-3'	
<i>PolyA(TSaudi) μεταλλαγή (AATAAA>AATAAG)</i>	
NI: 5'-TGA ATA AAG TCT GAG TGG G-3'	
Mt: 5'-TGA ATA AGG TCT GAG TGG G-3'	
<i>PolyA μεταλλαγή (AATAAA>AATGAA)</i>	
NI: 5'-TGA ATA AAG TCT GAG TGG G-3'	
Mt: 5'-TGA ATG AAG TCT GAG TGG G-3'	

Hb Agrinio

NI: 5'-GAG GCC CTG GAG AGG TGA-3'

Mt: 5'-GAG GCC CCG GAG AGG TGA-3'

Hb Icaria

NI: 5'-CTC CAG CTT AAC GGT ATT T-3'

Mt: 5'-AAA TAC CGT AAA GCT GGA G-3'

2.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στη μελέτη αυτή όπως αναφέρθηκε η επιλογή του δείγματος έγινε με βάση γνωστές παραμέτρους αναφοράς με διαγνωστική αξία στον εντοπισμό των α^+ -θαλασσαιμικών φορέων όπως είναι οι μειωμένες τιμές των ερυθροκυτταρικών δεικτών MCV και MCH, οι φυσιολογικές τιμές σιδήρου και φερριτίνης στον ορό, οι φυσιολογικές τιμές HbA₂ και HbF και η παρουσία ενδοερυθροκυτταρικών εγκλείστων HbH. Σ' αυτές προστέθηκε η παρουσία ήπιων μορφολογικών ερυθροκυτταρικών αλλοιώσεων σε άτομα με φυσιολογικές τιμές ερυθροκυτταρικών δεικτών.

Μεταξύ των 58 επιλεγέντων ατόμων τα οποία πληρούσαν τα προαναφερθέντα κριτήρια πιθανής α^+ -θαλασσαιμίας, η διάγνωση επιβεβαιώθηκε, με DNA ανάλυση, σε 50 από αυτά δηλαδή σε ποσοστό 86,2%. Στα υπόλοιπα 8 άτομα δεν ανιχνεύθηκε α-γονιδιακή διαταραχή με τις τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν και οι οποίες ανιχνεύουν τις 6 πιο συχνές α^+ -θαλασσαιμικές διαταραχές που απαντώνται στον Ελληνικό πληθυσμό (πιν. 3).

Η $-\alpha^{3.7}$ έλλειψη ανιχνεύθηκε σε 29 άτομα (58%), η IVS1 5' πεντανουκλεοτιδική έλλειψη σε 17 άτομα (34%), η σημειακή μεταλλαγή 142 T>A (Icaria) σε 2 άτομα (4%) και η σημειακή μεταλλαγή Poly(A)TSaudi (AATAAA>AATAAG) σε ένα άτομο (2%). Βρέθηκε επίσης ένα άτομο ομόζυγο για την $-\alpha^{3.7}$ έλλειψη με φαινότυπο α^+ -θαλασσαιμίας ενώ δεν ανιχνεύθηκαν σε κανένα άτομο η μεταλλαγή σήματος Poly(A) (AATAAA>AATGAA) και η σημειακή μεταλλαγή 29 T>C (Agrinio) (πιν. 4).

Πίνακας 3. Αιματολογικές παράμετροι και γονότυποι των εξετασθέντων ατόμων

Ηλικία	Φύλο	RBCs (x10 ⁶ /μl)	Hb (g/dl)	MCV (fl)	MCH (pg)	Μορφολογία ερυθροκυττάρων	Ε.Μ.Ε	Ε.Χ.Ε	HbA ₂ (%)	HbF (%)	Ferritin (ng/ml)	Fe (μg/dl)	α-γονότυπος
45	F	4.73	12.4	81.8	26.2	AK+, YX+, ΠΚ±, ΣΚ+	+	-	2.30	0.0	32.0	122.0	¹ α ^{Hph} /αα
29	F	5.23	13.7	79.5	26.3	MK+, AK+, YX+, ΠΚ±	+	-	2.90	0.0	20.0	59.0	² -α ^{3.7} /αα
40	M	5.61	15.2	83.9	27.1	MK±, ΠΚ±	+	-	3.10	0.0	101.0	106.0	-α ^{3.7} /αα
35	M	5.55	13.9	78.7	25.0	MK++, AK+, YX++, AX+	+	-	2.80	0.0	99.0	87.0	α ^{Hph} α/αα
36	F	5.39	13.8	79.3	25.5	MK++, AK+, YX+, ΠΚ±, ΣΚ±	+	-	2.70	0.0	19.0	56.0	α ^{Hph} α/αα
31	M	5.28	13.2	76.5	25.0	MK+, AK+, YX+, ΠΚ±, ΒΣ+	+	-	2.50	0.0	23.0	66.0	-α ^{3.7} /αα
24	F	5.12	12.8	77.7	25.0	MK++, AK+, YX++, ΠΚ±	+	-	2.80	0.7	19.0	51.0	-α ^{3.7} /αα
34	M	5.85	15.5	82.0	26.5	MK±, AK+, ΣΚ+	+	-	2.70	0.0	44.0	60.0	-α ^{3.7} /αα
55	M	5.93	15.3	78.1	25.8	MK+, AK+, YX+, ΠΚ±	+	-	2.50	0.0	35.0	104.0	α ^{Hph} α/αα
16	M	5.27	14.2	81.5	26.9	MK+, AK+, ΠΚ±, AX+	+	-	3.10	0.0	31.0	95.0	-α ^{3.7} /αα
25	F	4.99	13.3	80.7	26.6	AK+, YX±, ΠΚ±	+	-	2.50	0.0	24.0	103.0	-α ^{3.7} /αα
40	M	6.07	15.3	77.1	25.3	MK+, AK+, YX+, ΣΚ+	+	-	2.80	0.0	84.0	100.0	α ^{Hph} α/αα
17	M	6.28	15.9	77.8	25.2	MK++, AK+, ΠΚ+	+	-	2.90	0.0	29.0	82.0	-α ^{3.7} /αα
25	M	5.37	14.6	83.2	27.3	MK±, AK+, ΠΚ±	+	-	2.30	0.0	84.0	95.0	-α ^{3.7} /αα
40	F	4.79	12.7	79.8	26.5	MK+, AK+, YX+, ΠΚ+	+	-	2.80	0.0	18.0	57.0	α ^{Hph} α/αα
18	M	5.36	13.4	76.9	25.1	MK++, AK+, YX+, ΠΚ±	+	-	2.90	0.0	34.0	124.0	α ^{Hph} α/αα
49	M	5.25	14.3	83.0	27.3	MK±, AK+, ΣΚ±	+	-	2.50	0.0	93.0	114.0	-α ^{3.7} /αα
11	F	4.85	12.9	81.7	26.6	MK+, AK+, YX+, ΠΚ±	+	-	2.60	0.0	30.3	58.0	-α ^{3.7} /αα
49	M	5.24	15.0	87.0	28.6	AK+, ΠΚ±	+	-	2.60	0.3	90.0	114.0	-α ^{3.7} /αα
13	F	4.82	12.1	80.2	25.0	MK+, AK+, YX+, ΠΚ±	+	-	2.50	0.0	22.8	57.0	α ^{Hph} α/αα
17	M	5.64	14.3	78.3	25.3	MK+, AK+, YX+	+	-	1.80	0.9	55.2	63.0	³ α ^{Ic} α/αα
66	M	4.28	11.1	80.5	25.9	MK+, AK+, YX+, ΠΚ±	+	-	2.80	0.0	145.0	87.0	α ^{Hph} α/αα
30	F	4.72	12.8	84.2	27.2	MK+, AK+, ΠΚ±	+	-	2.40	0.6	45.0	91.0	α ^{Ic} α/αα
23	M	5.60	14.2	78.5	25.3	MK++, AK+, YX+, ΠΚ±	+	-	3.00	0.7	130.0	73.0	α ^{Hph} α/αα
36	M	5.42	14.4	83.6	26.6	AK+, ΠΚ±	+	-	2.70	0.0	117.7	95.0	-α ^{3.7} /αα
30	F	4.23	11.3	78.7	26.8	MK++, AK+, YX+, ΠΚ±	+	-	2.40	0.9	41.5	83.0	-α ^{3.7} /αα
20	F	4.42	11.6	76.9	26.2	MK++, AK+, YX+, ΠΚ+	+	-	2.90	0.0	17.1	77.0	α ^{Hph} α/αα
34	M	4.59	13.5	85.5	29.5	AK+, ΠΚ±	+	-	3.00	0.0	154.4	66.0	-α ^{3.7} /αα
27	F	4.43	12.1	83.2	27.4	AK+, ΠΚ±	+	-	1.90	0.4	37.2	82.0	-α ^{3.7} /αα
35	F	4.98	12.8	77.4	25.8	MK+, AK+, YX+, ΠΚ±	+	-	2.70	0.5	17.1	74.0	α ^{Hph} α/αα
22	F	4.44	11.3	77.5	25.6	MK+, AK+, YX+, ΠΚ±	+	-	2.70	0.0	18.3	85.0	α ^{Hph} α/αα
52	M	5.16	13.5	78.9	26.2	MK+, AK+, YX+, ΣΚ+, ΠΚ±	+	-	2.60	0.0	51.7	79.0	-α ^{3.7} /αα ^{3.7}
42	F	4.79	12.5	81.6	26.2	MK+, AK+, YX+, ΠΚ±	+	-	2.80	0.5	33.1	59.0	-α ^{3.7} /αα
27	M	5.67	15.0	81.9	26.5	MK+, AK+, YX+, ΠΚ±	+	-	2.80	0.4	104.7	107.0	α ^{Hph} α/αα
36	F	4.74	12.8	82.4	26.9	MK±, AK+, YX+, ΠΚ±	+	-	2.80	0.8	21.7	116.0	⁴ α ^{TSaudi} α/αα
15	M	5.16	13.5	79.1	26.1	MK++, AK+, YX+, ΠΚ+	+	-	2.20	0.6	31.1	111.0	-α ^{3.7} /αα
24	F	4.62	11.7	78.5	25.3	MK+, AK+, YX+, ΠΚ±	+	-	3.00	0.0	17.0	56.0	α ^{Hph} α/αα
34	M	5.76	16.0	85.9	27.8	MK+, AK+, YX±	+	-	2.20	0.0	74.0	75.0	-α ^{3.7} /αα
57	M	5.53	14.9	80.2	27.0	AK+, ΠΚ±	+	-	2.50	0.0	98.7	75.0	-α ^{3.7} /αα
14	M	5.12	13.5	79.3	26.3	MK+, AK+, YX+, ΠΚ±	+	-	2.40	0.0	40.1	67.0	-α ^{3.7} /αα
23	F	4.35	12.1	83.9	27.9	AK+, ΠΚ±	+	-	2.90	0.7	17.9	66.0	-α ^{3.7} /αα
21	F	4.26	11.7	82.2	27.4	AK+, YX±, ΠΚ±, ΣΚ+	+	-	2.20	0.0	24.4	52.0	-α ^{3.7} /αα
68	F	4.98	14.0	85.1	28.1	AK+, ΠΚ±, ΣΚ+	+	-	2.80	0.5	19.0	56.0	-α ^{3.7} /αα
31	M	5.04	13.9	83.3	27.5	MK±, AK+, ΠΚ±, ΣΚ+	+	-	2.80	0.5	114.0	129.0	-α ^{3.7} /αα
27	M	5.31	14.6	82.2	27.5	MK±, AK+, ΠΚ±	+	-	2.70	0.4	160.0	67.0	-α ^{3.7} /αα
50	M	4.71	13.9	89.6	29.5	AK+, ΠΚ±	+	-	2.60	1.8	291.8	130.0	-α ^{3.7} /αα
42	M	4.74	12.6	81.5	26.6	MK±, AK+, YX±, ΠΚ±	+	-	2.90	0.0	85.9	69.0	α ^{Hph} α/αα
42	F	4.89	13.3	83.2	27.3	MK+, AK+, YX±	+	-	2.40	0.0	25.9	117.0	-α ^{3.7} /αα
34	M	5.46	14.5	80.7	26.5	AK+, ΠΚ±	+	-	2.90	0.0	82.4	64.0	α ^{Hph} α/αα
39	M	4.88	13.0	82.5	26.7	MK+, AK+, YX+, ΠΚ±, ΣΚ+	+	-	3.20	0.8	23.9	66.0	-α ^{3.7} /αα
31	F	5.92	15.0	76.7	25.4	MK+, AK+, YX++, ΠΚ±	+	-	2.90	1.0	72.0	121.0	-
30	M	6.10	15.5	78.8	25.4	MK+, AK++, YX+, ΠΚ±	+	-	3.30	2.0	61.3	69.0	-
13	M	4.89	12.9	79.6	26.4	MK+, AK++, YX+, ΠΚ+	+	-	3.20	0.0	35.5	74.0	-
14	F	4.57	11.6	77.3	25.3	MK+, AK+, YX±, ΠΚ±	+	-	2.70	0.5	21.2	57.0	-
24	F	4.53	12.4	82.6	27.4	MK+, AK+, YX±, ΠΚ±	+	-	3.20	0.0	20.5	84.0	-
51	M	5.47	16.4	91.6	29.9	AK+, ΣΚ+, ΠΚ±	+	-	2.90	1.4	103.4	127.0	-
19	F	4.53	12.4	82.1	27.4	AK+, ΠΚ±	+	-	2.50	0.8	17.5	75.0	-
28	F	4.49	12.4	82.4	27.5	MK±, AK+, ΠΚ±	+	-	2.70	0.0	23.7	61.0	-

MK: Μικροκυττάρωση, **AK:** Ανισοκυττάρωση, **ΠΚ:** Ποικιλοκυττάρωση, **YX:** Υποχρωμία, **AX:** Ανισοχρωμία, **ΣΚ:** Στοχοκυττάρωση, **ΒΣ:** Βασεόφιλη στίξη, **Ε.Μ.Ε:** Έγκλειστα με επώαση, **Ε.Χ.Ε:** Έγκλειστα χωρίς επώαση

¹α^{Hph}: IVS1 5' πεντανουκλεοτιδική έλλειψη

²-α^{3.7}: -α^{3.7} έλλειψη

³α^{Ic}: μεταλλαγή στο κωδικόνιο λήξης (T>A) (Icaria)

⁴α^{TSaudi}: μεταλλαγή σήματος PolyA (AATAAA>AATAAG)

Πίνακας 4. Γονότυποι των διαγνωσθέντων ατόμων

α-γονότυπος	N=50	%
$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	29	58
$\alpha^{\text{Hph}}\alpha/\alpha\alpha$	17	34
$\alpha^{\text{Ic}}\alpha/\alpha\alpha$	2	4
$\alpha^{\text{TSaudi}}\alpha/\alpha\alpha$	1	2
$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$	1	2
$\alpha^{\text{Agr}}\alpha/\alpha\alpha$	–	–
$\alpha^{\text{PA;4A>G}}\alpha/\alpha\alpha$	–	–

$-\alpha^{3.7}$: $-\alpha^{3.7}$ έλλειψη

α^{Hph} : IVS1 5' πεντανουκλεοτιδική έλλειψη

α^{Ic} : μεταλλαγή στο κωδικόνιο λήξης 142 (T> A) (Icaria)

α^{TSaudi} : Poly(A) μεταλλαγή σήματος (AATAAA > AATAAG) or Poly(A)TSaudi

α^{Agr} : μεταλλαγή στο κωδικόνιο 29 (T> C) (Agrinio)

$\alpha^{\text{PA;4A>G}}$: Poly(A) μεταλλαγή σήματος (AATAAA > AATGAA)

2.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

2.4.1. Συζήτηση

Αν και η α^+ -θαλασσαιμία δεν αποτελεί αυτή καθαυτή σοβαρό πρόβλημα, η επίδρασή της μπορεί να είναι σημαντική όταν συνδυαστεί με άλλες ερυθροκυτταρικές διαταραχές. Στην Ελλάδα η συχνότητα της α^+ -θαλασσαιμίας υπολογίζεται σε 7,05% του πληθυσμού¹⁴. Μια από τις συχνότερες γενετικές διαταραχές που οδηγεί σε α^+ -θαλασσαιμία στη χώρα μας είναι η έλλειψη ενός εκ των τεσσάρων α -γονιδίων¹⁷. Αυτή η διαταραχή δεν συνοδεύεται από σοβαρά αιματολογικά ευρήματα επειδή συνδέεται με μια αντιρροπιστική αύξηση της σύνθεσης α -σφαιρινικών αλυσίδων από τα τρία εναπομείναντα σε λειτουργία α -γονίδια⁷¹ και συχνά αναγνωρίζεται για πρώτη φορά σε γονείς οι οποίοι αποκτούν παιδιά με Hb/πάθεια H⁷². Η Hb/πάθεια H αρχικά θεωρήθηκε καλοήθης αλλά πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η φυσική ιστορία της νόσου παραμένει ακόμη άγνωστη και φαίνεται να είναι σημαντική

στη νεογνική και παιδική ηλικία καθώς επίσης και κατά τη διάρκεια της κύησης⁷³. Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι πολλοί ασθενείς έχουν σπληνομεγαλία, οστεοπενία, ανάγκη μετάγγισης αίματος και υπερφόρτωση με σίδηρο, όχι απαραίτητα σχετιζόμενη με τον αριθμό των μονάδων μετάγγισης που έχουν λάβει⁷⁴.

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό στοιχείο στη διάγνωση της α -θαλασσαιμίας είναι η περίσσεια β -σφαιρινικών αλυσίδων που προκύπτει από τη μειωμένη σύνθεση των α -σφαιρινικών αλυσίδων και μπορεί να γίνει ορατή με τον σχηματισμό ενδοερυθροκυτταρικών εγκλείστων HbH μετά από επώαση των ερυθροκυττάρων παρουσία οξειδωτικού παράγοντα και χρώση. Στην περίπτωση της α^+ -θαλασσαιμίας απαιτείται ο έλεγχος μεγάλου αριθμού ερυθροκυττάρων και η εμπειρία του παρατηρητή για την ανίχνευση εγκλείστων HbH, δεδομένου ότι αυτά είναι σπάνια. Αρκετές μέθοδοι προτάθηκαν για την ανίχνευση των εγκλείστων HbH στους φορείς α -θαλασσαιμίας με διαφορετικά μεταξύ τους αποτελέσματα ανάλογα με τον ελεγχόμενο πληθυσμό και τα κριτήρια επιλογής του δείγματος^{13,75,76,77}. Σε γενικές γραμμές τα κριτήρια επιλογής ήταν η μικροκυττάρωση, η απουσία σιδηροπενίας και τα φυσιολογικά χρωματογραφικά ευρήματα ενώ η χρώση επιλογής συνήθως ήταν η χρώση με brilliant cresyl-blue (BCB).

Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια να αυξηθεί η ευαισθησία και η ειδικότητα αυτών των μεθόδων, με την αξιολόγηση των ήπιων μορφολογικών ερυθροκυτταρικών αλλοιώσεων σε άτομα ακόμα και με φυσιολογικούς ερυθροκυτταρικούς δείκτες (προκειμένου αυτά να ελεγχθούν για έγκλειστα HbH) και την επιλογή της χρώσης methyl violet πριν και μετά επώαση παρουσία οξειδωτικού παράγοντα (για την ανίχνευση και διάκριση των εγκλείστων των α -θαλασσαιμικών φορέων από άλλα ενδοερυθροκυτταρικά έγκλειστα).

Στον Ελληνικό χώρο όπως αναφέρεται αναλυτικά στο Γενικό μέρος οι πιο συχνές α^+ -θαλασσαιμικές διαταραχές είναι η $-\alpha^{3.7}$ έλλειψη, η Poly(A)Tsaudi μεταλλαγή, η IVS1 5' πεντανουκλεοτιδική έλλειψη, η Poly(A) (AATAAA>AATGAA) μεταλλαγή, η HbAgrinio και η HbIcaria. Αυτές οι διαταραχές περιελήφθησαν στον έλεγχο των δειγμάτων μας με γονιδιακή ανάλυση.

2.4.2. Συμπεράσματα

Από την εργασία αυτή προκύπτουν τα παρακάτω συμπεράσματα.

- Η παρουσία ήπιων μορφολογικών αλλοιώσεων σε άτομα με οριακές ή φυσιολογικές τιμές ερυθροκυτταρικών παραμέτρων αποτελεί σημαντικό στοιχείο στη διαγνωστική προσέγγιση των α^+ -θαλασσαιμικών φορέων και θα πρέπει να συναξιολογείται με τα υπόλοιπα ευρήματα.
- Η περιγραφείσα μεθοδολογία παρέχει τη δυνατότητα ανίχνευσης α^+ -θαλασσαιμικών φορέων οι οποίοι θα δίνονταν αρνητικοί για θαλασσαιμική διαταραχή (στη μελέτη μας ποσοστό 24%). Εάν χρησιμοποιηθεί επομένως για τον υπολογισμό της συχνότητας των α -θαλασσαιμικών φορέων πιθανόν να αποδειχθεί περισσότερο ευαίσθητη σε σχέση με προηγούμενα περιγραφείσες μεθόδους.

2.4.3. Τελικό συμπέρασμα

Η αρχική πιθανή διάγνωση α^+ -θαλασσαιμίας επιβεβαιώθηκε με μοριακή ανάλυση σε ποσοστό 86,2% των εξετασθέντων ατόμων. Επομένως η περιγραφείσα στην παρούσα εργασία μεθοδολογία για τη διαγνωστική προσέγγιση των α^+ -θαλασσαιμικών φορέων μπορεί να προταθεί ως ένας χρήσιμος screening έλεγχος σε Εργαστήρια ρουτίνας προκειμένου να επιλεγούν τα άτομα που χρειάζονται παραπέρα έλεγχο για επιβεβαίωση της διάγνωσης με εξειδικευμένες τεχνικές.

2.5. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

(*Int. Jnl. Lab. Hem. 2007, 29, 45-51*)

Title:

An improved method for the diagnostic approach of α^+ -thalassaemia

Authors:

Z.Repapinou¹, Ph.Karababa², M.Boussiou², V.Kafarakis¹, H.A. Papadaki¹, D.Mavroudis¹, .D.Eliopoulos¹, A.Loutradi-Anagnostou²

Running title: α^+ -thalassaemia in subjects of Cretan origin

Institutions:

¹ Haematology Laboratory, University Hospital of Heraklion, Heraklion, Crete, Greece

² National Thalassaemia Center, Laiko General Hospital of Athens, Greece

Correspondence:

Zoe Repapinou, MD, Haematology Laboratory, University Hospital of Heraklion, Crete, Greece

Tel. +30 2810 392.727, Fax. +30 2810 392.584

E-mail: repapinou@in.gr

(Haema 2006; 9 (6):783-788)

Title:

α -Thalassaemia carriers in Crete: haematological and
molecular study

Authors:

Z.Repapinou¹, Ph.Karababa², I.Neonakis¹, M.Boussiou², H.A.
Papadaki¹, D.Mavroudis¹, G.D.Eliopoulos¹, A.Loutradi-Anagnostou²

Running title: α -thalassaemia in the Cretan population

Institutions:

¹ Haematology Laboratory, University Hospital of Heraklion, Heraklion,
Crete, Greece

² National Thalassaemia Center, Laiko General Hospital of Athens, Greece

Correspondence:

Zoe Repapinou, MD, Haematology Laboratory, University Hospital of
Heraklion, Voutes, 71110, Crete, Greece

tel. +30 2810 392.727, fax. +30 2810 392.584

e-mail: repapinou@in.gr

3. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Wintrobe M. M. (1981) Clinical Hematology. 8th edn. Lea and Febiger, Philadelphia.
2. Weatherall D.J. & Clegg, J.B. (2001) The Thalassemia Syndroms. 4th edn. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
3. Williams W.J., Beutler E., Erslev A.J. & Lichtman M.A. (1991) Hematology. 4th edn. McGraw-Hill Publishing Company, New York.
4. Haldane J.B.S. (1949) The rate of mutation of human genes. Proc. VIII Int. Cong. Genet. Hereditas, 35:367
5. Higgs, D.R. (2001) Molecular mechanisms of α -thalassemia. In: Disorders of Hemoglobin; Genetics, Pathophysiology and Clinical Management (ed. By M.H. Steinberg, B.G. Forget, D.R. Higgs & R.I. Nagel), pp. 405-430. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
6. Higgs D.R., Vickers MA, Wilkie A.O.M. et al. (1989) A review of the molecular genetics of the human α -globin gene cluster. Blood, 73: 1081
7. Wilkie A.O.M., Buckle V.J., Harris P.C. et al. (1990) Clinical features and molecular analysis of the α -thalassemia / mental retardation syndromes. I. Cases due to deletions involving chromosome band 16p13.3. Am J Hum Genet, 46: 1112
8. Wilkie A.O.M., Zeitlin H.C., Lindenbaun R. H. et al. (1990) Clinical features and molecular analysis of the α -thalassemia / mental retardation syndromes. II. Cases without detectable abnormality of the α -globin complex. Am J Hum Genet, 46: 1127

-
9. Bennett J..M., Catovsky D., Daniel M.T. et al. (1982) Proposals for the classification on the myelodysplastics syndromes. *Br J Haematol*, 51: 189
 10. Fessas P. (1961) Haemoglobin H and Bart's. In Lehmann, H., Betke, K. (eds): "Haemoglobin Colloquium". Stuttgart: George Thieme Verlag, p. 74
 11. Malamos B., Fessas P. & Stamatoyannopoulos G. (1962) Types of thalassaemia trait carriers as revealed by a study in their incidence in Greece. *Br J Haematol*, 8: 5
 12. Fraser G. R., Stamatoyannopoulos G., Kattamis C. et al. (1964) Thalassemiab abnormal hemoglobins and glyucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the Arta area of Greece: diagnosis and genetic aspects of complete village studies. *Ann NY Acad Sci*, 119: 415
 13. Anagnostou A., Tassiopoulou A., Rombos J. et al. (1987) alpha-Thalassaemia in Greece; carrier identification and frequency. *Thalassaemia Today. The Mediterranean experience* (ed. by Sirchia G. and Zanella A). Centro Transfusionale Ospedale Maggiore Polyclinico di Milano Editore. Milano, p. 377
 14. Kanavakis E., Tzotzos S., Liapaki A. et al. (1986) Frequency of α -Thalassemia in Greece. *Am J Hematol*, 22: 225
 15. Tzotzos S., Kanavakis E., Metaxotou-Mavromati A. et al. (1986) The molecular basis of Hb H in Greece. *Br J Haematol*, 63(2): 263
 16. Traeger-Synodinos J., Kanavakis E., Tzetis M. et al. (1993) Characterization of nondeletion alpha-thalassaemia mutations in the Greek population. *Am J Hematol*, 44(3): 162

-
17. Karababa Ph. (2000) Study of structure, pathophysiology and genetics of α -Thalassemia syndromes in the population of Greece. Ph.D thesis, Athens.
 18. Embury S.H., Miller J.A., Dozy A.M. et al. (1980) Two different molecular organizations account for the single α -globin gene of the α -thalassemia-2 genotype. J Clin Invest, 66: 1319
 19. Lemuel J. Bowie, Poluru L. Reddy, Moolky Nagaphushan et al. (1994) Detection of α -thalassemias by multiplex polymerase chain reaction. Clin Chem 40/12: 2260
 20. Pressley L., Higgs D.R., Clegg J.B. et al. (1980). Gene deletions in α -Thalassaemia prove that the 5' ζ locus is functional. Proc Natl Acad Sci USA, 77: 3586
 21. Nicholls R.D., Higgs D.R., Clegg J.B. et al. (1985) α^0 -Thalassemia due to recombination between the α_1 -globin gene and an Alu I repeat. Blood, 65: 1434
 22. Orkin S.H., Goff S.C. & Hechtman R.L. (1981). Mutation in an intervening sequence splice junction in man. Proc Natl Acad Sci USA, 78: 5041
 23. Thein S.L., Wallase R.B., Pressley L. et al. (1988) The polyadenylation site mutation in the alpha-globin gene cluster. Blood, 71 (2): 313
 24. Pressley L., Higgs D.R., Clegg J.B. et al. (1980). A new genetic basis for hemoglobin-H disease. N Eng J Med, 303: 1383
 25. Yuregir G.T., Aksoy K., Curuk M.A. et al. (1992) Hb H disease in a Turkish family resulting from the interaction of a deletional α -

-
- Thalassemia-1 and a newly discovered poly-A-mutation. Br J Haematol, 80: 527
26. Hall G.W., Thein S.L., Newland A.C. et al. (1993) A base substitution (T→C) in codon 29 of the α_2 -globin gene causes α -thalassaemia. Br J Haematol, 85: 546
27. Clegg J.B., Whaetherall D.J., Contopoulou-Griva I. et al. (1974) Hemoglobin Icaria, a new chain termination mutant which causes α -thalassemia. Nature, 251: 245
28. Efremov G.D., Josifovska O., Nikolov N. et al. (1990) Hb Icaria-Hb H disease: Identification of the Hb Icaria mutation through analysis of amplified DNA. Br J Haematol, 75: 250
29. Loukopoulos D. (1991) Thalassemia: genotypes and phenotypes. Ann Hematol, 62: 85
30. Liebhaber, S.A. (1989) α -Thalassemia. Hemoglobin, 13: 685
31. Lacerra G., Fioretti G., De Angioletti M. et al. (1991) (α) $\alpha^{5.3}$ a novel α^+ -thalassemia deletion with the breakpoints in the α_2 -globin gene and in close proximity to an Alu family repeat between the $\psi\alpha_2$ - and $\psi\alpha_1$ -globin genes. Blood, 78: 2740
32. Kulozik A.E., Kar B.L., Serjeant B.E. et al. (1988) The molecular basis of α -thalassemia in India. Its interaction with the sickle cell gene. Blood. 71: 467
33. Zhao JB, Zhao L, Fei YJ, Liu JC & Huisman THJ (1991) A novel α -thalassemia-2 (-2.7 Kb) observed in a Chinese patient with HbH disease. Am J Hematol, 38: 248

-
34. Kan Y.W., Dozy A.M., Trecartin R. et al. (1977) Identification of a nondeletion defect in α -thalassemia. *N Eng J Med*, 297: 1081
35. Hartevelde C.L., Heister J.G.A.M., Giordano P.C. et al. (1996) An IVS-1-116 (A→G) acceptor splice site mutation in the α_2 -globin gene causing α^+ -thalassemia in two Dutch families. *Br J Haematol*, 95: 461
36. Çürük M.A., Baysal E., Gupta R.B et al. (1993) An IVS-1-117 (G→A) acceptor splice site mutation in the α_1 -globin gene is α -thalassemia-2 determinant a non deletional in an Indian population. *Br J Haematol*, 85: 148
37. Hartevelde C.L., Losekoot M., Haak H. et al. (1994) A novel polyadenylation signal mutation in the α_2 -globin gene causing α -thalassaemia . *Br J Haematol*, 87: 139
38. Hall G.W., Higgs D.R., Murphy P., et al. (1994) A mutation in the polyadenylation signal of the α_2 -globin gene (AATAAAA→AATA--) as a cause α -thalassaemia in Asian Indians. *Br J Haematol*, 88: 225
39. Tamary H., Klinger G., Shalmon L. et al. (1997) α -Thalassemia caused by a 16 nt deletion in the 3' untranslated region of the α_2 -globin gene including the first nucleotide of the polyA signal sequence. *Hemoglobin*, 21: 121
40. Olivieti N.F., Chang L.S., Poon A.O. et al. (1987) An α -globin gene initiation codon mutation in a Black family with HbH disease. *Blood*, 70: 729
41. Morlé F., Lopez B., Henni T. et al. (1985) α -Thalassaemia associated with the deletion of two nucleotides at position -2 and -3 preceding the AUG codon. *EMBO J*, 4: 1245

-
42. Pirastu M., Saglio G., Chang J.C. et al. (1984) Initiation codon mutation as a cause of α -thalassemia. *J Biol Chem*, 259: 12315
43. Paglietti E., Galanello R., Moi P. et al. (1986) Molecular pathology of haemoglobin H disease in Sardinians. *Br J Haematol*, 63: 485
44. Moi P., Cash F.E., Liebhaber S.A. et al. (1987) An initiation codon mutation (AUG→GUG) of the human α_1 -globin gene: structural characterization and evidence for a mild thalassemia phenotype. *J Clin Invest* 80: 1416
45. Waye J.S., Eng B., Patterson M. et al. (1996) Novel mutation of the α_2 -globin gene initiation codon (ATG→A-G) in a Vietnamese girl with HbH disease. *Blood*, 88: 28
46. Liebhaber S.A., Coleman M.B., Adams J.G.I. et al. (1987) Molecular basis for non deletion α -thalassemia in American blacks α_2^{116} GAG→UAG. *J Clin Invest*, 80: 154
47. Safaya S. & Rieder R.F. (1988) Dysfunctional α -globin gene in hemoglobin H disease in blacks. *J Biol Chem*, 263: 4328
48. Clegg J.B., Weatherall D.J. & Milner P.F. (1971) Haemoglobin Constant Spring- a chain termination mutant? *Nature*, 234: 337
49. Clegg J.B., Weatherall D.J., Contopoulos-Griva I. et al. (1974) Haemoglobin Icaria, a new chain termination mutant which causes α -thalassaemia. *Nature*, 251: 245
50. de Jong W.W, Khan P.M. & Bernini L.F. (1975) Hemoglobin Koya Dora : High frequency of a chain termination mutant. *Am J Hum Genet*, 27: 81

-
51. Bradley T.B., Wohl R.C. & Smith G.J. (1975) Elongation of the α -globin chain in a black family: interaction with HbG Philadelphia. Clin Res 23: 1314
52. Waye J.S., Eng B., Patterson M. et al. (1994) Identification of a novel termination codon mutation (TAA \rightarrow TAT, Term \rightarrow Tyr) in the α_2 globin gene of a Laotian girl with Hemoglobin H disease. Blood, 83: 3418
53. Honig G.R., Sumsuddin M., Vida L.N. et al. (1984) Hemoglobin Evaston ($\alpha^{14\text{Trp}\rightarrow\text{Arg}}$): an unstable variant expressed as α -thalassemia. J Clin Invest, 73: 1740
54. Goossens M., Lee K.Y., Liebhaber S.A. et al. (1982) Globin structural mutant $\alpha^{125\text{Leu}\rightarrow\text{Pro}}$ α is a novel cause of α -thalassemia. Nature, 296: 864
55. Sanguanserm Sri T., Matragoon S., Changloah L. et al. (1979) Hemoglobin Suan Dok ($\alpha_2^{109\text{Leu}\rightarrow\text{Arg}}$ β_2): an unstable variant associated with α -thalassemia. Hemoglobin, 3: 161
56. Benesch R.E., Ranney H.M., Benesch R. et al. (1961) The chemistry of the Bohr effect. II. Some properties of hemoglobin H. J Biol Chem, 236: 2926.
57. Chui D.H.K. (2005) Alpha-thalassaemia and population health in Southeast Asia. Annals of Human Biology, 32(2): 123
58. Papadea C. & Cate J.C. (1996). Identification and quantification of haemoglobins A, F, S and C by automated chromatography. Clinical Chemistry, 42 (1): 57

-
59. Clarke G.M. & Higgins T.N. (2000) Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias : Review and update. *Clinical Chemistry*, 46: 1285
60. Lewis S.M., Bain B.J. & Bates I. (2001) *Dacie and Lewis Practical Haematology*. 9th edn. Churchill Livingstone, New York, 2001, p. 12
61. Hartevelde C.L., Heister A.J.G.A.M., Giordano P.C. et al. (1996) Rapid detection of point mutations and polymorphisms of the α -globin genes by DGGE and SSCA. *Human Mutation*, 7: 114
62. Maxam A.M. & Gilbert W. (1977) A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74: 560
63. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. et al. (1977) DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74: 5463
64. Fessas Ph. (1963) Inclusions of hemoglobin in erythroblasts and erythrocytes of thalassemia. *Blood*, 21: 21
65. Miller S.A, Dykes D.D. & Polesky H.F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acids Res* 16: 1215
66. Mullis K & Faloona F. (1987). In: *Methods in Enzymology* Vol. 155: 335 Academic Press N.Y- London.
67. Saiki R., Bugawan T., Horn G. et al. (1986) Analysis of enzymatically amplified β -globin and HLA-DQ α DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature*, 324: 163

-
68. Chien A., Edgar D. & Trela J. (1976). Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol*, 127: 1550
69. Erlich H.A. (1991) PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification. Stockton Press.
70. Chaconas G. & Sande J.H. (1980) 5' ³²P labeling of RNA and DNA restriction fragments. *Methods in enzymology, Nucleic Acids Academic, New York*, 65: 75
71. Liebhaber S.A, Cash F.E. & Main D.M. (1985) Compensatory increase in α_1 -globin gene expression in individuals heterozygous for the α -thalassemia 2 deletion. *J Clin Invest*, 76: 1057
72. Hoffman R., Benz E.J. Jr., Shattil S.J. et al. (1991) *Hematology: Basic Principles and Practice*. Churchill Livingstone, New York.
73. Chui D.H.K., Fucharoen S. & Chan V. (2003) Hemoglobin H disease: Not necessarily a benign disorder. *Blood*, 101: 791
74. Chen F.E., Ooi C., Ha S.Y. et al. (2000) Genetic and clinical features of haemoglobin H disease in Chinese patients. *N Eng J Med*, 343: 544
75. Chan A.Y., So C.K. & Chan L.C. (1996) Comparison of the HbH inclusion test and a PCR test in routine screening for alpha thalassemia in Hong Kong. *J Clin Pathol*, 49: 411
76. Junca J., Ride J., Tuset E. et al. (1993) Correlation of hemoglobin H inclusion bodies with genotype alpha-thalassemia. *Arch Pathol Lab Med*, 117: 965

77. Skorgeboe K.J, West S.F., Smith C. et al. (1992) Screening for alpha-thalassemia. Correlation of hemoglobin inclusion bodies with DNA-determined genotype. Arch Pathol Lab Med, 116: 101

4. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μελετήσαμε με DNA ανάλυση 58 πιθανούς α^+ -θαλασσαιμικούς φορείς οι οποίοι επελέγησαν με κριτήρια α) την παρουσία ήπιων μορφολογικών ερυθροκυτταρικών αλλοιώσεων, β) τις φυσιολογικές ή ελαφρά μειωμένες τιμές ερυθροκυτταρικών δεικτών MCV και MCH, γ) τα φυσιολογικά χρωματογραφικά ευρήματα, δ) την απουσία σιδηροπενίας και ε) την παρουσία ενδοερυθροκυτταρικών εγκλείστων HbH με methyl violet χρώση στο μετά αλλά όχι στο πριν την επώαση δείγμα. Ο έλεγχος έγινε για τις 6 πιο συχνές α^+ -θαλασσαιμικές διαταραχές στον Ελληνικό πληθυσμό, $-\alpha^{3.7}$ έλλειψη, Poly(A)Tsaudi, IVS1 5' πεντανουκλεοτιδική έλλειψη, Poly(A)AATAAA>AATGAA, Hb Agrinio και Hb Icaria.

Βρήκαμε ότι 50 από τους 58 εξετασθέντες (86,2%) έφεραν α -θαλασσαιμική διαταραχή. Η $-\alpha^{3.7}$ έλλειψη ανιχνεύθηκε σε 29 εξετασθέντες (58%), η IVS1 5' πεντανουκλεοτιδική έλλειψη ανιχνεύθηκε σε 17 εξετασθέντες (34%), η Hb Icaria ανιχνεύθηκε σε δύο εξετασθέντες (4%), και η μεταλλαγή σήματος Poly(A) Tsaudi ανιχνεύθηκε σε ένα εξετασθέντα (2%). Σε αυτά τα άτομα πρέπει να προστεθεί άλλο ένα άτομο ομόζυγο για την $-\alpha^{3.7}$ έλλειψη με α^+ -θαλασσαιμικό φαινότυπο.

Συμπεραίνουμε ότι η περιγραφείσα μεθοδολογία, μπορεί να χρησιμοποιηθεί με ασφάλεια για τη διαγνωστική προσέγγιση των α^+ -θαλασσαιμικών φορέων σε Εργαστήρια ρουτίνας προκειμένου να επιλεγούν αυτοί που χρήζουν περαιτέρω ελέγχου με βάση το ατομικό και οικογενειακό ιστορικό, τον αιματολογικό φαινότυπο και κυρίως την αναγκαιότητα για γενετική συμβουλή ή προγεννητική διάγνωση. Επιπλέον εάν η μέθοδος αυτή χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της συχνότητας των α -θαλασσαιμικών φορέων, πιθανόν να αποδειχθεί πλέον ευαίσθητη στον εντοπισμό τους σε σχέση με προηγούμενα περιγραφείσες μεθόδους.

ABSTRACT

Diagnostic approach and gene analysis of the α^+ -thalassaemia in the Cretan population

By Zoe REPAPINO

(Thesis)

Haematology Laboratory, University Hospital of Heraklion, P.O.Box 1352, Heraklion, Crete, Greece

Fifty eight non iron-deficient individuals with mild erythrocytic morphological abnormalities, normal or slightly decreased MCV and MCH values, normal chromatographic findings and HbH inclusions by methyl violet staining in the post, but not in the pre-incubation preparation, were screened with DNA analysis for the six most common α -globin gene molecular defects in the Greek population, i.e. the $-\alpha^{3.7}$ deletion, Poly(A)Tsaudi, IVS1 5' pentanucleotide deletion, Poly(A)AATAAA>AATGAA, Hb Agrinio και Hb Icaria.

Fifty of 58 individuals (86.2%) were found carriers of a α -globin gene molecular defect. The detected defects were: the $-\alpha^{3.7}$ deletion (58%), the IVS1 5' pentanucleotide deletion (34%), the Hb Icaria mutation (4%) and the Poly(A) Tsaudi signal mutation (2%). In addition there was one $-\alpha^{3.7}$ deletion in homozygous state with α^+ -phenotype.

In conclusion, the described method can be used as a helpful screening tool for the diagnostic approach of α^+ -thalassemia carriers in routine laboratories, in order to select those who need further investigation based on the personal and family history, the hematological phenotype and mainly the necessity for genetic counseling or prenatal diagnosis. Moreover, if used for estimation of the incidence of α -thalassemia carriers, it may prove more sensitive in the detection of these carriers than previously reported.