



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας  
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών  
ΜΠΣ Βιοϊατρικές μέθοδοι και τεχνολογία στη διάγνωση

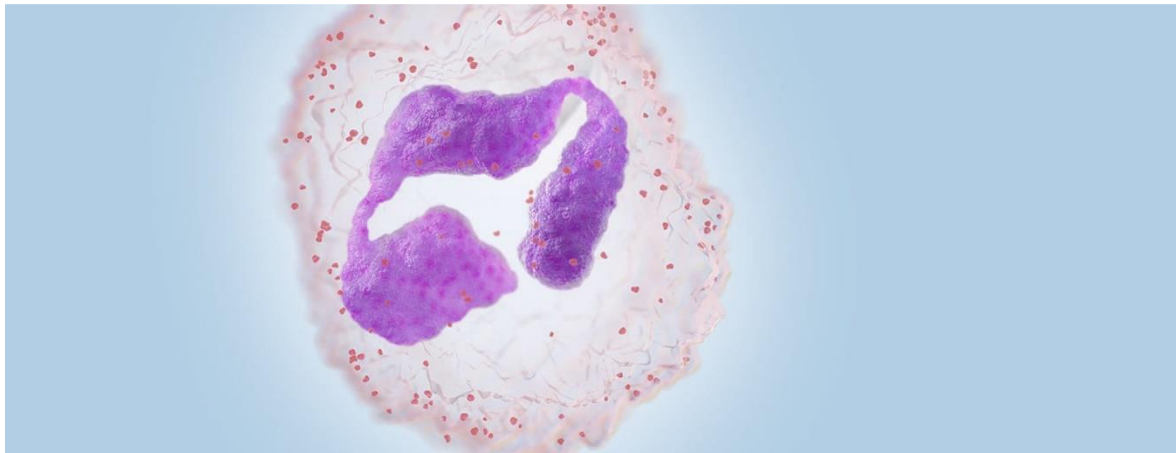


ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

## Νέοι δείκτες μορφολογίας των ερυθροκυττάρων και των λευκοκυττάρων

POST GRADUATE THESIS

### New parameters of red blood cells and white blood cells morphology



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑΣ/NAME OF STUDENT

Ευφροσύνη Ευριπιώτη  
Effrosyni Evripioti

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

Αναστάσιος Κριεμπάρδης  
Anastasios Kriebardis

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2022



Faculty of Health and Caring Professions  
Department of Biomedical Sciences  
Postgraduate program:  
Biomedical methods and technology in diagnosis



POST GRADUATE THESIS

## **New parameters of red blood cells and white blood cells morphology**

Effrosyni Evripioti  
Dml20030  
evriefi@hotmail.com

FIRST SUPERVISOR  
ANASTASIOS G. KRIEBARDIS

SECOND SUPERVISOR  
HARA T. GEORGATZAKOU

THIRD SUPERVISOR  
SOTIRIOS P. FORTIS

AIGALEO 2022

## **Επιτροπή εξέτασης**

Ημερομηνία εξέτασης: Παρασκευή 10 Φεβρουαρίου 2023

Όνόματα εξεταστών

Υπογραφή

1<sup>ος</sup> Εξεταστής Αναστάσιος Κριεμπάρδης

2<sup>ος</sup> Εξεταστής Χαρά Γεωργατζάκου

## **Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας**

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Ευφροσύνη Ευριπιώτη του Ιωάννη, με αριθμό μητρώου 20030 φοιτήτρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Βοϊατρικές μέθοδοι και Τεχνολογία στη Διάγνωση του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα

Ευφροσύνη Ευριπιώτη



## Ευχαριστίες

Η πραγματοποίηση αυτής της εργασίας έγινε σε μια ιδιαίτερη περίοδο της ζωής μου. Η διαδικασία προς την ολοκλήρωση με γέμισε με γνώσεις και εμπειρίες μοναδικές, οι οποίες θα μου φανούν χρήσιμες στη μετέπειτα επαγγελματική μου πορεία.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην Επιστημονικά Υπεύθυνη Διευθύντρια του Αιματολογικού τμήματος και Διευθύντρια του εργαστηριακού τομέα στο Γενικό Νοσοκομείο Ξάνθης, Δρ. Αγοράστη Αθανασία, Ιατρός Βιοπαθολόγος, η οποία μου προσέφερε πολύτιμη βοήθεια, γνώσεις, καθοδήγηση και υποστήριξη για τη διεκπεραίωση της διπλωματικής μου εργασίας.

Θερμές ευχαριστίες στον εισηγητή κ. Κριεμπάρδη Αναστάσιο, αναπληρωτή καθηγητή του τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, που μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα, ώστε να μπορέσω να απολαύσω ολοκληρωτικά το ταξίδι μου σε αυτό το μεταπτυχιακό.

## Αφιερώσεις

Αφιερώνω τη διπλωματική μου εργασία στα υπέροχα παιδιά μου Σάββα, Ιωάννα και Σπύρο. Η ανιδιοτελής αγάπη που σου δίνουν τα παιδιά σου είναι ένα μοναδικό δώρο που σε γεμίζει ενέργεια να συνεχίσεις να προσπαθείς για το καλύτερο. Έτσι και εγώ παίρνω δύναμη από τα μικρά μου αγγελούδια ώστε να πετύχω σε κάθε όνειρο και σε κάθε προσδοκία.

## Περίληψη

**Εισαγωγή:** Στην καθημερινή πράξη, η εξέταση «Γενική αίματος» μας προσφέρει μια πληθώρα παραμέτρων οι οποίες μπορούν να βοηθήσουν τον θεράποντα γιατρό να εξάγει συμπεράσματα προς όφελος του ασθενή. Ο κόσμος της ερευνητικής κοινότητας έχει δραστηριοποιηθεί έντονα τα τελευταία χρόνια με σημαντικές μελέτες με σκοπό να εκμεταλλευτούμε στο έπακρον τις πληροφορίες που δίδονται από τις νέες παραμέτρους που προσφέρουν οι ραγδαία εξελισσόμενοι αιματολογικοί αναλυτές. Σκοπός είναι να μπορούν να βγουν συμπεράσματα για κάθε περίπτωση ξεχωριστά μέσα από οικονομικές και ταχείες εξετάσεις.

**Σκοπός:** Η μελέτη της διαφοροδιαγνωστικής αξίας των δεικτών μορφολογίας των ερυθροκυττάρων, σε διαλογή (screening), για αιμοσφαιρινοπάθειες. Η δημιουργία νέας φόρμουλας διαφοροδιάγνωσης ανάμεσα σε ασθενείς με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία και ασθενείς με μικροκυτταρική σιδηροπενία. Η αξιολόγηση της διαφορικής διάγνωσης των δεικτών μορφολογίας των λευκοκυττάρων ανάμεσα σε υγιή πληθυσμό και σε άτομα με Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα.

**Μέθοδος:** Στατιστική επεξεργασία, με τη χρήση του *SPSS Statistics*, εφαρμόστηκε σε 348 δείγματα σχετιζόμενα με αιμοσφαιρινοπάθειες, σιδηροπενία, Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα και υγιή πληθυσμό, έπειτα από καταγραφή των ερυθροκυτταρικών και λευκοκυτταρικών δεικτών της Γενικής αίματος.

**Αποτελέσματα:** Ο δείκτης *MicroR%* και ο *HypoHe%* και ο απόλυτος αριθμός των *ΔΕΚ* ήταν αυξημένοι στους ασθενείς με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία. Ο δείκτης *RET-He*, παρόλο που είναι χαμηλός σε ασθενείς με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία αλλά και σε ασθενείς σιδηροπενία, ανάμεσα στις δύο υποομάδες, έδειξε ακόμη χαμηλότερες τιμές σε ασθενείς με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία. Εφαρμόστηκε η φόρμουλα  $[MHRF100=(MicroR\%-HypoHe\%)+(RETHE/Fer)/100]$  για τη διαφοροδιάγνωση της ετερόζυγης β-θαλασσαιμίας από τη μικροκυτταρική σιδηροπενία. Με cut-off το 16,47 η AUC ήταν 0,920, η ευαισθησία 92,9%, η ειδικότητα 83,8% και το Youden's index 76,6%. Ο δείκτης *NE-SSC* φάνηκε πιο χρήσιμος στην αναγνώριση Μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων.

**Συμπεράσματα:** Οι ερυθροκυτταρικοί δείκτες και οι νέες φόρμουλες μπορούν να φανούν χρήσιμες στη διαφοροδιάγνωση σε πληθυσμούς με μικροκυττάρωση. Η φόρμουλα



*MHFR100* ήταν ο πιο χρήσιμος δείκτης ανάμεσα σε ασθενείς με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία και ασθενείς με μικροκυτταρική σιδηροπενία. Οι λευκοκυτταρικοί δείκτες *NE-SSC* και *NE-SFL*, είναι πολλά υποσχόμενοι στην αναγνώριση Μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων, με τον δείκτη *NE-SSC* να υπερέχει έναντι του *NE-SFL*.

Λέξεις κλειδιά: δείκτες μορφολογίας ερυθρών και λευκών αιμοσφαιρίων, αιμοσφαιρινοπάθειες, νέα φόρμουλα διαφοροδιάγνωσης, μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα, σιδηροπενία.

## Abstract

**Introduction:** In daily practice, "Complete Blood Count" offers a multitude of parameters that can help the physician to draw conclusions for the benefit of the patient. The research community has been very active in recent years with important studies in order to make the most of the information provided by the new parameters offered by the rapidly evolving blood analyzers. The aim is to be able to draw conclusions for each individual case through economic and rapid tests.

**Purpose:** To study the differential diagnostic value of erythrocyte morphology markers in screening for hemoglobinopathies. The creation of a new differential diagnosis formula between patients with heterozygous beta-thalassemia and patients with microcytic iron deficiency. The evaluation of differential diagnosis of leukocyte morphology markers between healthy population and individuals with Myelodysplastic syndromes.

**Method:** Statistical analysis, using *SPSS Statistics*, was applied to 348 samples related to haemoglobinopathies, iron deficiency, myelodysplastic syndromes and normal population, after recording the erythrocyte and leukocyte markers of the Complete Blood Count.

**Results:** *MicroR%* and *HypoHe%* and the absolute number of *RET* were increased in patients with heterozygous  $\beta$ -thalassemia. The *RET-He* index, although low in patients with heterozygous  $\beta$ -thalassemia and also in iron-deficient patients, between the two subgroups, showed even lower values in patients with heterozygous  $\beta$ -thalassemia. The *NE-SSC* marker appeared to be more useful in the identification of MDS. The formula  $[MHRF100=(MicroR\%-HypoHe\%)+(REHe/Fer)/100]$  was applied for differential diagnosis of heterozygous  $\beta$ -thalassemia from microcytic iron deficiency. With a cut-off of 16.47 the AUC was 0.920, sensitivity 92.9%, specificity 83.8% and Youden's index 76.6%

**Discussion:** The new parameters of the Red blood cells and new formulas may be useful in differential diagnosis in populations with microcytosis. The *MHFR100* formula was the most useful marker among patients with heterozygous beta-thalassemia and patients with microcytic iron deficiency. The leukocyte markers *NE-SSC* and *NE-SFL*, are promising in the identification of Myelodysplastic syndromes, with *NE-SSC* being superior to *NE-SFL*.

**Key words:** red blood cells, white blood cells, morphology parameters, haemoglobinopathies, new differential diagnosis formula, myelodysplastic syndromes, iron deficiency.

## Περιεχόμενα

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας.....	iv
Ευχαριστίες.....	vi
Αφιέρωσεις.....	vii
Περίληψη.....	viii
Συνοτομογραφίες.....	xiii
Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή.....	3
1.1 Γενική αίματος.....	3
1.2 Δείκτες μορφολογίας ερυθρών αιμοσφαιρίων:.....	4
1.3 Δείκτες μορφολογίας λευκών αιμοσφαιρίων.....	12
1.4 Αιμοπετάλια.....	15
Κεφάλαιο 2. Σιδηροπενική αναιμία.....	17
2.1 Εισαγωγή.....	17
2.2 Διάγνωση σιδηροπενίας.....	17
Κεφάλαιο 3. Αιμοσφαιρινοπάθειες.....	19
3.1 Εισαγωγή.....	19
3.2 Ταξινόμηση Αιμοσφαιρινοπαθειών.....	21
3.2.1 Θαλασαιμίες.....	21
3.2.2 Παραλλαγές της αιμοσφαιρίνης.....	21
Κεφάλαιο 4. Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (ΜΔΣ).....	23
4.1 Εισαγωγή.....	23
4.2 Ταξινόμηση Μυελοδυσπλαστικών Συνδρόμων.....	23
4.3 Εργαστηριακά ευρήματα.....	24
4.3.1 Γενικά.....	24
4.3.2 Ανθεκτική κυτταροπενία με μονογραμική δυσπλασία (RCUD).....	26
3.2.1. Ανθεκτική αναιμία με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες (RARS).....	26
4.3.3 Ανθεκτική κυτταροπενία με πολυγραμική δυσπλασία (RCMD).....	27
4.3.4 Ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών (RAEB).....	27
4.3.5 Αταξινόμητο ΜΔΣ (MDS-U).....	27
4.3.6 Μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο με μεμονωμένη έλλειψη των μακρών σκελών του χρωμοσώματος 5 (MDS del(5q)).....	28
Κεφάλαιο 5. Ερευνητικό μέρος.....	29
5.1 Σκοπός.....	29

5.2	Μέθοδοι και Υλικά.....	29
5.3	Ασθενείς.....	31
5.3.1	Κριτήρια επιλογής δεδομένων.....	31
5.3.2	Διαχωρισμός ομάδων.....	32
5.4	Στατιστική ανάλυση.....	33
5.5	Αποτελέσματα.....	33
5.5.1	Ομάδα ελέγχου.....	33
5.5.2	Ερυθροκυτταρικοί δείκτες.....	35
5.5.3	Λευκοκυτταρικοί δείκτες.....	40
5.6	Συμπεράσματα.....	42
	Παράρτημα Α.....	43
	Παράρτημα Α (συνέχεια).....	44
	Αναφορές.....	45
	Πηγές Εικόνων.....	49

## Συντομογραφίες

	Αγγλική ορολογία	Ελληνική ορολογία
<b>AML</b>	Acute Myeloid Leukemia	Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία
<b>CBC</b>	Complete Blood Count	Γενική αίματος
<b>ChR</b>	Reticulocyte heamoglobin content	Συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης στα Δικτυοερυθροκύτταρα
<b>FRC#</b>	Fragmented red cell concentration	Απόλυτος αριθμός θραυσμάτων ερυθροκυττάρων
<b>FRC%</b>	Percentage of fragmented red cells (schistocytes)	Εκατοστιαία αναλογία θραυσμάτων ερυθροκυττάρων (σχιστοκύτταρα)
<b>HGB</b>	Haemoglobin	Αιμοσφαιρίνη
<b>HCT</b>	Haematocrit	Αιματοκρίτης
<b>HFLC#</b>	Highly fluorescent lymphocytic cell concentration	Απόλυτος αριθμός λεμφοκυττάρων υψηλού φθορισμού
<b>HFLC%</b>	Percentage of highly fluorescent lymphocytic cells	Εκατοστιαία αναλογία λεμφοκυττάρων υψηλού φθορισμού
<b>HFR</b>	High-fluorescence reticulocytes	Δικτυοερυθροκύτταρα υψηλού φθορισμού
<b>HYPER-HE%</b>	Hyper-haemoglobinised red blood cells	Εκατοστιαία αναλογία υπέρχρωμων ερυθροκυττάρων
<b>HYPO-HE%</b>	Hypo-haemoglobinised red blood cells	Εκατοστιαία αναλογία υπόχρωμων ερυθροκυττάρων
<b>IG#</b>	Immature granulocyte concentration	Απόλυτος αριθμός άωρων κοκκιοκυττάρων
<b>IG%</b>	Percentage of immature granulocytes	Εκατοστιαία αναλογία άωρων κοκκιοκυττάρων
<b>IRF</b>	Immature reticulocyte fraction	Κλάσμα άωρων δικτυοερυθροκυττάρων
<b>LFR</b>	Low fluorescence reticulocytes	Δικτυοερυθροκύτταρα χαμηλού φθορισμού
<b>MCH</b>	Mean corpuscular haemoglobin	Μέση περιεκτικότητα αιμοσφαιρίνης
<b>MCHC</b>	Mean corpuscular haemoglobin concentration	Μέση συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης
<b>MCV</b>	Mean corpuscular volume	Μέσος όγκος ερυθρών αιμοσφαιρίων
<b>MDS</b>	Myelodysplastic syndrome	Μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο
<b>MFR</b>	Medium-fluorescence reticulocytes	Δικτυοερυθροκύτταρα μεσαίου φθορισμού
<b>MacroR%</b>	Percentage of macrocytic red blood cells	Εκατοστιαία αναλογία μακροκυτταρικών ερυθροκυττάρων
<b>MicroR%</b>	Percentage of microcytic red blood cells	Εκατοστιαία αναλογία μικροκυτταρικών ερυθροκυττάρων
<b>NE-SFL</b>	neutrophils-side fluorescence	Ουδετερόφιλα - Πλάγιος φθορισμός
<b>NE-SSC</b>	neutrophils-side scatter	Ουδετερόφιλα - Πλάγιος σκεδασμός

<b>PCT</b>	Platelet crit	Αιμοπεταλιοκρίτης
<b>PLT</b>	Platelet concentration	Αιμοπετάλια
<b>RBC</b>	Red blood cell	Ερυθρά αιμοσφαίρια
<b>RDW-CV</b>	RBC distribution width, coefficient of validation	Εύρος κατανομής ερυθρών αιμοσφαιρίων, Συντελεστής μεταβλητότητας
<b>RDW-SD</b>	RBC distribution width, standard deviation	Εύρος κατανομής ερυθρών αιμοσφαιρίων, Σταθερή απόκλιση
<b>RET#</b>	Reticulocyte concentration	Απόλυτος αριθμός δικτυοερυθροκυττάρων
<b>RET%</b>	Percentage of reticulocytes	Εκατοστιαία αναλογία δικτυοερυθροκυττάρων
<b>RET-HE</b>	Reticulocyte haemoglobin content	Συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης στα Δικτυοερυθροκύτταρα
<b>WBC</b>	White blood cell	Λευκά αιμοσφαίρια
<b>WHO</b>	World Health Organization	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας

## Πρόλογος

Η εξέλιξη των αυτόματων αιματολογικών αναλυτών, οι οποίοι βασίζονται στις αρχές της κυτταρομετρίας ροής με Laser για την ανάλυση της μορφολογίας των ερυθροκυττάρων, παρέχει ένα σημαντικό εργαλείο. (1) Ο αιματολογικός αναλυτής Sysmex XN-1000, ο οποίος και θα χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση των δειγμάτων αυτής της εργασίας, αναλύει τα κύτταρα του αίματος με κυτταρομετρία ροής με Laser ημιαγωγού και φθορισμό με χρήση φθοριζουσών χρωστικών. Οι φθορίζουσες χρωστικές στην ουσία βάφουν τα κύτταρα ανάλογα με το περιεχόμενό τους σε RNA/DNA. Η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη της ποσότητας RNA/DNA που περιέχει το εκάστοτε κύτταρο. Αναφορικά για τα Δικτυοερυθροκύτταρα (ΔΕΚ), η ποσότητα του RNA αντιστοιχεί στο επίπεδο ωρίμανσης του κυττάρου. Ως ώριμα ΔΕΚ ορίζονται αυτά με τον εντονότερο φθορισμό, καθώς περιέχουν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση RNA στο κυτταρόπλασμά τους. Κατ' επέκταση ως πλέον ώριμα ορίζονται αυτά με το χαμηλότερο φθορισμό. (2)

Οι αυτόματοι αιματολογικοί αναλυτές, εκτός από τις απόλυτες τιμές, μας παρέχουν και νεφελογράμματα, τα οποία αφορούν την κατανομή των κυττάρων. Στο κανάλι των ερυθροκυττάρων, στον κάθετο άξονα αποδίδεται το σήμα του πρόσθιου σκεδασμού, το οποίο μας δίνει πληροφορίες σχετικές με το μέγεθος των ερυθροκυττάρων, ενώ στον οριζόντιο άξονα αποδίδεται το σήμα του πρόσθιου φθορισμού, το οποίο μας δίνει πληροφορίες σχετικά με το περιεχόμενο σε RNA. (1) Αντίστοιχα στο κανάλι των λευκών αιμοσφαιρίων, ο κάθετος άξονας αφορά τον πλάγιο σκεδασμό, όπου δίδονται πληροφορίες σχετικά με την κοκκίωση και την περιπλοκότητα των πυρήνων των λευκοκυττάρων (neutrophils side scatter, NE-SSC). Ο οριζόντιος άξονας αφορά τον πλάγιο φθορισμό, όπου δίδονται πληροφορίες σχετικά με το περιεχόμενο των κυττάρων σε RNA/DNA (neutrophils side fluorescent, NE-SFL). (3) Οι παραπάνω πληροφορίες εκφράζονται ως δείκτες μορφολογίας ερυθροκυττάρων και λευκοκυττάρων.

Έχει παρατηρηθεί ότι οι δείκτες μορφολογίας των ερυθροκυττάρων μπορούν να μας βοηθήσουν να αντιληφθούμε την ύπαρξη νόσου (π.χ. αιμοσφαιρινοπάθειες, σιδηροπενική ή μεγαλοβλαστική αναιμία) (4) καθώς και την ανταπόκριση στη θεραπευτική αγωγή (π.χ. χορήγηση ερυθροποιητίνης).

Επίσης, οι δείκτες μορφολογίας των λευκοκυττάρων δίδουν πληροφορίες σχετικά με την ύπαρξη φλεγμονής (αυξημένη κοκκίωση ουδετερόφιλων) (5), ύπαρξη μυελοδυσπλασίας (6), παρουσία κυττάρων που παράγουν αντισώματα, κ.ά. (7) Οι δείκτες μορφολογίας των λευκοκυττάρων NE-SSC και NE-SFL, βάσει δημοσιευμένων μελετών, έχουν αναγνωρισθεί ως ιδιαίτερα σημαντικοί πρώιμοι δείκτες για την ανίχνευση της δυσπλασίας των ουδετερόφιλων κοκκιοκυττάρων προερχόμενη από μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα και χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία. (8)

Η κεντρική ιδέα αυτής της εργασίας είναι να επικεντρωθούμε στην διαφοροδιαγνωστική αξία αυτών των δεικτών σε διαλογή (screening) για αιμοσφαιρινοπάθειες. Παράλληλα θα ασχοληθούμε με την διαφοροδιαγνωστική αξία των δεικτών μορφολογίας των λευκοκυττάρων NE-SSC και NE-SFL, ανάμεσα σε υγιή πληθυσμό και σε άτομα με Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα. Υπάρχουν μελέτες οι οποίες έχουν αποδείξει τη συσχέτιση αυτών των δεικτών και την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων. (9),(10)

Τέλος, θα επιχειρήσουμε να δημιουργήσουμε μία νέα φόρμουλα διαγνωστικού δείκτη, χρησιμοποιώντας τους νέους δείκτες μορφολογίας (που μας παρέχει ο αναλυτής Sysmex XN-1000), ο οποίος θα μας δίνει μία πρώιμη εικόνα της εξέλιξης της νόσου.



# Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή

## 1.1 Γενική αίματος

Η αναλυτική περιγραφή της εικόνας του αίματος, μέσα από ποσοτικές και ποιοτικές παραμέτρους των έμμορφων συστατικών του, χαρακτηρίζεται με τον όρο «Γενική αίματος» και περιλαμβάνει δύο βασικά μέρη. Αφενός μεν, την καταγραφή του απόλυτου αριθμού και της εκατοστιαίας αναλογίας των έμμορφων στοιχείων του αίματος (ερυθροκύτταρα, λευκοκύτταρα και αιμοπετάλια), τη μέτρηση της αιμοσφαιρίνης, αφετέρου δε μια πληθώρα παραμέτρων που περιγράφουν τη μορφολογία των έμμορφων συστατικών, όπως το μέγεθος και τη διακύμανσή του, τη συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης ανά ερυθροκύτταρο, την ύπαρξη κοκκίων, την ωριμότητα των κυττάρων κτλ. (11)

Με τις πλέον σύγχρονες αυτοματοποιημένες μεθόδους, η ανάλυση των κυττάρων του αίματος γίνεται με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Συγκεκριμένα, αφού γίνει η αραιώση των έμμορφων στοιχείων του αίματος μέσα σε ισότονο ηλεκτρολυτικό διάλυμα, υπό αρνητική πίεση δημιουργείται μια σταθερή ροή, η οποία διαχέεται από την οπή μέτρησης. Στα άκρα της οπής δημιουργείται σταθερή αντίσταση (impedance) από ένα συνεχές ρεύμα, όταν δεν διέρχεται κάποιο στοιχείο από την οπή. Κάθε φορά που διέρχεται ένα έμμορφο στοιχείο, αυξάνει η αντίσταση με αποτέλεσμα τη μεταβολή της διαφοράς δυναμικού στα άκρα της οπής. Αυτές οι μεταβολές καταγράφονται ως ηλεκτρονικοί παλμοί και έτσι δημιουργείται η κατανομή συχνότητας, το επονομαζόμενο ιστόγραμμα του όγκου (volume histogram). Το ύψος του παλμού είναι ανάλογο με τον όγκο του κυττάρου.

Για τη διασφάλιση της φυσιολογικής μορφής του παλμού και κατ' επέκταση της ορθότερης αποτύπωσης της συσχέτισης του ύψους του παλμού με τον όγκο του κυττάρου, χρησιμοποιείται υδροδυναμική εστίαση ώστε τα κύτταρα να ρέουν υποχρεωτικά σε συγκεκριμένο ρεύμα και σε αξονική τροχιά. (12)

Τα δεδομένα που αναλύθηκαν στην παρούσα εργασία, πάρθηκαν από τον αιματολογικό αναλυτή Sysmex XN-1000, ο οποίος χρησιμοποιεί τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής με laser ημιαγωγού στα 633nm. Με συγκεκριμένες τεχνικές χρησιμοποιεί τη φθορίζουσα χρωστική πολυμεθίνη για όλους τους τύπους κυττάρων, με σκοπό να σημανθούν. Η φθορίζουσα χρωστική πολυμεθίνη έχει την ικανότητα να επισημαίνει συγκε-

κριμένους επίτοπους στην κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων του αίματος, πριν την ανάλυση με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. (12) Με τον τρόπο αυτό ο αναλυτής μπορεί να αυξήσει την ειδικότητα και να του παρέχεται η δυνατότητα να μπορεί να επεκτείνει τις δυνατότητες και εφαρμογές του πέρα από την τυπική καταμέτρηση κυττάρων, αποφεύγοντας τις περίπλοκες και κοστοβόρες τεχνικές που χρησιμοποιούν μεθόδους αντιγόνου/αντισώματος. (13)

Τα σημασμένα κύτταρα, καθώς περνούν ένα-ένα από την οπή, προσπίπτει πάνω τους μονοχρωματικό φως από το laser ημιαγωγού στα 633nm και η αντανάκλαση που δημιουργείται καταγράφεται στα λεγόμενα νεφελογράμματα. Η διαφορετική σκέδαση της ακτινοβολίας, αντιπροσωπεύει και διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς. (12) Έπειτα από τρισδιάστατη ανάλυση των σημάτων που δημιουργούνται από τα κύτταρα σχετικά με το μέγεθος, τη δομή και το περιεχόμενό τους σε RNA/DNA, παράγονται τα νεφελογράμματα.(14)

Ο πρόσθιος σκεδασμός (forward scatter) είναι ανάλογος με το μέγεθος του κυττάρου. Ο πλάγιος σκεδασμός δίνει πληροφορίες για την εσωτερική περιπλοκότητα της δομής του κυττάρου καθώς και την κοκκίωσή του. Ο πλάγιος φθορισμός αντιπροσωπεύει την πυκνότητα των κυττάρων σε RNA/DNA. (12, 15)

Η συνεχιζόμενη εξέλιξη των αυτόματων αναλυτών με τις προσθήκες νέων παραμέτρων διατηρεί τη Γενική αίματος ως την πιο σημαντική εξέταση καθώς, σε συνάρτηση με την κλινική εικόνα και το ιστορικό του ασθενή μπορεί να δώσει τα πρώτα σημαντικά στοιχεία που θα βοηθήσουν στην έγκαιρη διάγνωση.

## 1.2 Δείκτες μορφολογίας ερυθρών αιμοσφαιρίων:

**RBC (Red blood cells, Ερυθροκύτταρα):** Ο απόλυτος αριθμός των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι ο βασικός παράγοντας που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό συγκεκριμένων παραμέτρων, όπως ο αιματοκρίτης, ο μέσος όγκος ερυθρών αιμοσφαιρίων, η μέση περιεκτικότητα αιμοσφαιρίνης κτλ. Η μέτρησή τους καταγράφεται στο κανάλι *RBCs/PLT*, όπου διαφοροποιούνται από τα αιμοπετάλια βάση του μεγέθους τους. Έπειτα από ανάμιξη 4μL αίματος σε αναλογία 1:500, στο κανάλι ανάμιξης, το μίγμα διαχέεται στο κανάλι μέτρησης. Βάση της αρχής της κυτταρομετρίας ροής, τα κύτταρα ωθούνται να διαπεράσουν μια οπή, όπου στις άκρες της υπάρχει σταθερή αντίσταση, κάθε ένα ξεχωριστά.

Κάθε φορά που περνάει ένα κύτταρο δημιουργείται διαφορά δυναμικού και καταγράφεται ένας παλμός. Το μέγεθος του παλμού είναι ανάλογο με το μέγεθος του κυττάρου. (12) Στις θαλασσαιμίες τα ερυθρά αιμοσφαίρια εμφανίζονται πιο μικρά, ενώ στην σιδηροπενική αναιμία εμφανίζονται πιο υπόχρωμα. (16)

**HGB (Αιμοσφαιρίνη):** Η Αιμοσφαιρίνη αποτελεί το κύριο συστατικό των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Η Αιμοσφαιρίνη είναι μια εξειδικευμένη πρωτεΐνη που παίζει πρωταρχικό ρόλο στη μεταφορά οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα. Η μέτρησή της είναι σημαντική, καθώς η μείωση της αιμοσφαιρίνης είναι μια πρώτη ένδειξη αναιμίας. (17) Στους αυτόματους αναλυτές η μέθοδος μέτρησης της αιμοσφαιρίνης βασίζεται στη μέθοδο του λαούρυλο-θεικού νατρίου (Sodium Lauryl Sulfate, SLS), κατά τη οποία πραγματοποιείται λύση της κυτταρικής μεμβράνης των ερυθροκυττάρων και απελευθέρωση της αιμοσφαιρίνης. Η αντίδραση της αιμοσφαιρίνης με το SLS δημιουργεί μια χρωστική ουσία η οποία μετρείται φωτομετρικά και αποδίδει τη συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης. Πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η ικανότητα μέτρησης όλων των παραγώγων της αιμοσφαιρίνης, όπως η δεοξυ-αιμοσφαιρίνη, οξυ-αιμοσφαιρίνη, ανθρακυλαιμοσφαιρίνη και μεθαιμοσφαιρίνη. (18)

**MCV (Mean Corpuscular Volume, Μέσος Όγκος ερυθρών αιμοσφαιρίων):** Ο Μέσος Όγκος ερυθρών αιμοσφαιρίων θεωρείται ως ένας πολύ αξιόλογος δείκτης που εκφράζει το μέσο όγκο ενός ερυθροκυττάρου και απορρέει από τη συνάρτηση της τιμής του αιματοκρίτη προς την απόλυτη τιμή των ερυθροκυττάρων ( $MCV = Ht \times 1000 / RBCs$ ). Όταν ο MCV είναι αυξημένος ( $MCV > 95 fl$ ), αυτό συνεπάγεται αυξημένο όγκο των ερυθροκυττάρων, το οποίο καλείται μακροκυττάρωση και εμφανίζεται σε μακροκυτταρικές αναιμίες (όπως η μεγαλοβλαστική αναιμία που προκαλείται από έλλειψη βιταμίνης B12 και φυλλικού οξέος), κατάχρηση αλκοόλ κ.α. Όταν ο MCV είναι ελαττωμένος ( $MCV < 80 fl$ ), αυτό συνεπάγεται μείωση του όγκου των ερυθροκυττάρων, το οποίο καλείται μικροκυττάρωση και εμφανίζεται σε μικροκυτταρικές αναιμίες (σιδηροπενική αναιμία, ετερόζυγη μεσογειακή αναιμία), (19) σε κακοήθειες, στη ρευματοειδή αρθρίτιδα και στη δηλητηρίαση από μόλυβδο. Όταν ο MCV είναι ανάμεσα στις φυσιολογικές τιμές ( $MCV = 80-95 fl$ ) τότε τα ερυθροκύτταρα ονομάζονται ορθοκυτταρικά ή νορμοκυτταρικά. (11)

**MCH (Mean Corpuscular Hemoglobin, Μέση Περιεκτικότητα Αιμοσφαιρίνης):** Η συνάρτηση της αιμοσφαιρίνης και του απόλυτου αριθμού των ερυθροκυττάρων αποδίδεται ως MCH και εκφράζει την ποσότητα της αιμοσφαιρίνης ανά ερυθροκύτταρο ( $MCH = Hb$

$\times 10/RBCs$ ). Η αύξησή της προσδίδει μια κατάσταση που ονομάζεται υπερχρωμία και συνεπάγεται με αυξημένη ποσότητα αιμοσφαιρίνης, ενώ αντίθετα η μείωση της *MCH* ονομάζεται υποχρωμία και αντίστοιχα παρατηρείται μειωμένη ποσότητα αιμοσφαιρίνης ανά ερυθροκύτταρο. (11) Τα διαγνωστικά κριτήρια για τη μικροκυτταρική υπόχρωμη αναιμία ορίζονται από  $MCV < 80 fl$  και  $MCH < 27 pg$ . (20)

***MCHC (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration, Μέση Συγκέντρωση Αιμοσφαιρίνης στα ερυθροκύτταρο):*** Η συνάρτηση της αιμοσφαιρίνης και του αιματοκρίτη συνιστά την *MCHC* και αφορά την περιεκτικότητα των ερυθροκυττάρων σε αιμοσφαιρίνη ( $MCHC = Hb \times 100 / Ht$ ). Όπως και η *MCH*, η αύξηση της τιμής της *MCHC* προσδίδει υπερχρωμία, η οποία εμφανίζεται σε σφαιροκυττάρωση, ενώ η μείωσή της (υποχρωμία) εμφανίζεται σε σιδηροπενική και σιδηροβλαστική αναιμία, σε μεσογειακή αναιμία και σε δηλητηρίαση από μόλυβδο. (11)

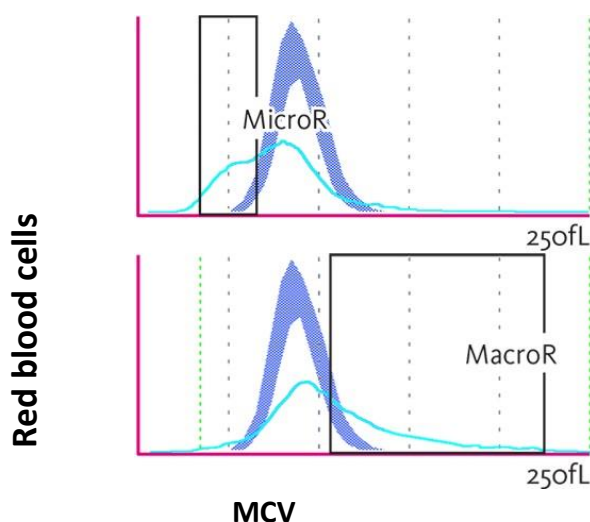
***RDW-SD (Red cell Distribution Width – Standard Deviation, Εύρος κατανομής μεγέθους ερυθροκυττάρων - Σταθερή απόκλιση):*** Αποτελεί έναν αντικειμενικό δείκτη για την ανισοκυττάρωση, ο οποίος είναι ιδιαίτερα αυξημένος στις μεγαλοβλαστικές αναιμίες, (21) καθώς έχει την ιδιότητα αφενός μεν να ποσοτικοποιεί και αφετέρου δε να προσδίδει την ετερογένεια του όγκου των ερυθρών αιμοσφαιρίων (19). Η ανισοκυττάρωση και η ποικιλοκυττάρωση είναι παθολογικά χαρακτηριστικά, τα οποία ανευρίσκονται συχνά σε αιμοσφαιρινοπάθειες. (22) Οι *Bessmen and Feinstein*, το 1979, ήταν οι πρώτοι που εξέφρασαν την άποψη ότι το *RDW* μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαφοροδιαγνωστικός βοηθητικός δείκτης ανάμεσα σε ασθενείς με μικροκυτταρική αναιμία, καθώς εμφάνιζε διαφορές ανάμεσα σε σιδηροπενικούς ασθενείς και φορείς θαλασσαιμιών. (23) Η προγνωστική σπουδαιότητα σε χαμηλού ρίσκου Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα έχει τεκμηριωθεί. (24)

***RDW-CV (Red cell Distribution Width – Coefficient Variation, Εύρος κατανομής μεγέθους ερυθροκυττάρων - Συντελεστής μεταβλητότητας):*** Όπως αναφέρθηκε, το *RDW* προσδίδει το ποσοστό της ανισοκυττάρωσης. Η ανισοκυττάρωση όμως μπορεί να επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως η εξέταση του δείγματος έπειτα από μεγάλη παραμονή του στο περιβάλλον, η υπεργλυκαιμία, τα θραύσματα ερυθροκυττάρων, η παρουσία συσσωρεύσεων αιμοπεταλίων, η εμφάνιση γιγάντιων αιμοπεταλίων όπως και η εκτεταμένη μικροκυττάρωση. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω και εφόσον το *RDW-CV* είναι αντιστρόφως ανάλογο με τον *MCV*, προτάθηκε η χρήση της παραμέτρου *MATH-1SD*, η οποία αντιπροσωπεύει τη μαθηματική αφαίρεση ενός *SD* γύρω από τον *MCV*. Ο

προσδιορισμός του *RDW-CV* πραγματοποιείται μέσω του ιστογράμματος κατανομής των ερυθροκυττάρων και εκφράζει το συντελεστή μεταβλητότητας του όγκου των ερυθροκυττάρων γύρω από τον *MCV*. Αναλυτικότερα, ο  $RDW-CV(\%) = 1SD (fl) / MCV (fl) \times 100$ , όπου 1SD ισούται με το εύρος του ιστογράμματος κατανομής των ερυθροκυττάρων, σε φεμτόλιτρα (fl), σε επίπεδο περίπου 68,2% πάνω από τη βάση του ιστογράμματος. Το *RDW-SD* προκύπτει από το εύρος σε επίπεδο 20% πάνω από τη βάση του ιστογράμματος και εκφράζεται επίσης σε φεμτόλιτρα (fl). Το ύψος των 20% επιλέχθηκε καθώς σε αυτό το επίπεδο υπάρχει μεγαλύτερη ετερογένεια των ερυθροκυττάρων. (25)

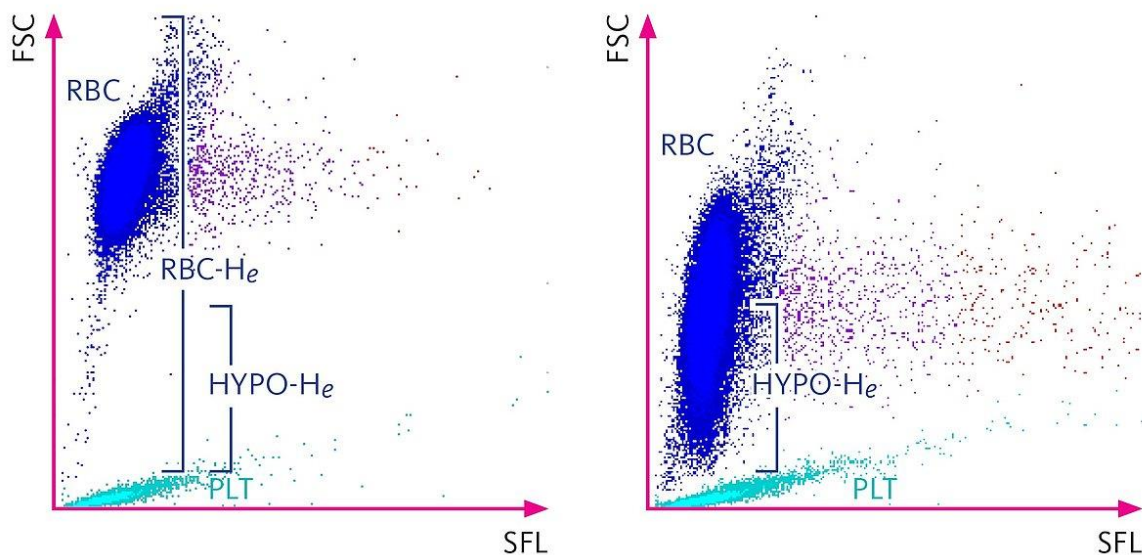
**%Micro-R (Percentage of microcytic red blood cells, Εκατοστιαία αναλογία μικροκυτταρικών ερυθροκυττάρων):** Δείκτης που εκφράζει το ποσοστό των μικροκυτταρικών ερυθρών αιμοσφαιρίων, με όγκο μικρότερο των 60fl (βλ. Εικ.1). Σε υγιείς ενήλικες το ποσοστό αυτό είναι <1%. (26) Μελέτες προτείνουν ότι όταν το %*Micro-R* είναι μεγαλύτερο από 20%, τότε είναι ένδειξη φορέα β-μεσογειακής αναιμίας, με 93,7% ευαισθησία και 72,5% ειδικότητα. (1) Αυξημένα ποσοστά ,επίσης παρατηρούνται σε ασθενείς με ετερόζυγη α-θαλασσαιμία ή με αιμοσφαιρινοπάθεια Η. (26)

**%Macro-R (Percentage of macrocytic red blood cells, Εκατοστιαία αναλογία μακροκυτταρικών ερυθροκυττάρων):** Το %*Macro-R* προσδίδει αντίστοιχα το ποσοστό των μακροκυτταρικών ερυθρών αιμοσφαιρίων, με όγκο μεγαλύτερο των 120fl (βλ. Εικ.1). (1)



**Εικόνα 1** Ιστόγραμμα κατανομής μικροκυτταρικών (*Micro-R*) και μακροκυτταρικών (*Macro-R*) ερυθροκυττάρων από τον αναλυτή *Sysmex XN-1000*. Στον κάθετο άξονα αντιστοιχεί ο αριθμός των ερυθροκυττάρων (*Red blood cells*) και στον οριζόντιο άξονα ο Μέσος όγκος των ερυθροκυττάρων (*MCV*) Πηγή: <https://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/sysmex-parameters/micromacror.html> (Τροποποιημένο)

**%Hypo-He (Percentage of hypo-haemoglobinised red cells, Εκατοστιαία αναλογία υπόχρωμων ερυθροκυττάρων):** Αξιόπιστος δείκτης που εκφράζει το ποσοστό των υπόχρωμων ερυθρών αιμοσφαιρίων, με μέση περιεκτικότητα αιμοσφαιρίνης (*MCH*) μικρότερη των 17pg (1), και σχετίζεται με την επάρκεια σιδήρου κατά το τελευταίο τρίμηνο. (2) Σε υγιείς ενήλικες το ποσοστό αυτό είναι <1%. (26) Σε συνδυασμό με την εκτίμηση των βιοχημικών δεικτών είναι διαφοροδιαγνωστικός δείκτης μεταξύ της σιδηροπενικής αναιμίας και της αναιμίας χρόνιας νόσου. (26) Από μελέτες έχει φανεί ότι στους φορείς β-μεσογειακής αναιμίας, οι τιμές %Hypo-He βρίσκονται αυξημένες λόγω της μη αποδοτικής ερυθροποίησης η οποία συνεπάγεται τη μειωμένη σύνθεση ακέραιης αιμοσφαιρίνης. (2) Συγκριτικά σε ασθενείς με ετερόζυγη α-θαλασσαιμία ή με αιμοσφαιρινοπάθεια Η και ασθενείς με σιδηροπενική αναιμία, παρόλο που όλοι έχουν αυξημένα επίπεδα %Hypo-He, στους ασθενείς με σιδηροπενική αναιμία είναι περισσότερο αυξημένα. (26)

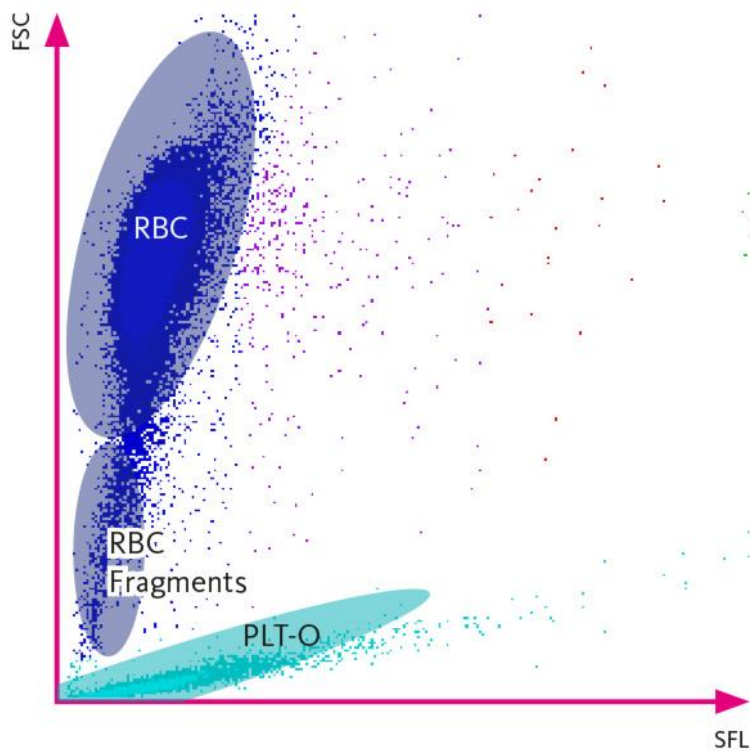


**Εικόνα 2** Νεφελόγραμμα ΔΕΚ. Στον οριζόντιο άξονα x απεικονίζεται η ένταση φθορισμού (*FSC- Forward scattered light*), η οποία είναι σχετική με το περιεχόμενο του κυττάρου και στον κάθετο άξονα y απεικονίζεται το μέγεθος του κυττάρου (*SFL-Side fluorescent light*). Το αριστερό πάνελ αφορά ένα υγιές άτομο με υπόχρωμα ερυθροκύτταρα (*Hypo-He*) <1%, ενώ το δεξι πάνελ έναν ασθενή με *Hypo-He* >60%. Πηγή: <https://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/sysmex-parameters/hypo-hehyper-he.html> (Τροποποιημένο)

**%Hyper-He (Percentage of hyper-haemoglobinised red cells, Εκατοστιαία αναλογία υπέρχρωμων ερυθροκυττάρων):** Πρόκειται για την έκφραση σε ποσοστό των υπέρχρωμων ερυθρών αιμοσφαιρίων, με μέση περιεκτικότητα σε αιμοσφαιρίνη (*MCH*) μεγαλύτε-

ρη από 49pg (1) και είναι ενδεικτικός για τη βαρύτητα της κληρονομικής σφαιροκυττάρωσης και της αυτοάνοσης αιμόλυσης (27)

**FRC (Fragmented red cells, αριθμός θραυσμάτων ερυθροκυττάρων):** Εκφράζεται ως απόλυτος αριθμός και ως ποσοστό των θραυσμάτων των ερυθρών αιμοσφαιρίων και συνιστά το δείκτη των σχιστοκυττάρων. Η μέθοδος ανίχνευσης βασίζεται στο κυτταρικό μέγεθος. (28) Η απουσία νουκλεϊκών οξέων στα ερυθρά αιμοσφαίρια, η μέτρηση του πλάγιου φθορισμού είναι σε πολύ χαμηλά επίπεδα, καθώς και η μέτρηση του πρόσθιου σκεδασμού που είναι ανάλογη του μεγέθους είναι μικρότερη από αυτή των φυσιολογικών ερυθροκυττάρων. Ως εκ τούτου, στο νεφελόγραμμα των ΔΕΚ, μια συγκεκριμένη περιοχή κάτω από το κλάσμα των φυσιολογικών ερυθροκυττάρων χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των θραυσμάτων των ερυθροκυττάρων. (βλ. Εικ. 3)



**Εικόνα 3** Νεφελόγραμμα ΔΕΚ. Προσδιορισμός θραυσμάτων ερυθροκυττάρων (RBC Fragments), το οποίο εμφανίζεται κάτω από το κλάσμα των ώριμων ερυθροκυττάρων (RBC). Πηγή: <https://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/sysmex-parameters/fragmented-red-blood-cells-frc.html> (Τροποποιημένο)

### **RET (Reticulocytes, ΔΕΚ -Δικτυοερυθροκύτταρα)**

Η παρουσία δικτυοερυθροκυττάρων στο περιφερικό αίμα δίνει χρήσιμες πληροφορίες για την αξιολόγηση της ερυθροποιητικής δραστηριότητας του μυελού των οστών. (29)

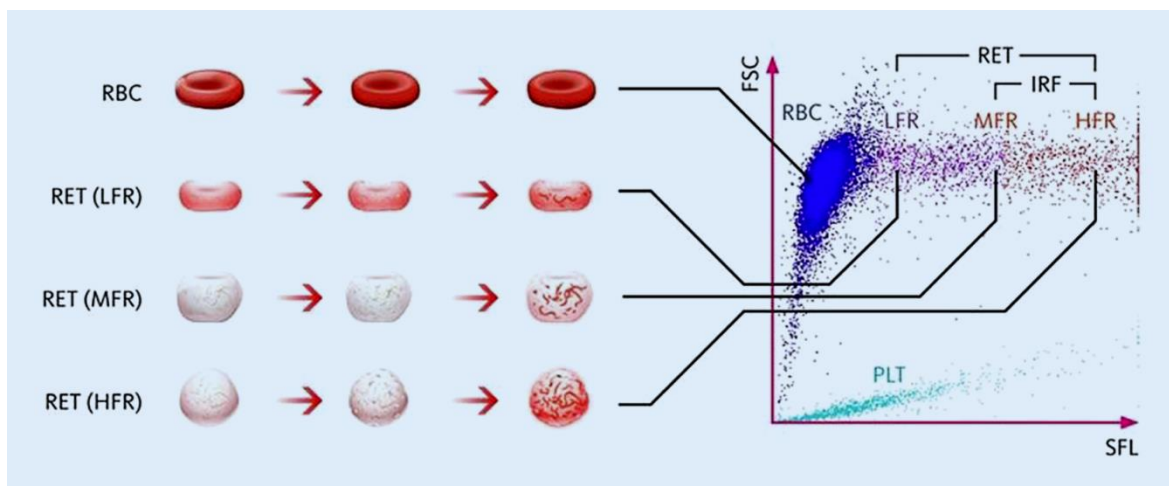
Στο κανάλι των δικτυοερυθροκυττάρων, τα ερυθρά αιμοσφαίρια χρωματίζονται με φθοριοχρώματα (πολυμεθίνη), τα οποία είναι εξειδικευμένα για το RNA, έπειτα μετρίεται η ένταση του φθορισμού με κυτταρομετρία ροής με laser ημιαγωγού στα 633nm. Η ένταση του φθορισμού διαφοροποιεί τα ώριμα ερυθροκύτταρα, τα οποία στερούνται RNA, από τα δικτυοερυθροκύτταρα τα οποία περιέχουν RNA. (30) Ανάλογα με την ωρίμανσή τους, τα δικτυοερυθροκύτταρα χωρίζονται στις παρακάτω τρεις κατηγορίες:

#### **Κλάσματα ωρίμανσης ΔΕΚ:**

***LFR – MFR – HFR (low – medium and high fluorescence reticulocytes, χαμηλά – μεσαία και υψηλά φθορίζοντα ΔΕΚ):*** Η ένταση του φθορισμού των δικτυοερυθροκυττάρων μας δίνει πληροφορίες σχετικά με το βαθμό της ωρίμανσής τους. Όσο εντονότερος είναι ο φθορισμός, τόσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση RNA, άρα τα δικτυοερυθροκύτταρα θεωρούνται τα πλέον άωρα. Η διακύμανση του βαθμού ωρίμανσης των δικτυοερυθροκυττάρων μας παρέχει τη δυνατότητα να εντοπίσουμε ακόμη και μικρές μεταβολές στην ερυθροποιητική δραστηριότητα. (29) Η παρουσία ανώριμων δικτυοερυθροκυττάρων στο περιφερικό αίμα μπορεί να αντιπροσωπεύει αύξηση στην ερυθροποιητική διαδικασία. Από μελέτες έχει φανεί ότι ανώριμα δικτυοερυθροκύτταρα μπορεί να κυκλοφορούν στο περιφερικό αίμα σε υγιή πληθυσμό ή και σε ασθενείς μετά από μεταμόσχευση μυελού των οστών. (29)

***IRF (Immature reticulocyte fraction, Κλάσμα άωρων ΔΕΚ):*** Από τους σημαντικότερους δείκτες, ο *IRF*, προσδίδει την ένταση της διέγερσης του ερυθροποιητικού μηχανισμού. Η αξιολόγηση του έχει φανεί ότι είναι απαραίτητο να γίνεται ταυτόχρονα με τον απόλυτο αριθμό των δικτυοερυθροκυττάρων, ο οποίος ουσιαστικά προσδίδει την άμεση ερυθροποιητική δραστηριότητα. (27, 31) Παθολογικές τιμές έχουν συσχετιστεί με ποσοτικές αλλαγές στην ερυθροποιητική διαδικασία (29). Ο *IRF* ουσιαστικά ισούται με το σύνολο των μεσαία φθορίζοντων δικτυοερυθροκυττάρων (*MFR*) και των υψηλά φθορίζοντων δικτυοερυθροκυττάρων (*HFR*). Μελέτες έχουν παρατηρήσει την αύξηση του *IRF* σε ασθενείς με Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα σε σχέση με ασθενείς με άλλου τύπου κυτταροπενίες. (32)

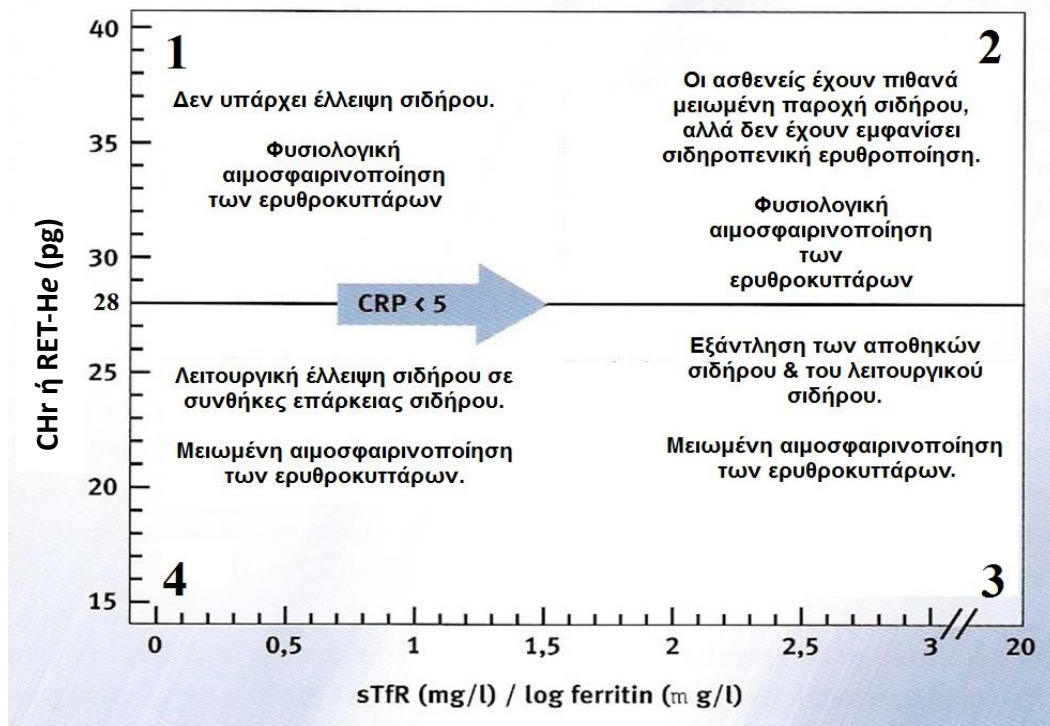




**Εικόνα 4** Νεφελόγραμμα ΔΕΚ. Απεικόνιση ΔΕΚ ανάλογα την ωρίμανσή τους. Στο νεφελόγραμμα, το κλάσμα των ώριμων ερυθρών (RBC) απεικονίζεται αριστερά και δεξιά αυτού απεικονίζονται τα Δικτυοερυθροκύτταρα χαμηλά (LFR) μεσαία (MFR) και υψηλά (HFR) φθορίζοντα αντίστοιχα. Πηγή: Sysmex, Kobe, Japan (Τροποποιημένο)

**RET-He (Reticulocyte haemoglobin content ή reticulocyte hemoglobin content – CHr [ADVIA 120, SIEMENS], Δείκτης αιμοσφαιρινοποίησης ΔΕΚ):** Η μέση συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης στα νεαρά δικτυοερυθροκύτταρα υπολογίζοντας την ενσωμάτωση του σιδήρου στην αιμοσφαιρίνη, εκφράζεται με το δείκτη *RET-He*. (33) Θεωρείται αξιόπιστος διαφοροδιαγνωστικός δείκτης ανάμεσα στην αναιμία χρόνιας νόσου (λειτουργική σιδηροπένια) και τη σιδηροπενική αναιμία. Η έγκαιρη αναγνώριση της λειτουργικής επάρκειας σιδήρου προς αιμοποίηση (34), καθώς επίσης η παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας είναι δύο σημαντικές πληροφορίες που προκύπτουν από τα επίπεδα του *RET-He*. (35) Συγκεκριμένα σε μεγαλοβλαστική αναιμία μετά τη χορήγηση βιταμίνης B12, μπορεί να αποκαλύψει την περίπτωση συνοδούς σιδηροπενίας, ενώ στη σιδηροπενική αναιμία μπορεί μέσα σε τρία 24ωρα να μας δείξει αν έχει αποτέλεσμα η θεραπευτική αγωγή καθώς και κατά πόσο είναι ουσιαστική η χορήγηση μόνο σιδήρου ή μόνο ερυθροποιητίνης ή συνδυασμού αυτών. (36)

Οι *Thomas and Thomas* παρουσίασαν το διαγνωστικό διάγραμμα σχετικά με τη διαφορική διάγνωση της αναιμίας, την επιλογή της θεραπείας καθώς και την παρακολούθηση της θεραπείας με σίδηρο και ερυθροποιητίνη (βλ. Εικ.5). Χρησιμοποίησαν τους βιοχημικούς δείκτες Φερριτίνη (*Ferritin*) και το Διαλυτό υποδοχέα Τρανφερίνης (*sTfR*) ως δείκτες παροχής σιδήρου και τον *RET-He* ή *CHr* ως δείκτη ζήτησης σιδήρου. (37)



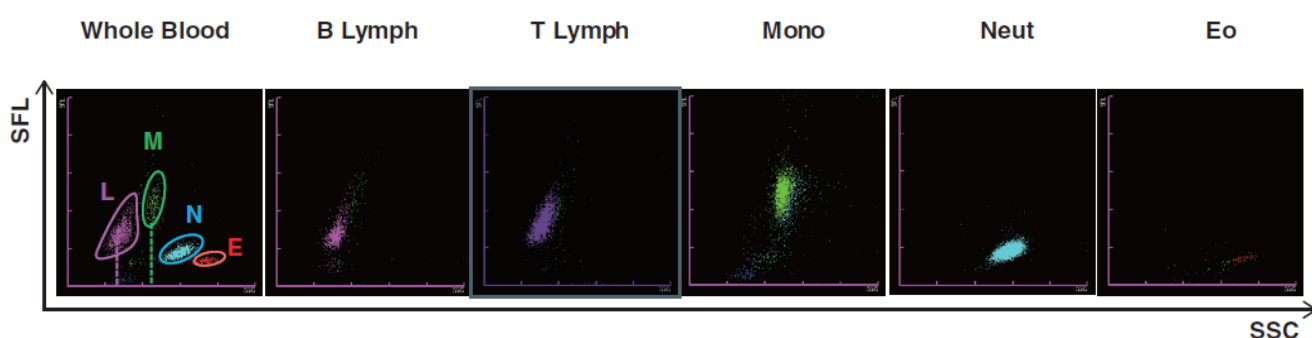
Εικόνα 5 Διαγνωστικό διάγραμμα των Thomas & Thomas. Στον κάθετο άξονα παρουσιάζεται ο Δείκτης αιμοσφαιρινοποίησης ΔΕΚ (RET-He) και στον οριζόντιο άξονα ο λόγος της Φερριτίνης (Ferritin) προς το Διαλυτό υποδοχέα Τρανσφερίνης (sTfR). Πηγή: Proceedings of the Sysmex European Symposium 2005 (Τροποποιημένο)

Μελέτες που έχουν γίνει σε παιδιά δείχνουν πως όταν δεν υπάρχει ανταπόκριση σε θεραπεία και η Γενική αίματος υποδεικνύει χαμηλό *RET-He* και φυσιολογικές τιμές απόλυτου αριθμού ερυθροκυττάρων, υποπτευόμαστε ετερόζυγη θαλασσαιμία. (35) Η σύσταση για χρήση του ως δείκτης φλεγμονής έχει στηριχθεί στη συσχέτιση της διαφοράς της περιεκτικότητας αιμοσφαιρίνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων με την περιεκτικότητα αιμοσφαιρίνης των δικτυοερυθροκυττάρων, με φλεγμονώδεις διαταραχές. (36)

### 1.3 Δείκτες μορφολογίας λευκών αιμοσφαιρίων

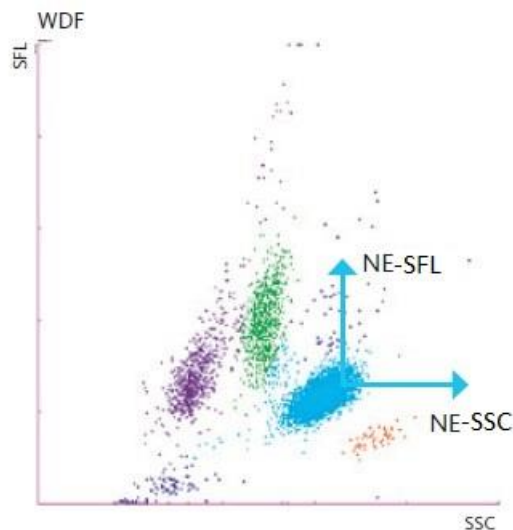
**WBC (White Blood Cells, Λευκά αιμοσφαίρια):** Τα λευκά αιμοσφαίρια είναι κύτταρα τα οποία έχουν τον πρωταρχικό ρόλο στην άμυνα του οργανισμού. Τα ώριμα κύτταρα που κυκλοφορούν στο περιφερικό αίμα χωρίζονται σε πέντε κατηγορίες: ουδετερόφιλα κοκκιοκύτταρα, βασεόφιλα κοκκιοκύτταρα, ηωσινόφιλα κοκκιοκύτταρα, μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα. Τα ουδετερόφιλα αποτελούν το 50%-70% των λευκοκυττάρων και αυξάνονται σε φλεγμονώδεις καταστάσεις. Τα ηωσινόφιλα συνιστούν το 2%-5% και αυξάνουν σε χρόνιες αλλεργίες καθώς και σε παρασιτώσεις. Τα βασεόφιλα είναι ελαφρώς μικρότερα από τα ουδετερόφιλα, έχουν χαρακτηριστικά μεγάλα κοκκία και εμφανίζονται σε πο-

σοστό <1%. Τα μονοκύτταρα συμβάλλουν στη φαγοκυττάρωση και αποτελούν το 3% με 6% του συνόλου. Τέλος, τα λεμφοκύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοσιακή απάντηση του οργανισμού και συνιστούν περίπου το 40%. Τα λευκοκύτταρα στους αυτόματους αναλυτές προσδιορίζονται με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής και τη χρήση ειδικών αντιδραστηρίων. Έπειτα από αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης των λευκοκυττάρων με τη χρήση ειδικού αντιδραστηρίου, η φθοριούχος χρωστική πολυμεθίνη βάφει τα νουκλεϊκά οξέα που βρίσκονται εντός των κυττάρων. Στο κανάλι WDF (*White Differential channel*) στον οριζόντιο άξονα απεικονίζεται ο πλάγιος σκεδασμός και στον κάθετο άξονα απεικονίζεται ο πλάγιος φθορισμός. (38) (βλ. Εικ. 6)



**Εικόνα 6** WDF Scattergram. Απεικόνιση λευκοκυττάρων. Στον κάθετο άξονα απεικονίζεται ο πλάγιος φθορισμός (SFL – Side fluorescence) και στον οριζόντιο ο πλάγιος σκεδασμός (SSC – Side scatter). B Lymph= B - Λεμφοκύτταρα, T Lymph= T – Λεμφοκύτταρα, Mono=Μονοκύτταρα, Neut=Ουδετερόφιλα (απεικονίζονται μαζί και τα Βασεόφιλα), Eo=Ηωσινόφιλα. Πηγή: *Systemex Journal International Vol24 No.1 (Τροποποιημένο)*

**NE-SCC (Neutrophils – Side Scatter, Ουδετερόφιλα – Πλάγιος σκεδασμός):** Για τη διαφορική καταμέτρηση των λευκοκυττάρων, τα κύτταρα αφού πρώτα αναμειχτούν με έναν παράγοντα ο οποίος αυξάνει τη διαπερατότητα της μεμβράνης, τα κύτταρα βάφονται με μια φθορίζουσα χρωστική (πολυμεθίνη) ανάλογα με το περιεχόμενό τους σε RNA/DNA. Στο κανάλι WDF (*White Differential channel*) στον οριζόντιο άξονα (NEUT-X) απεικονίζεται ο πλάγιος σκεδασμός των ουδετερόφιλων και μας δίδονται πληροφορίες σχετικά με την κοκκίωση, πολυπλοκότητα και λόβωση αυτών. (3) Ο NE-SCC από μελέτες έχει φανεί να είναι σημαντικά χαμηλότερος στους ασθενείς με Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα σε σχέση με ασθενείς με άλλου τύπου αιματολογικές ασθένειες είτε καλοήθειες είτε κακοήθειες. (39)



**Εικόνα 7** Νεφελόγραμμα WDF. Συντεταγμένες προσδιορισμού δεικτών NE-SFL και NE-SSC. Στον κάθετο άξονα y απεικονίζεται ο πλάγιος φθορισμός (SFL – Side fluorescence) (περιεχόμενο σε RNA/DNA), ενώ στον οριζόντιο άξονα x ο πλάγιος σκεδασμός (SSC – Side scatter) (κοκκίωση). Πηγή: <https://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/sysmex-parameters/neutrophil-activation.html> (Τροποποιημένο)

**NE-SFL (Neutrophils – Side Fluorescence, Ουδετερόφιλα – Πλάγιος φθορισμός):** Στο κανάλι WDF (White Differential channel), στον κάθετο άξονα (NEUT-Y) απεικονίζεται ο πλάγιος φθορισμός των ουδετερόφιλων και μας δίνει πληροφορίες σχετικά με το περιεχόμενο αυτών σε RNA/DNA. (3) Η σύσταση των λιπιδίων στην κυτταρική μεμβράνη των ουδετερόφιλων είναι διαφορετική όταν αυτά είναι ενεργοποιημένα, καθώς επίσης παρατηρείται αυξημένη δραστηριότητα στο κυτταρόπλασμα καθώς παράγονται κυτοκίνες. (40) Όταν υπάρχει αυξημένη μεταβολική δραστηριότητα των ουδετερόφιλων, περισσότερα νουκλεϊκά οξέα προσδένονται με τη φθορίζουσα χρωστική με αποτέλεσμα την αύξηση του πλάγιου φθορισμού και κατ' επέκταση αύξηση της τιμής του NE-SFL. (41) Από μελέτες έχει χαρακτηριστεί ως ένας πολλά υποσχόμενος διαγνωστικός δείκτης για τη σήψη (42) καθώς και ένας ουσιαστικός προγνωστικός δείκτης σχετικά με την ανάγκη μηχανικής υποστήριξης και θανάτου σε άτομα που πάσχουν από την νόσο COVID-19. (40) Έχει επίσης προταθεί ως δείκτης θρομβωτικών επεισοδίων, έπειτα από οξεία ανοσιακή απάντηση σε ασθενείς με COVID-19, ώστε να προβλεφθεί και αποφευχθεί η πολυοργανική ανεπάρκεια. (43)

**HFLC (Highly fluorescent lymphocytic cells, Λεμφοκύτταρα υψηλά φθορίζοντα):** Τα HFLC, όπως αναφέρει το όνομά τους, έχουν ως βασικό χαρακτηριστικό την υψηλή ένταση φθορισμού που εκπέμπουν. Αντιπροσωπεύουν λεμφοπλασματοειδή B λεμφοκύτταρα και πλασμοκύτταρα. (44), τα οποία είναι υπεύθυνα για τη χυμική ανοσιακή απάντηση. Σε

νοσήσαντες από COVID-19 έχει παρατηρηθεί η εμφάνισή τους περίπου μια εβδομάδα μετά την έναρξη των συμπτωμάτων, ως απάντηση στην πρωτεΐνη ακίδα (Spike protein) που βρίσκεται στο κυτταρικό τοίχωμα του ιού SARS-CoV-2. (45)

**IG (Immature granulocytes, Άωρα κοκκιοκύτταρα):** Η καταμέτρηση των πρόδρομων μορφών κοκκιοκυττάρων (προμυελοκύτταρα, μυελοκύτταρα και μεταμυελοκύτταρα) προσδιορίζεται με την παράμετρο IG. Εμφανίζονται στο κανάλι WDF πάνω από το κλάσμα των ουδετερόφιλων (46),(41) Η παρουσία τους στο περιφερικό αίμα δείχνει την αντίδραση του οργανισμού σε κάποια φλεγμονή (47), ακόμη και σε διέγερση του μυελού των οστών. Έχει χαρακτηριστεί ως πιθανός δείκτης για τη σήψη, καθώς και για την εξέλιξη της νόσου COVID-19 από σοβαρή σε κρίσιμη κατάσταση. (44)

#### 1.4 Αιμοπετάλια

Τα αιμοπετάλια αποτελούν θραύσματα κυττάρων με διάμετρο 2-4μm, τα οποία προέρχονται από τα μεγακαρυοκύτταρα του μυελού των οστών. Ο χρόνος ημίσειας ζωής τους είναι αρκετά μικρός, μόλις 8-9 ημέρες. (48) Έπειτα από ρήξη των ενδοθηλιακών κυττάρων, τα αιμοπετάλια συσσωρεύονται με σκοπό τη δημιουργία του αιμοπεταλιακού θρόμβου και την παύση της αιμορραγίας (πρωτογενής αιμόσταση). (11) Τα αιμοπετάλια είναι πολύπλοκα απύρρηνα κύτταρα και η κοκκίωσή τους ταξινομείται σε τρεις κατηγορίες: τα α-κοκκία, τα δ-κοκκία και τα λυσοσώματα. Τα α-κοκκία συγκροτούνται από τα μεγακαρυοκύτταρα, είναι απαραίτητα για την φυσιολογική λειτουργία των αιμοπεταλίων και περιέχουν διάφορες πρωτεΐνες, χημειοκίνες, κυτταροκίνες καθώς και αυξητικούς παράγοντες. Τα δ-κοκκία περιέχουν μικρά μόρια όπως σεροτονίνη, πολυφωσφορικά άλατα, γλουταμινικό, ισταμίνη και ασβέστιο τα οποία συμβάλλουν στην αιμόσταση. Τα λυσοσώματα των αιμοπεταλίων περιέχουν ένζυμα όπως γλυκοϋδρολάσες και ένζυμα που αποικοδομούν τις γλυκοπρωτεΐνες, τα γλυκολιπίδια και τις γλυκοζαμινογλυκάνες. (49)

Νεότερα δεδομένα δείχνουν ότι η λειτουργία των αιμοπεταλίων δεν περιορίζεται στην αιμόσταση, αλλά παίζει σημαντικό ρόλο και σε άλλες διαδικασίες όπως η πρωτεϊνική σύνθεση και η απόπτωση. Έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με ποικίλα κύτταρα στο ενδοθήλιο, συμμετέχοντας στην ανοσιακή απάντηση με την απελευθέρωση κυτταροκινών και χημειοκινών. (48) Επιπροσθέτως έχει παρατηρηθεί η πρόκληση θρομβοπενίας σε ιογενείς λοιμώξεις, η οποία ποικίλει ανάλογα με τη σοβαρότητα της λοίμωξης, όπως και η δημιουργία θρομβώσεων. (49) Συγκεκριμένα σε λοίμωξη COVID-19, τα αιμο-

πετάλια των ασθενών εμφανίζονται σημαντικά ενεργοποιημένα και δραστήρια, παίρνοντας μέρος σε διεργασίες, όπως τα θρομβωτικά επεισόδια, με αποτέλεσμα την απουσία τους από την κυκλοφορία και κατ' επέκταση τη μείωση του απόλυτου αριθμού των αιμοπεταλίων καθώς και του αιμοπεταλιοκρίτη (*PCT*) στη Γενική αίματος. (48)

## Κεφάλαιο 2. Σιδηροπενική αναιμία

### 2.1 Εισαγωγή

Η σιδηροπενική αναιμία είναι η πιο κοινή αιτία μικροκυτταρικής αναιμίας, με παγκόσμια κατανομή. Καταστάσεις ανεπάρκειας σιδήρου μπορεί να αναπτυχθούν λόγω αυξημένων μεταβολικών αναγκών σε σίδηρο ή λόγω ανεπαρκούς πρόσληψης ή και τα δύο.

Ο μεταβολισμός του σιδήρου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την επαναχρησιμοποίηση του σιδήρου που απελευθερώνεται έπειτα από την απόπτωση των γερασμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων. Η υπερβολική απώλεια αίματος αποτελεί την πιο συχνή αιτία πρόκλησης ανεπάρκειας σιδήρου. Η απώλεια αίματος μπορεί να οφείλεται σε αιμορραγία από το γαστρεντερικό σύστημα, το αναπαραγωγικό σύστημα (στις γυναίκες), το ουροποιητικό σύστημα και σπάνια το αναπνευστικό σύστημα.

Επιπλέον, σε καταστάσεις αυξημένων αναγκών, όπως κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και σε παιδιά που βρίσκονται στην ανάπτυξη, η ανεπαρκής πρόσληψη σιδήρου έχει συνδεθεί έντονα με την ανάπτυξη σιδηροπενικής αναιμίας.

### 2.2 Διάγνωση σιδηροπενίας

Η έλλειψη σιδήρου έχει προσδιοριστεί σε τρεις προοδευτικές καταστάσεις: (Βλ. Εικ.8)

- i. Εξάντληση αποθηκών σιδήρου: αυτή η κατάσταση μπορεί να προσδιοριστεί μόνο βάσει των παθολογικά χαμηλών επιπέδων φερριτίνης στον ορό του αίματος. Διαγνωστικό κριτήριο συνιστά η μείωση της φερριτίνης κάτω από το όριο των 13μg/dL για τις γυναίκες και των 30μg/dL για τους άντρες. Ο απόλυτος αριθμός των ερυθροκυττάρων καθώς και η αιμοσφαιρίνη κυμαίνονται σε φυσιολογικά επίπεδα.
- ii. Έλλειψη σιδήρου χωρίς αναιμία: σε αυτό το επίπεδο, οι τιμές της αιμοσφαιρίνης συνεχίζουν να βρίσκονται στα φυσιολογικά όρια, ενώ αρχίζουν να επηρεάζονται άλλες βιοχημικές και αιματολογικές παράμετροι. Παρατηρείται μείωση του κορεσμού τρανσφερίνης στον ορό, αλλά αυξημένο διαλυτό υποδοχέα Τρανσφερίνης (*sTfR*). Επίσης, παρατηρείται αύξηση του ποσοστού των υπόχρωμων ερυθροκυττάρων (%*Hypo-He*), αλλά μείωση της περιεκτικότητας σε αιμοσφαιρίνη των δικτυοερυθροκυττάρων (*Ret-He* ή *CHr*).

- iii. Σιδηροπενική αναιμία: σε αυτό το στάδιο, τα κλασικά βιοχημικά σημεία της σιδηροπενίας συνοδεύονται από τις αιματολογικές μεταβολές που χαρακτηρίζουν τη σιδηροπενική ερυθροποίηση, με αναιμία, μείωση των τιμών του *MCV*, *MCH* και *Ret-He*, και παράλληλη αύξηση του *RDW*.(50)

### Τα στάδια της σιδηροπενίας

	Εξάντληση αποθηκών σιδήρου	Σιδηροπενία με φυσιολογική Hb	Σιδηροπενική αναιμία
↓ Φερριτίνη ορού	→		
↓ Κορεσμός τρανσφερίνης		→	
↓ Αιμοσφαιρίνη (Hb)			→
↓ MCV			→
↑ sTfR	→		
↑ % HYP0		→	
↓ CHr ή RET-He	→		

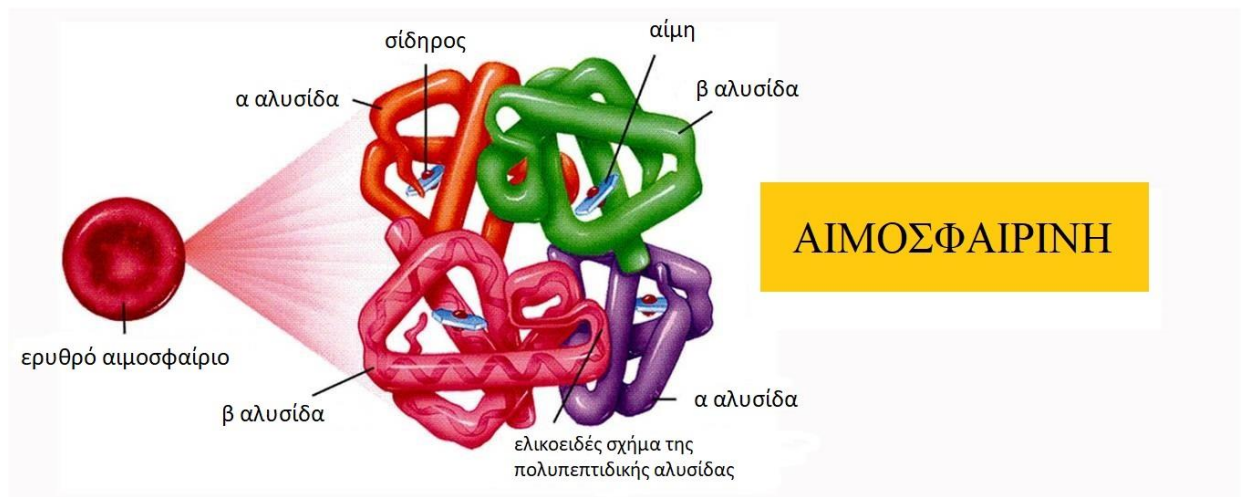
Εικόνα 8 Μεταβολές των βιοχημικών και των αιματολογικών παραμέτρων στα διάφορα στάδια της σιδηροπενίας. *MCV*: Μέσος όγκος ερυθροκυττάρων, *sTfR*: Διαλυτός υποδοχέας τρανσφερίνης, %Hyp0: ποσοστό υπόχρωμων ερυθροκυττάρων, *CHr* ή *Ret-He*: περιεκτικότητα αιμοσφαιρίνης στα δικτυοερυθροκύτταρα. Πηγή: (50) (Τροποποιημένο)



## Κεφάλαιο 3. Αιμοσφαιρινοπάθειες

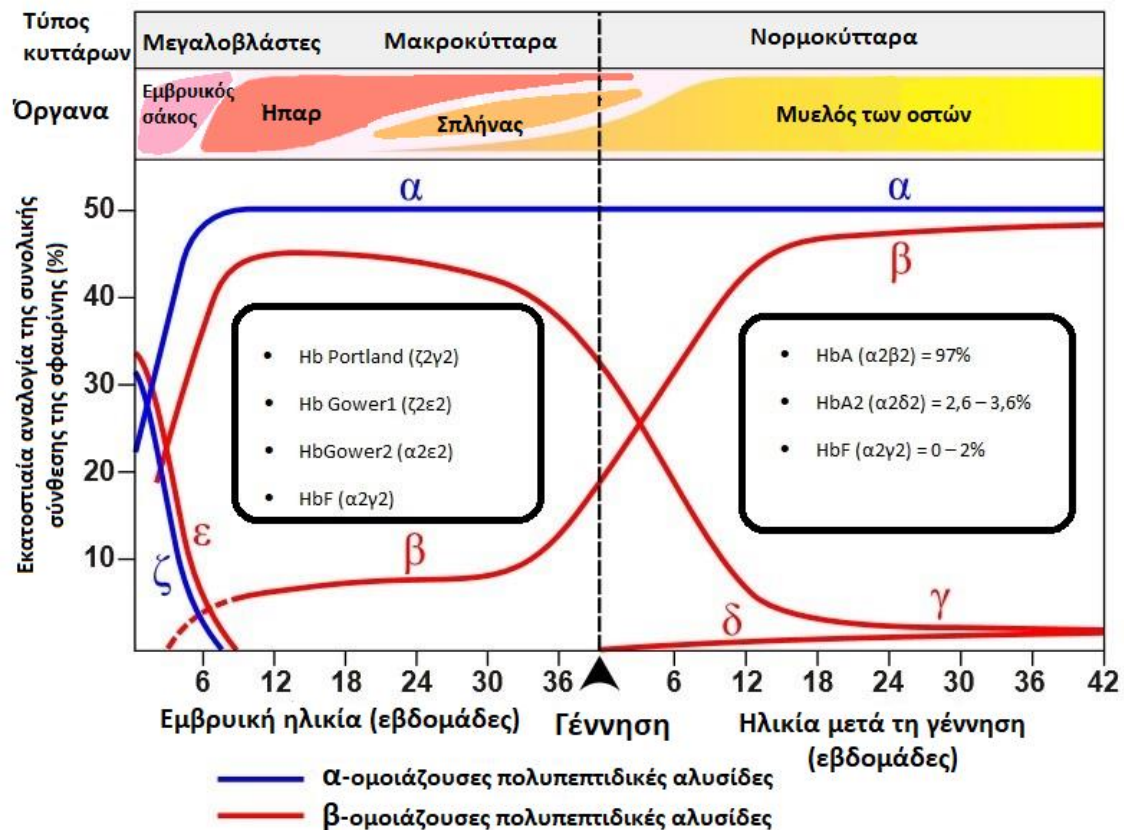
### 3.1 Εισαγωγή

Η αιμοσφαιρίνη, η οποία περιέχεται στα ερυθρά αιμοσφαίρια, είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά του οξυγόνου και του διοξειδίου του άνθρακα από τους πνεύμονες σε κάθε κύτταρο του οργανισμού και αντίστροφα. Κάθε ερυθροκύτταρο περιέχει  $250 \times 10^6$  μόρια αιμοσφαιρίνης. Το μόριο της αιμοσφαιρίνης αποτελείται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, ανά δύο όμοιες. Οι τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες σχηματίζουν το μόριο της σφαιρίνης, το οποίο συνδέεται με ένα μόριο αίμης αποτελούμενο από τέσσερις πυροπολικούς δακτυλίους. Στο κέντρο αυτών συνδέεται ένα άτομο σιδήρου. Οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες κωδικοποιούνται από γονίδια που βρίσκονται στο βραχύ σκέλος του χρωματοσώματος 11 και στο βραχύ σκέλος του χρωματοσώματος 16. (17)



Εικόνα 9 Δομή της αιμοσφαιρίνης Α. Πηγή: <https://fadic.net/haemoglobin/> (Τροποποιημένο)

Στους ενήλικες, φυσιολογικά, παρατηρούνται τρεις αιμοσφαιρίνες. Η αιμοσφαιρίνη Α σε ποσοστό 97-99%, αποτελούμενη από 2 αλυσίδες α και 2 αλυσίδες β ( $\alpha_2\beta_2$ ), η αιμοσφαιρίνη Α2 σε ποσοστό 2,6-3,6%, αποτελούμενη από 2 αλυσίδες α και 2 αλυσίδες δ ( $\alpha_2\delta_2$ ) και η αιμοσφαιρίνη F σε ποσοστό <2%, αποτελούμενη από 2 αλυσίδες α και 2 αλυσίδες γ ( $\alpha_2\gamma_2$ ). Η αιμοσφαιρίνη F παρατηρείται αυξημένη στους πρώτους μήνες της εμβρυικής ζωής, αλλά μειώνεται σταδιακά με ταυτόχρονη αύξηση της αιμοσφαιρίνης Α πριν από τη γέννηση. (17) Η κατάσταση αυτή ονομάζεται μεταστροφή (switch). (11) Οι μεταβολές στη σύνθεση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης αλλά και μετά τη γέννηση φαίνονται στην εικόνα 9.



Εικόνα 10 Μεταβολές πολυπεπτιδικών αλυσίδων από τη σύλληψη έως και μετά τη γέννηση. Πηγή: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Postnatal\\_genetics\\_en.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Postnatal_genetics_en.svg) (Τροποποιημένο)

Για την ορθή λειτουργία των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι απαραίτητο να είναι επαρκής η παραγωγή των πολυπεπτιδικών αλυσίδων, που περιγράφηκαν παραπάνω, για τη σύνθεση των απαιτούμενων μορίων αιμοσφαιρίνης καθώς και να είναι απόλυτα σταθερή η δομή τους. Διαταραχή των προϋποθέσεων αυτών προκαλεί μια κατηγορία νοσημάτων, τις λεγόμενες αιμοσφαιρινοπάθειες. (11)

Οι αιμοσφαιρινοπάθειες κατηγοριοποιούνται σε δύο μεγάλες ομάδες. Η πρώτη ομάδα αφορά τις *θαλασαιμίες*, στις οποίες παρατηρείται είτε ανεπαρκής σύνθεση ή ακόμη και απουσία σύνθεσης ενός τύπου αλυσίδας. Η δεύτερη ομάδα αφορά τις *παραλλαγές της αιμοσφαιρίνης*, όπου παρατηρούνται μεταβολές της δομής ενός τύπου αλυσίδας. Οι αλλαγές αυτές δημιουργούνται από μεταλλάξεις ή απώλεια των αντίστοιχων γονιδίων της σφαιρίνης. (11) Οι αιμοσφαιρινοπάθειες είναι γενετικές διαταραχές, οι οποίες κληρονομούνται από τους γονείς στα παιδιά με το «Μεντελικό υπολειπόμενο αυτοσωματικό» τύπο κληρονομικότητας. Αυτό σημαίνει ότι τα γονίδια που κληρονομούνται ορίζουν στο απόλυτο τη σύνθεση ή όχι φυσιολογικών αλυσίδων αιμοσφαιρίνης. (51) Τα ει-

δικά αυτά γονίδια ενεργοποιούνται και απενεργοποιούνται με σκοπό να συνθέσουν τους διαφορετικούς τύπους αιμοσφαιρίνης. (52) Ανάλογα με το αν μεταβιβάζονται το ένα παθολογικό γονίδιο ή και τα δύο παθολογικά γονίδια, εκφράζονται είτε ως ετερόζυγες είτε ως ομόζυγες καταστάσεις αντίστοιχα. (53)

## 3.2 Ταξινόμηση Αιμοσφαιρινοπαθειών

### 3.2.1 Θαλασσαιμίες

Οι αιμοσφαιρινοπάθειες, στις οποίες παρατηρούνται ποσοτικές διαταραχές στη σύνθεση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων της σφαιρίνης ονομάζονται θαλασσαιμίες και περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα διαταραχών που χαρακτηρίζονται από πλήρη ή μερική αναστολή σύνθεσης μιας ή περισσότερων αλυσίδων της αιμοσφαιρίνης. Οι θαλασσαιμίες ταξινομούνται ανάλογα με την αλυσίδα, η οποία εμφανίζει ανεπάρκεια ή απουσία σύνθεσης. (54) Επιγραμματικά οι θαλασσαιμίες χωρίζονται σε:

- α-θαλασσαιμία
- β-θαλασσαιμία
- δβ-θαλασσαιμία
- γ-θαλασσαιμία
- γδβ-θαλασσαιμία
- δ-θαλασσαιμία
- εγδβ-θαλασσαιμία

### 3.2.2 Παραλλαγές της αιμοσφαιρίνης

Οι παραλλαγές αιμοσφαιρίνης χαρακτηρίζονται από μεταβολές της δομής ενός ή του άλλου τύπου αλυσίδων (ποιοτικές διαταραχές) με επίπτωση στη λειτουργικότητά τους. Οι μεταβολές αφορούν την πρωτοταγή δομή των αλυσίδων, όπου υπάρχει αλλαγή στην αλληλουχία των αμινοξέων.

Οι παραλλαγές της αιμοσφαιρίνης που έχουν καταγραφεί και αφορούν τις β-αλυσίδες είναι πάνω από 300, ενώ αυτές που αφορούν τις α-αλυσίδες είναι πάνω από 200. Παγκόσμια κατανομή παρουσιάζουν η αιμοσφαιρίνη S, η αιμοσφαιρίνη C, η αιμοσφαιρίνη O<sub>ARAB</sub>, καθώς και η αιμοσφαιρίνη E. (11) Στη συγκεκριμένη εργασία θα ασχοληθούμε με τις εκδηλώσεις της αιμοσφαιρίνης S και της αιμοσφαιρίνης O<sub>ARAB</sub>, οι οποίες εμφανίζονται σε σημαντικά ποσοστά στη χώρα μας.

Οι παραλλαγές της αιμοσφαιρίνης είναι:

- Αιμοσφαιρίνη S ( $\beta 6$ , Glu→Val)
- Αιμοσφαιρίνη O-Arab (ή O-Θράκη), ( $\beta 121$ , Glu→Lys)
- Αιμοσφαιρίνη D-Punjab ( $\beta 121$ , Glu→Gln)
- Αιμοσφαιρίνη C ( $\beta 6$ , Glu → Lys)

Παραλλαγές της αιμοσφαιρίνης με θαλασσαιμικό προφίλ είναι οι:

- Αιμοσφαιρίνη Lepore (προϊόν σύντηξης δβ γονιδίων)
- Αιμοσφαιρίνη Knossos ( $\beta 27$ , Ala→Ser)
- Αιμοσφαιρίνη Constant Spring ( $\alpha 142$ , Term→Gln)
- Αιμοσφαιρίνη E ( $\beta 26$ , Glu→Lys)

Επιπλέον έχει περιγραφεί μια πληθώρα παραλλαγών αιμοσφαιρίνης, οι οποίες εμφανίζονται σε χαμηλά ποσοστά ανά την υφήλιο. Μερικές από αυτές είναι:

- Η κληρονομική παραμονή της Αιμοσφαιρίνης F, όπου παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα αιμοσφαιρίνης F σε ενήλικες, λόγω επίμονης σύνθεσης των  $\gamma$  αλυσίδων και μετά τη γέννηση.
- Αιμοσφαιρίνες με αυξημένη συγγένεια προς το οξυγόνο, παράδειγμα η HbChesapeake ( $\beta 92$ (FG4), Arg→Leu)
- Αιμοσφαιρίνες με μειωμένη συγγένεια προς το οξυγόνο, παράδειγμα η HbKansas ( $\beta 102$ (G4), Asn→Thr)
- Ασταθείς αιμοσφαιρίνες, παράδειγμα η HbDuarte ( $\beta 62$ (E6), Ala→Pro)
- Υπερασταθείς αιμοσφαιρίνες, παράδειγμα η HbQuon Sze ( $\alpha 125$ (H8), Leu→Pro)
- Αιμοσφαιρίνες M, σε αυτές τις περιπτώσεις προκαλείται οξείδωση των αλυσίδων προς μεθαιμοσφαιρίνη.
- Αιμοσφαιρίνες με αλυσίδες που έχουν περισσότερα ή λιγότερα του κανονικού αμινοξέα, παράδειγμα η HbTak.
- Αιμοσφαιρίνες με περισσότερες από μία παραλλαγές. (11)

## Κεφάλαιο 4. Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (ΜΔΣ)

### 4.1 Εισαγωγή

Τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα είναι νοσήματα του αίματος με εξαιρετική ετερογένεια. Η εμφάνισή τους προσδίδεται στη βλάβη ενός στελεχιαίου κυττάρου της μυελικής σειράς, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή δυσλειτουργικών κυττάρων της αντίστοιχης σειράς. (11) Τα κύτταρα που τελικά παράγονται, λόγω διαταραχών στην ωρίμανση και στη διαφοροποίησή τους, προκαλούν σημαντικές κυτταροπενίες στο περιφερικό αίμα. Η σπουδαιότητα των διαταραχών που προκαλούνται ποικίλει από ήπιας μορφής αναιμία μέχρι και αυξημένο κίνδυνο εκτροπής σε οξεία μυελογενή λευχαιμία (ΟΜΛ). (55)

Η βλάβη του στελεχιαίου κυττάρου μπορεί να είναι είτε πρωτοπαθής (*de novo MDS*), είτε δευτεροπαθείς, συνήθως μετά από χημειοθεραπευτικά σχήματα (*therapy related MDS*). (11) Οι κυριότερες χρωμοσωματικές ανωμαλίες είναι οι εξής: έλλειψη των μακρών σκελών του χρωμοσώματος 5 (*del(5q)*) (6%), μονοσωμία 7 και έλλειψη των μακρών σκελών του χρωμοσώματος 7 (*del(7q)*) (2%), τρισωμία 8 (4.5%), έλλειψη των μακρών σκελών του χρωμοσώματος 20 (*del(20q)*) (1.7%) και απώλεια του φυλετικού χρωμοσώματος Y (2%). (56)

Τα ΜΔΣ είναι ιδιαίτερα σπάνια στα παιδιά, ενώ παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα στις μεγάλες ηλικίες (>65 ετών), με μακριά όμως επιβίωση. Οι κλινικές εκδηλώσεις είναι στην αρχή ήπιες με κυμαινόμενη βαρύτητα, ενώ είναι συχνή η μετάπτωση σε οξεία μυελογενή λευχαιμία. (7)

### 4.2 Ταξινόμηση Μυελοδυσπλαστικών Συνδρόμων

Η 4<sup>η</sup> και τελική αναθεώρηση της ταξινόμησης των ΜΔΣ βάσει του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ) έγινε το 2008, εφόσον λήφθηκε υπόψη η δυνατότητα διάγνωσης σε αρκετά πιο πρώιμα στάδια. (βλ. Πιν. 1) (57)

Πίνακας 1 Ταξινόμηση ΜΔΣ κατά ΠΟΥ έτους 2008. Πηγή: (57)

Νόσος	Πλήρης Ονομασία	Ευρήματα στο Περιφερικό αίμα	Ευρήματα στο Μυελό των οστών
<b>RCUD</b>  <b>RA</b> <b>RN</b> <b>RT</b>	Ανθεκτική κυτταροπενία με μονογραμμική δυσπλασία Ανθεκτική αναιμία Ανθεκτική ουδετεροπενία Ανθεκτική θρομβοπενία	Κυτταροπενία μιας σειράς ή δύο σειρών Απουσία βλαστών ή βλάστες <1%	Μονογραμμική δυσπλασία στο $\geq 10\%$ των κυττάρων μιας σειράς Βλάστες <5% Δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες <15%
<b>RARS</b>	Ανθεκτική αναιμία με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες	Αναιμία Απουσία βλαστών	Δυσπλασία ερυθράς σειράς μόνο Βλάστες <5% Δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες $\geq 15\%$
<b>RCMD</b>	Ανθεκτική κυτταροπενία με πολυγραμμική δυσπλασία	Κυτταροπενία/ες Βλάστες <5% Απουσία ραβδίων Auer Μονοκύτταρα $<1 \times 10^9/L$	Δυσπλασία σε $\geq 10\%$ των κυττάρων δύο ή περισσότερων μυελικών σειρών Βλάστες <5% Δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες $\pm 15\%$ Απουσίας ραβδίων Auer
<b>RAEB-1</b>	Ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών-1	Κυτταροπενία/ες Βλάστες <5% Απουσία ραβδίων Auer Μονοκύτταρα $<1 \times 10^9/L$	Μονογραμμική ή πολυγραμμική δυσπλασία Βλάστες 5-9% Απουσία ραβδίων Auer
<b>RAEB-2</b>	Ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών-2	Κυτταροπενία/ες Βλάστες 5-19% Ραβδία Auer $\pm$ Μονοκύτταρα $<1 \times 10^9/L$	Μονογραμμική ή πολυγραμμική δυσπλασία Βλάστες 10-19% Ραβδίων Auer $\pm$
<b>MDS-U</b>	Αταξινόμητο ΜΔΣ	Κυτταροπενίες Βλάστες <1%	Δυσπλασία στο <10% των κυττάρων, αλλά με τυπική κυτταρογενετική ανωμαλία (βασική προϋπόθεση για διάγνωση ΜΔΣ) RCUD/RCMD με 1% βλάστες στο περιφερικό αίμα RCUD με παγκυτταροπενία
<b>MDS associated with isolated del(5q)</b>	ΜΔΣ σχετιζόμενο με μεμονωμένη έλλειψη των μακρών σκελών του χρωμοσώματος 5	Αναιμία Αιμοπετάλια φυσιολογικά ή αυξημένα Απουσία βλαστών ή βλάστες <1%	Φυσιολογικά ή αυξημένα μεγακαρουκύτταρα με υπολοβιωμένους πυρήνες Βλάστες <5% Μεμονωμένη κυτταρογενετική ανωμαλία del(5q) Απουσία ραβδίων Auer

## 4.3 Εργαστηριακά ευρήματα

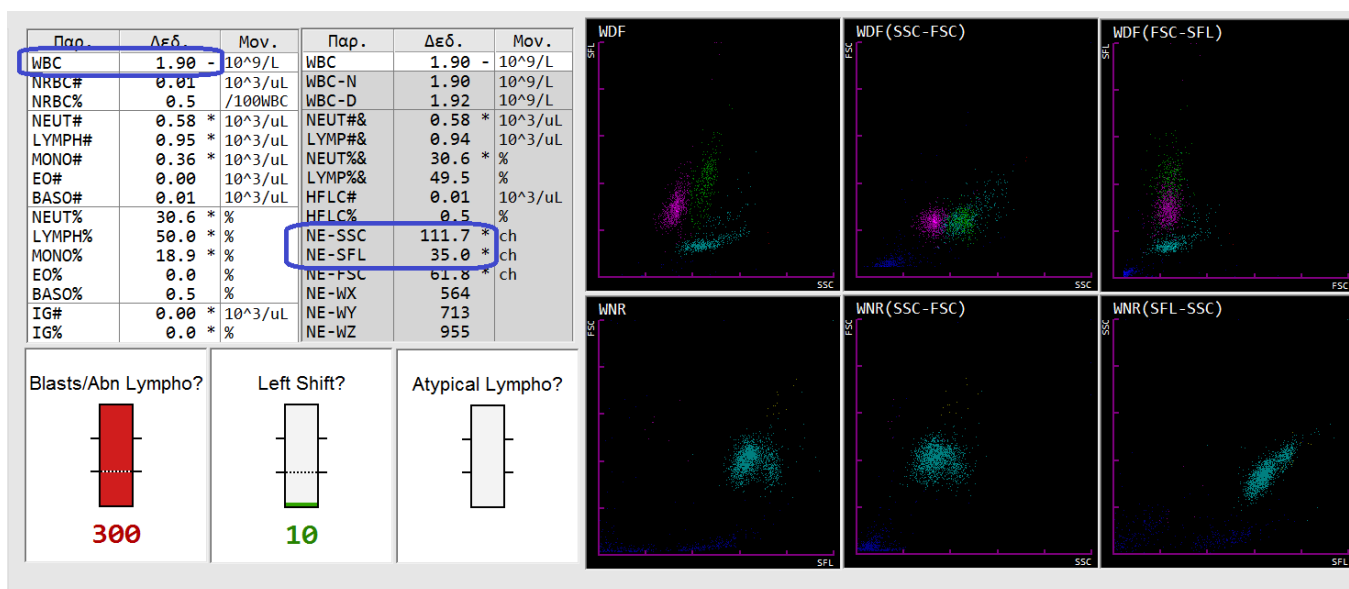
### 4.3.1 Γενικά

Τα ΜΔΣ εμφανίζονται στην αρχή με ήπια συμπτώματα, όπως αυτά της αναιμίας, των λοιμώξεων (λόγω της ουδετεροπενίας) ή των αιμορραγιών (λόγω της θρομβοπενίας), με

αποτέλεσμα η διάγνωση της νόσου να γίνεται συνήθως τυχαία, έπειτα από εξέταση της Γενικής αίματος σε τυχαίο έλεγχο. Λόγω της ετερογένειας της νόσου, σε άλλους ασθενείς τα συμπτώματα της αναιμίας είναι πιο έντονα, ενώ σε άλλους υπερτερούν οι λοιμώξεις ή οι μώλωπες και οι αιμορραγίες. Συχνότερα παρατηρείται διαταραχή της λειτουργικότητας των ουδετερόφιλων, των μονοπύρηνων και των αιμοπεταλίων. Τα λεμφοκύτταρα δεν παρουσιάζουν διαταραχές. (11)

Στο περιφερικό αίμα κύριο εύρημα είναι η πανκυτταραιμία. Σε ορισμένες περιπτώσεις εμφανίζεται δίμορφος πληθυσμός ερυθροκυττάρων με φυσιολογικά ερυθρά και υπόχρωμα μικροκύτταρα. Το RDW παρουσιάζεται με αυξημένες τιμές. Ενδιαφέρον προκαλούν και οι σποραδικές διαταραχές των ερυθροκυττάρων που εμφανίζονται χωρίς διαγνωστική σημασία, όπως η επανεμφάνιση της HbF, η επίκτητη HbH, η επίκτητη  $\alpha$  ή  $\beta$  θαλασσαιμία.

Τα ουδετερόφιλα είναι συνήθως μειωμένα και παρουσιάζουν μορφολογικές δυσπλασίες όπως μειωμένη κοκκίωση, με επίπτωση στη λειτουργικότητά τους. Χαρακτηριστικά είναι τα μειωμένα επίπεδα των ερευνητικών δεικτών NE-SSC (hypogranulation) και NE-SFL (μειωμένη χημειοταξία, φαγοκυττάρωση, προσκόλληση).



Εικόνα 11 Χαρακτηριστική κυτταροπενία σε ασθενή με Μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο. NE-SSC: Ουδετερόφιλα – πλάγιος σκεδασμός (κοκκίωση), NE-SFL: Ουδετερόφιλα – πλάγιος φθορισμός (μεταβολική δραστηριότητα). Πηγή: Αρχείο Αιματολογικού εργαστηρίου Γ.Ν. Ξάνθης (Τροποποιημένο)

Διάγνωση του Μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου θα πρέπει η αναλογία των δυσπλαστικών κυττάρων μιας ή περισσότερων αιμοποιητικών σειρών να είναι > 10%.

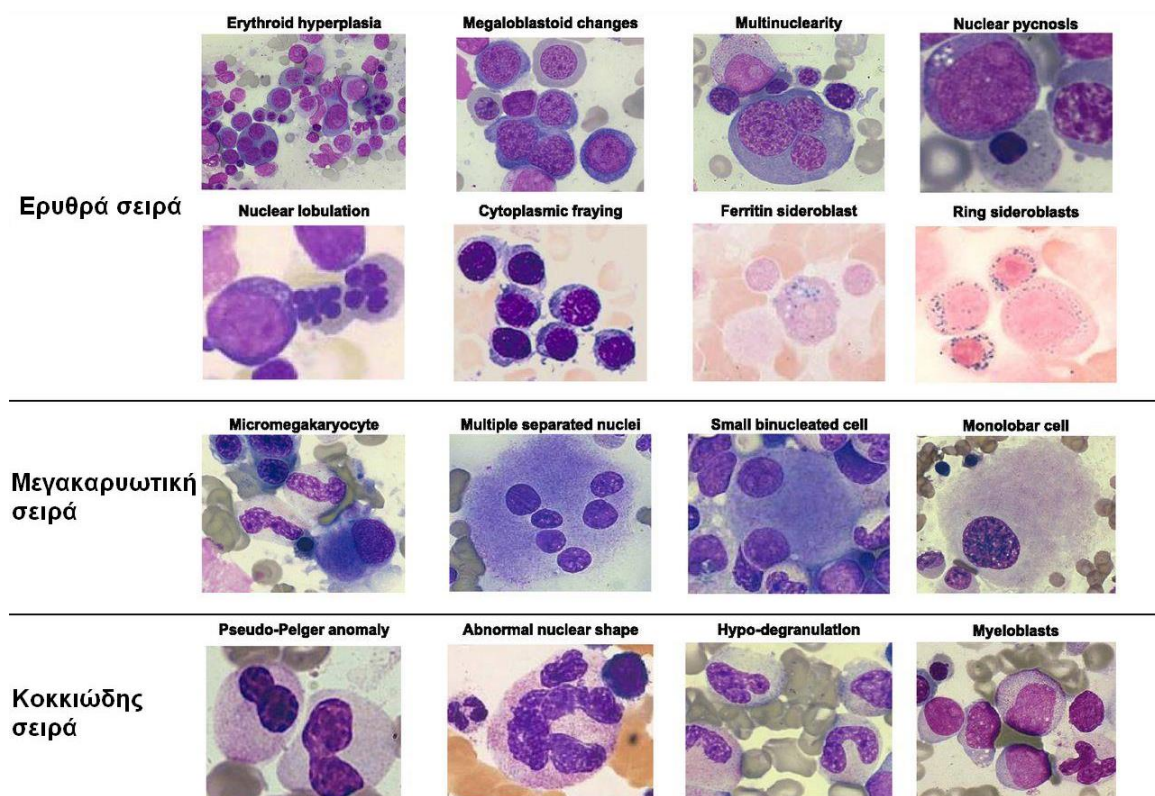


#### 4.3.2 Ανθεκτική κυτταροπενία με μονογραμική δυσπλασία (RCUD)

Στην Ανθεκτική κυτταροπενία με μονογραμική δυσπλασία, παρατηρείται δυσπλασία σε μια σειρά και το σύνδρομο ονομάζεται αντίστοιχα:

- **RA:** όταν παρατηρείται δυσπλασία μόνο στην ερυθρά σειρά.
- **RN:** όταν παρατηρείται δυσπλασία μόνο στην κοκκιώδη σειρά.
- **RT:** όταν παρατηρείται δυσπλασία μόνο στη μεγακαρυοκυτταρική σειρά.

Στο μυελό των οστών οι βλάστες είναι <5%, ενώ οι δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες σε ποσοστό <15%. Τα προγονικά κύτταρα της κοκκιώδους σειράς εμφανίζουν μείωση των πρωτογενών και δευτερογενών κοκκίων. Συχνά ανευρίσκονται κύτταρα που είναι δύσκολο να ταυτοποιηθούν είτε ως άκοκκα μυελοκύτταρα, μονοκύτταρα ή προμυελοκύτταρα. Τα μεγακαρυοκύτταρα είναι ανώμαλα με μικρό πυρήνα, μικρές διπύρνες ή πολυπύρνες μορφές. (58)



Εικόνα 12 Μορφολογικές ανωμαλίες στη μυελοδυσπλασία. Πηγή: Cazzola et al., Blood 2013; 122(5): 4021-4034 (Τροποποιημένο)

Στην ανθεκτική αναιμία με δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες οι μορφολογικές αλλοιώσεις αφορούν μόνο την ερυθρά σειρά και το ποσοστό των δακτυλιοειδών σιδηροβλαστών στο μυελό των οστών είναι >15%. Η όψη των δακτυλιοειδών ερυθροβλαστών



οφείλεται στην εναπόθεση σιδήρου στα μιτοχόνδρια των ερυθροβλαστών. Η περίσσεια σιδήρου στα μιτοχόνδρια των δακτυλιοειδών ερυθροβλαστών αποθηκεύεται με τη μορφή της μιτοχονδριακής φερριτίνης. Η μιτοχονδριακή φερριτίνη έχει δραστηριότητα φερροξειδάσης και επομένως είναι πιθανό να δεσμεύσει το δυνητικά επιβλαβή ελεύθερο σίδηρο. (59)

#### 4.3.3 Ανθεκτική κυτταροπενία με πολυγραμμική δυσπλασία (RCMD)

Η Ανθεκτική κυτταροπενία με δυσπλασία πολλών σειρών χαρακτηρίζεται από δυσπλασία σε δύο ή περισσότερες μυελικές σειρές (ερυθρά, κοκκιώδης, μεγακαρυοκυτταρική σειρά). Η παρουσία των βλαστών είναι <5% σε περιφερικό αίμα και μυελό των οστών. Οι δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες στο μυελό των οστών βρίσκονται σε ποσοστό  $\pm 15\%$ .

#### 4.3.4 Ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών (RAEB)

Η Ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών παρουσιάζει μορφολογικές δυσπλασίες σε μια ή περισσότερες κυτταρικές σειρές και χωρίζεται σε δυο κατηγορίες. Στην *RAEB-1*, στο περιφερικό αίμα τα βλαστικά κύτταρα είναι 1-5% και τα μονοκύτταρα <1000 ενώ στο μυελό των οστών τα βλαστικά είναι 5-9%. Στην *RAEB-2*, στο περιφερικό αίμα οι βλάστες μπορεί να είναι 6-19%. Τα μονοκύτταρα <1000/mm<sup>3</sup> ενώ ο μυελός φέρει βλαστικά κύτταρα 10-19%. (58)

#### 4.3.5 Αταξινόμητο ΜΔΣ (MDS-U)

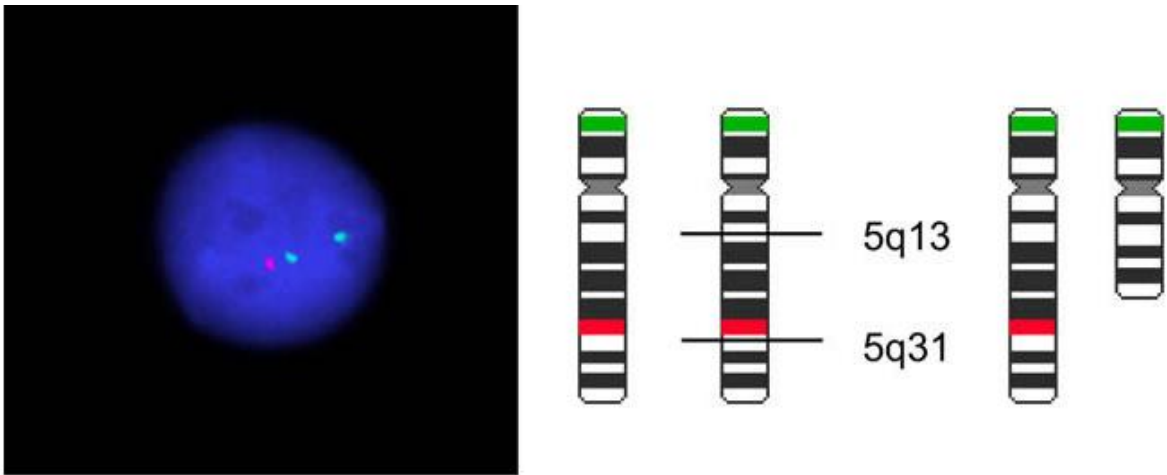
Στο Αταξινόμητο ΜΔΣ ανήκει ο τύπος του ΜΔΣ που δεν δύναται να καταταγεί σε μια από τις προηγούμενες κατηγορίες. Στα Αταξινόμητα Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα συμπεριλαμβάνονται οι παρακάτω περιπτώσεις:

- Ασθενείς με *RCUD* ή *RCMD* με βλάστες <1% στο περιφερικό αίμα.
- Ασθενείς με *RCUD* και πανκυτταροπενία
- Ασθενείς με επίμονη κυτταροπενία ή κυτταροπενίες, βλάστες σε ποσοστό < 1% στο περιφερικό αίμα και < 5% στο μυελό των οστών, ενώ είναι ξεκάθαρη η δυσπλασία σε ποσοστό < 10% των κυττάρων μιας ή περισσότερων μυελικών σειρών, με τυπικές κυτταρογεννητικές ανωμαλίες που υποδηλούν ΜΔΣ.

Οι ασθενείς αυτοί οφείλουν να παρακολουθούνται προσεκτικά και συχνά για την πιθανότητα μετάπτωσης σε κάποιον πιο ειδικό τύπο Μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου. (60)

4.3.6 Μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο με μεμονωμένη έλλειψη των μακρών σκελών του χρωμοσώματος 5 (*MDS del(5q)*)

Το σύνδρομο με απώλεια των μακρών σκελών του χρωμοσώματος 5 (*del-5q*), είναι πιο συχνό σε γυναίκες άνω των 60 ετών (σχέση γυναικών-αντρών 1:7). Τα εργαστηριακά ευρήματα είμαι συνήθως, μακροκυτταρική αναιμία, λευκοκύτταρα σε φυσιολογικά επίπεδα ή μειωμένα, ενώ αιμοπετάλια σε φυσιολογικά επίπεδα ή αυξημένα. Στο μυελό των οστών τα κύτταρα της ερυθράς σειράς είναι σε φυσιολογικά επίπεδα και παρατηρούνται βλάστες σε ποσοστό <5%. Χαρακτηριστική είναι η υπερπλασία της μεγακαρυοκυτταρικής σειράς με υπολοβωμένους πυρήνες. Οι ασθενείς παρουσιάζουν αναιμία η οποία δεν ανταποκρίνεται στη χορήγηση ερυθροποιητίνης, με αποτέλεσμα την ανάγκη συχνής ή και μόνιμης μετάγγισης αίματος. (61)



Εικόνα 13 Κυτταρογενετική ανάλυση (FISH). Με πράσινο φθοριόχρωμα έχει σημειωθεί το σημείο 5p15 και με κόκκινο το 5q31. Στη σχηματική απεικόνιση δεξιά φαίνονται τα σημεία τοποθέτησης των probes σε ένα φυσιολογικό χρωμόσωμα 5 και σε ένα χρωμόσωμα 5 με μεμονωμένη έλλειψη των μακρών σκελών. (62) (Τροποποιημένο)

## Κεφάλαιο 5. Ερευνητικό μέρος

### 5.1 Σκοπός

Η μεταπτυχιακή εργασία αφορά μια αναδρομική μελέτη από την 01/01/2020 μέχρι και 31/12/2022, όπου πραγματοποιήθηκε καταγραφή, από το αρχείο, περιστατικών που αφορούν αιμοσφαιρινοπάθειες, σιδηροπενική αναιμία και μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα, καθώς και υγιών ατόμων.

Τα δεδομένα αντλήθηκαν από την εξέταση «Γενική Αίματος» και συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν οι δείκτες μορφολογίας των ερυθροκυττάρων και των λευκοκυττάρων, όπως υπολογίζονται από τον αναλυτή, για στατιστική επεξεργασία. Τα δείγματα επιλέγονται βάση του Κωδικού Εντολής, ο οποίος στο φύλλο εργασίας θα μετατρέπεται σε αύξοντα αριθμό, ώστε να μη θίγονται τα προσωπικά δεδομένα του κάθε ασθενή. Τα μόνα επιπλέον στοιχεία που χρησιμοποιήθηκαν είναι η ηλικία (ως ακέραιος αριθμός) και το φύλο.

Η μελέτη θα επικεντρωθεί στη διαφοροδιαγνωστική αξία των δεικτών μορφολογίας των ερυθροκυττάρων σε διαλογή (screening) για αιμοσφαιρινοπάθειες. Παράλληλα θα επιχειρήσουμε να δημιουργήσουμε μία νέα φόρμουλα διαφοροδιαγνωστικού δείκτη, χρησιμοποιώντας τους νέους δείκτες μορφολογίας των ερυθροκυττάρων, που μας παρέχει ο αναλυτής *Systemex XN-1000*.

Τέλος, θα ασχοληθούμε με τη διαφοροδιαγνωστική αξία των δεικτών μορφολογίας των λευκοκυττάρων *NE-SSC* και *NE-SFL*, ανάμεσα σε υγιή πληθυσμό και σε άτομα με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα.

Η αναδρομική μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Αιματολογικό Τμήμα του Γενικού Νοσοκομείου Ξάνθης μετά από έγκριση του Διοικητικού Συμβουλίου του Νοσοκομείου (Αριθμός Απόφασης: 222/16-06-2022).

### 5.2 Μέθοδοι και Υλικά

Η πάγια πρακτική του Αιματολογικού Τμήματος του Γενικού Νοσοκομείου Ξάνθης για τη συλλογή δειγμάτων για τη διενέργεια των δοκιμασιών γίνεται έπειτα από αιμοληψία, σε φιαλίδια κενού αέρος τα οποία περιέχουν αντιπηκτικό K2 – EDTA 3,6mg, όσο αναφορά την εξέταση γενική αίματος, την ανάλυση κλασμάτων αιμοσφαιρίνης, ωσμωτικής αντί-

στασης και για λοιπές εξετάσεις για τον έλεγχο αιμοσφαιρινοπάθειας, καθώς και φιαλίδια χωρίς αντιπηκτικό (*Clot Activator Tubes*) για τις βιοχημικές και ανοσολογικές αναλύσεις. Η ανάλυση, όπως ορίζει το πρωτόκολλο του εργαστηρίου, πραγματοποιείται εντός 4 ωρών από τη συλλογή.

Για την εξέταση της Γενικής αίματος (*CBC*) και των Δικτυοερυθροκυττάρων χρησιμοποιείται ο αιματολογικός αναλυτής *Sysmex XN-1000* (*Sysmex Corporation, Kobe, Japan*), ο οποίος βασίζεται στην τεχνολογία της κυτταρομετρίας ροής με laser ημιαγωγού στα 633nm. Πραγματοποιείται εσωτερικός και ταυτόχρονος εξωτερικός έλεγχος ποιότητας, δύο φορές την εβδομάδα, τριών επιπέδων (*XN CHECK L1, L2 και L3*). Το εργαστήριο λαμβάνει μέρος στο σχήμα *SNCS IQAS Online*, όπου γίνεται αντιστοίχιση των αποτελεσμάτων των controls, κάθε φορά που πραγματοποιείται εσωτερικός έλεγχος ποιότητας, με αντίστοιχους αναλυτές παγκοσμίως (εξωτερικός έλεγχος ποιότητας).

Τα δεδομένα που αντλήθηκαν περιλαμβάνουν τις παραμέτρους ρουτίνας για τα ερυθρά αιμοσφαίρια, λευκά αιμοσφαίρια και συγκεκριμένα οι τιμές της αιμοσφαιρίνης (*Hgb*), *MCV*, *MCH*, *MCHC*, *RDW-SD* και *RDW-CV*, ο απόλυτος αριθμός των λευκοκυττάρων (*WBC*) και των αιμοπεταλίων (*PLT*). Σχετικά με τα ερυθροκύτταρα επεξεργάστηκαν οι ερευνητικές παράμετροι *Macro-R%*, *Micro-R%*, *Hypo-He%*, *Hyper-He%*, *FRC%*, *FRC#*, καθώς και από το κανάλι των Δικτυοερυθροκυττάρων, ο απόλυτος αριθμός αυτών (*RET#*), όπως και οι δείκτες *RET%*, *LFR*, *MFR*, *HFR*, *IRF%*, *RET-He*. Επιπλέον, σχετικά με τα λευκοκύτταρα αναλύθηκαν οι ερευνητικές παράμετροι *NE-SSC*, *NE-SFL*, *HFLC#*, *HFLC%*, *IG#* και *IG%*.

Τα επίπεδα της Φερριτίνης, της βιταμίνης B12 καθώς και του Φυλλικού οξέος προσδιορίστηκαν στον ορό του αίματος από τον ανοσολογικό αναλυτή *Cobas e411 Roche Hitachi* (*Roche Diagnostics, Basel, Switzerland*). Στον αναλυτή πραγματοποιείται εσωτερικός έλεγχος ποιότητας, όπως ορίζει η κατασκευαστική εταιρεία, καθώς και εξωτερικός έλεγχος ποιότητας (συμμετοχή στο πρόγραμμα *INSTAND External Quality Assessment Schemes*).

Η ανάλυση κλασμάτων αιμοσφαιρίνης πραγματοποιήθηκε στον αναλυτή *HLC-723 G11* (*Tosoh Corporation, Tokyo, Japan*) με σκοπό την καταγραφή των κλασμάτων της αιμοσφαιρίνης A<sub>2</sub> και των παραλλαγών αιμοσφαιρίνης, ειδικότερα της παθολογικής αιμοσφαιρίνης S και της παθολογικής αιμοσφαιρίνης O-ΘΡΑΚΗ (O-ARAB). Εσωτερικός έλεγχος

ποιότητας πραγματοποιείται με τη χρήση ενός θετικού και ενός αρνητικού μάρτυρα, κάθε φορά που γίνεται χρήση του αναλυτή. Το εργαστήριο συμμετέχει στο πρόγραμμα εξωτερικού ποιοτικού ελέγχου *INSTAND External Quality Assessment Schemes* με επιτυχία.

### 5.3 Ασθενείς

#### 5.3.1 Κριτήρια επιλογής δεδομένων

Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν αφορούν ασθενείς με επιβεβαιωμένη ετερόζυγη αιμοσφαιρινοπάθεια ή σιδηροπενία ή μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο.

Το κριτήριο για τη διάγνωση ετερόζυγης β-θαλασσαιμίας θεωρείται η αύξηση της Αιμοσφαιρίνης  $A_2$  πάνω από τα φυσιολογικά όρια, δηλαδή  $Hb A_2 > 3,5\%$ .

Η διάγνωση της ετερόζυγης αιμοσφαιρινοπάθειας Ο-Θράκη έγινε βάσει του χρόνου έκλυσης, για τον συγκεκριμένο αναλυτή και στήλη, αφού προηγήθηκε βαθμονόμηση με γνωστό δείγμα, μοριακά τεκμηριωμένο, αιμοσφαιρίνης Ο-Θράκη.

Η διάγνωση της ετερόζυγης α-θαλασσαιμίας τίθεται μόνο με μοριακές μεθόδους. Η κατάταξη του δικού μας πληθυσμού σε αυτή την κατηγορία έγινε βάσει των χαμηλών ερυθροκυτταρικών δεικτών MCV και MCH, καθώς και τη φυσιολογική ή μειωμένη Αιμοσφαιρίνη  $A_2$  ( $Hb A_2 < 2,5\%$ ). Επιπλέον λήφθηκε υπόψη η μορφολογία των ερυθροκυττάρων στο επίχρισμα του περιφερικού αίματος κατόπιν ειδικής χρώσης, όπου ανιχνεύτηκαν έγκλειστα σωμάτια HbH στα ερυθρά αιμοσφαίρια.

Οι ασθενείς με σιδηροπενία, οι οποίοι συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη, παρουσιάζουν επίπεδα Φερριτίνης χαμηλότερα από τα κατώτερα όρια τιμών αναφοράς για το φύλο και την ηλικία ( $< 13\text{ng/mL}$  στις γυναίκες και  $< 30\text{ng/mL}$  στους άντρες αντίστοιχα). Η ομάδα των ασθενών με σιδηροπενία υποδιαιρέθηκε σε δύο ομάδες, με κριτήριο το μειωμένο μέσο όγκο ερυθρών ( $MCV < 80\text{fL}$ ) και τη μειωμένη μέση περιεκτικότητα αιμοσφαιρίνης ( $MCH < 27\text{fL}$ ):

- ❖ Μικροκυτταρική σιδηροπενία, N=37
- ❖ Ορθοκυτταρική σιδηροπενία, N=69.

Τέλος, καταγράφηκαν δεδομένα από 108 περιπτώσεις ασθενών με Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα. Η διάγνωση είχε τεθεί βάσει των κριτηρίων που ορίζονται από την τελευταία ταξινόμηση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO 2008).

### 5.3.2 Διαχωρισμός ομάδων

Για τη μελέτη των ερυθροκυτταρικών και λευκοκυτταρικών δεικτών, από τα δεδομένα που αντλήθηκαν δημιουργήθηκαν τρεις ομάδες. Στην πρώτη ομάδα, η οποία ονομάστηκε M1, συμπεριλήφθηκαν 50 υγιή άτομα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου, 106 ασθενείς με σιδηροπενία και 84 άτομα με ετερόζυγη αιμοσφαιρινοπάθεια χωρισμένα σε τρεις κατηγορίες:

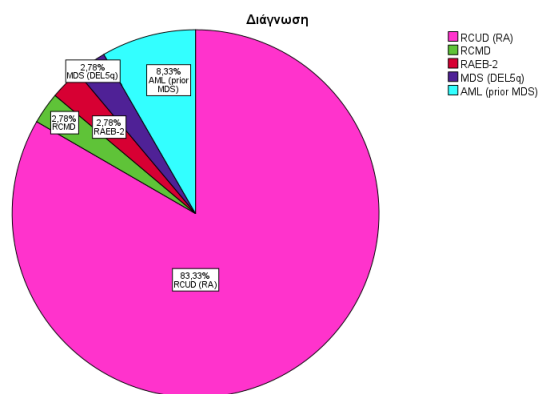
- ❖ Ετεροζυγώτες α-θαλασσαιμίας, N=10
- ❖ Ετεροζυγώτες β-θαλασσαιμίας, N=44
- ❖ Ετεροζυγώτες Ο-Θράκη (O-Arab), N=30

Η ομάδα M2 περιλαμβάνει τα δείγματα με μικροκυτταρική σιδηροπενία και τους ασθενείς με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία και ο πληθυσμός της είναι ο εξής:

- Μικροκυτταρική σιδηροπενία, N=37
- Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία, N=44

Οι 108 περιπτώσεις που αφορούν επιβεβαιωμένα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα υποδιαιρέθηκαν ανάλογα με την ταξινόμηση που ορίζει ο WHO (Ταξινόμηση του 2008) και η ομάδα M3 διαμορφώθηκε ως εξής (βλ. Εικ. 14):

- Ανθεκτική κυτταροπενία με μονογραμμική δυσπλασία (Ανθεκτική αναιμία) [RCUD (RA)], N=90
- Ανθεκτική κυτταροπενία με πολυγραμμική δυσπλασία [RCMD], N=3
- Ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών -2 [RAEB-2], N=3
- Μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο σχετιζόμενο με μεμονωμένη έλλειψη των μακρών σκελών του χρωμοσώματος 5 [MDS (DeL5q)], N=3
- Οξεία Μυελογενείς Λευχαιμία (με προηγμένη Μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο [AML (prior MDS)], N=9



Εικόνα 14 Εκατοστιαία αναλογία υποομάδων των Μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων. Πηγή: Προσωπικό αρχείο.

## 5.4 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του *SPSS for Windows Version 29.0.0* (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Η τιμή  $p < 0,05$  θεωρείται στατιστικά σημαντική για όλες τις δοκιμασίες. Εφαρμόστηκαν δοκιμασίες περιγραφικής στατιστικής (*Descriptive statistics*), *Independent sample T-test*, *One way-ANOVA (Tuckey post-hoc)*, *ROC Analysis*, από την οποία προήλθε η *AUC (Area Under the Curve)*. Η δοκιμασία *Crosstabs* εξήγαγε δεδομένα σχετικά με την Ευαισθησία (*Sensitivity%*), την Ειδικότητα (*Specificity%*), τη Θετική Προγνωστική Αξία (*Positive Predictive Value - PPV*) και την Αρνητική Προγνωστική Αξία (*Negative Predictive Value - NPV*). Το *Youden's index* υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\text{Youden's index} = (\text{sensitivity} + \text{specificity}) - 100$$

Ο δείκτης *Youden* είναι ένα μέτρο της ικανότητας μιας διαγνωστικής εξέτασης να εξισορροπήσει την ευαισθησία (ανίχνευση της νόσου) και την ειδικότητα (ανίχνευση της νόσου ή της απουσίας αυτής). Το σημείο αποκοπής (*cut-off*) για την ύπαρξη αποδεκτού δείκτη *Youden* είναι το 50%. Οποιαδήποτε τιμή κάτω του 50% υποδηλώνει συνολική έλλειψη της διαγνωστικής δοκιμασίας για την ανίχνευση είτε νόσου είτε απουσίας νόσου.

## 5.5 Αποτελέσματα

### 5.5.1 Ομάδα ελέγχου

Μέσω της περιγραφικής στατιστικής (*Descriptive statistics*) προσδιορίστηκαν τις τιμές αναφοράς του εργαστηρίου μας, οι οποίες ορίζονται ως το αποτέλεσμα της μέσης τιμής (*mean*) κάθε παραμέτρου, αφαιρώντας και προσθέτοντας δύο τυπικές αποκλίσεις ( $mean \pm 2SD$ ). (Βλ. Πιν. 2) . Η ομάδα ελέγχου προκύπτει από τη συλλογή δεδομένων 50 υγιών ατόμων (13 ανδρών και 37 γυναικών) με διάμεση ηλικία τα 32 έτη.

Πίνακας 2 Τιμές αναφοράς εργαστηρίου (mean±2SD). Macro-R%: εκατοστιαία αναλογία μακροκυτταρικών ερυθροκυττάρων, Micro-R%: %: εκατοστιαία αναλογία μικροκυτταρικών ερυθροκυττάρων, Hygro-He%:%: εκατοστιαία αναλογία υπόχρωμων ερυθροκυττάρων, Hyper-He%:%: εκατοστιαία αναλογία υπέρχρωμων ερυθροκυττάρων, IRF%: Κλάσμα άωρων δικτυοερυθροκυττάρων, RET-He: Συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης στα ΔΕΚ, NE-SSC: Ουδετερόφιλα – πλάγιος σκεδασμός και NE-SFL: Ουδετερόφιλα – πλάγιος φθορισμός.

Παράμετρος	Macro-R%	Micro-R%	Hygro-He%	Hyper-He%	IRF%	RET-He	NE-SSC	NE-SFL
Μέση τιμή (mean)	3,678	1,694	0,132	0,928	9,9160	35,0720	152,610	45,158
Τυπική απόκλιση (Std. Deviation)	0,3627	1,0265	0,1133	0,1262	3,98816	1,51940	3,5299	1,9099
Τιμές αναφοράς (mean±2SD)	2,9-4,4%	0-3,7%	0-0,4%	0,7-1,2%	1,9-17,9%	32,0-38,1 pg	145,6-159,7 SI	41,7-49,3 FI

Η δοκιμασία *Independent samples t-test* εφαρμόστηκε ώστε να αποδειχθεί ότι οι τιμές αναφοράς είναι ανεξάρτητες από το φύλο και την ηλικία. Παρατηρούμε ότι ο στατιστικός έλεγχος διασπορών με το κριτήριο *Levene* δίνει για κάθε παράμετρο τιμές  $p>0,05$  που δείχνει ότι η υπόθεση δεν απορρίπτεται. Συνεπώς δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στις διασπορές των δειγμάτων. (Βλ. Εικ. 15 και Εικ. 16)

Independent Samples Test											
Levene's Test for Equality of Variances						t-test for Equality of Means					
		F	Sig.	t	df	Significance		Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
						One-Sided p	Two-Sided p			Lower	Upper
Macro-R%	Equal variances assumed	2,441	,125	1,555	48	,063	,127	,1855	,1193	-,0544	,4255
	Equal variances not assumed			1,322	14,916	,103	,206	,1855	,1403	-,1137	,4848
Micro-R%	Equal variances assumed	,521	,474	,810	48	,211	,422	,2746	,3390	-,4071	,9562
	Equal variances not assumed			,737	16,156	,236	,472	,2746	,3726	-,5148	1,0639
Hypo-He%	Equal variances assumed	,263	,611	,336	48	,369	,738	,0127	,0379	-,0634	,0888
	Equal variances not assumed			,317	16,979	,377	,755	,0127	,0401	-,0719	,0973
Hyper-He%	Equal variances assumed	1,753	,192	,305	48	,381	,762	,0123	,0403	-,0687	,0932
	Equal variances not assumed			,370	27,181	,357	,714	,0123	,0332	-,0557	,0803
IRF%	Equal variances assumed	,268	,607	,005	48	,498	,996	,00702	1,44281	-2,89394	2,90797
	Equal variances not assumed			,005	21,586	,498	,996	,00702	1,32161	-2,73687	2,75091
RET-He	Equal variances assumed	,002	,967	,096	48	,462	,924	,04868	,50526	-,96722	1,06458
	Equal variances not assumed			,099	19,194	,461	,923	,04868	,49394	-,98444	1,08181
NE-SSC	Equal variances assumed	,810	,373	-,432	48	,334	,668	-,5066	1,1723	-2,8636	1,8505
	Equal variances not assumed			-,481	22,402	,318	,635	-,5066	1,0539	-2,6899	1,6767
NE-SFL	Equal variances assumed	1,338	,253	1,364	48	,089	,179	,8947	,6558	-,4239	2,2133
	Equal variances not assumed			1,487	21,524	,076	,151	,8947	,6016	-,3546	2,1440

Εικόνα 15 Δοκιμασία *Independent Samples t-Test*, όπου ορίζει ότι οι τιμές είναι ανεξάρτητες από το φύλο ( $p>0,05$ ). Πηγή: Προσωπικό αρχείο.



		Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances			t-test for Equality of Means						95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Significance One-Sided p	Two-Sided p	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper	
Macro-R%	Equal variances assumed	1,224	,274	,445	48	,329	,659	,0848	,1906	-,2985	,4681	
	Equal variances not assumed			,334	3,272	,379	,759	,0848	,2538	-,6862	,8557	
Micro-R%	Equal variances assumed	,250	,619	,340	48	,368	,735	,1837	,5400	-,9020	1,2694	
	Equal variances not assumed			,435	4,001	,343	,686	,1837	,4218	-,9874	1,3548	
Hypo-He%	Equal variances assumed	,142	,708	-,328	48	,372	,744	-,0196	,0596	-,1394	,1003	
	Equal variances not assumed			-,582	5,485	,292	,584	-,0196	,0336	-,1038	,0647	
Hyper-He%	Equal variances assumed	,486	,489	,873	48	,193	,387	,0576	,0660	-,0750	,1902	
	Equal variances not assumed			1,119	4,004	,163	,326	,0576	,0515	-,0853	,2005	
IRF%	Equal variances assumed	1,404	,242	-,563	48	,288	,576	-1,17826	2,09362	-5,38777	3,03125	
	Equal variances not assumed			-,438	3,296	,344	,689	-1,17826	2,69239	-9,32705	6,97052	
RET-He	Equal variances assumed	2,861	,097	,200	48	,421	,843	,15978	,79992	-1,44856	1,76813	
	Equal variances not assumed			,411	7,112	,347	,693	,15978	,38901	-,75716	1,07673	
NE-SSC	Equal variances assumed	1,142	,291	1,086	48	,141	,283	1,9946	1,8367	-1,6984	5,6875	
	Equal variances not assumed			1,408	4,035	,116	,231	1,9946	1,4166	-1,9253	5,9144	
NE-SFL	Equal variances assumed	,003	,956	1,284	48	,103	,205	1,2696	,8991	-,7191	3,2582	
	Equal variances not assumed			1,412	3,685	,118	,237	1,2696	,8991	-1,3133	3,8525	

Εικόνα 16 Δοκιμασία Independent Samples t-Test, όπου ορίζει ότι οι τιμές είναι ανεξάρτητες από την ηλικία ( $p > 0,05$ ). Πηγή: Προσωπικό αρχείο.

### 5.5.2 Ερυθροκυτταρικοί δείκτες

Υπολογίστηκε η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση για κάθε παράμετρο στις υποομάδες της ομάδας M1. Παρατηρήθηκαν ιδιαίτερα αυξημένες τιμές των παραμέτρων *Micro-R%* *Hyper-He%* και στον απόλυτο αριθμό των Δικτυοερυθροκυττάρων σε ασθενείς με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία. Ο δείκτης RET-He, παρόλο που είναι χαμηλός σε ασθενείς με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία και σε ασθενείς με σιδηροπενία, ανάμεσα στις δύο υποομάδες, έδειξε ακόμη χαμηλότερες τιμές σε ασθενείς με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία. (Βλ. Εικ. 17)

### Report

Διάγνωση	Macro-R%	Micro-R%	Hypo-He%	Hyper-He%	RET%	RET#	IRF%	RET-He
Control group	3,678	1,694	,132	,928	1,556	70,0800	9,9160	35,0720
Ετερόζυγη α-θαλασσαιμία	4,440	11,970	,610	,530	1,360	74,1000	8,5200	29,2100
Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	2,170	46,698	13,261	,227	1,707	97,4318	17,5114	21,8227
Ετερόζυγη Ο Θράκη	4,020	6,500	,343	,857	1,630	74,8000	13,7667	33,4300
Σιδηροπενία	3,327	9,456	4,039	,549	1,688	67,6321	20,1198	28,9160
Total	3,321	14,402	4,311	,607	1,643	74,7708	16,2383	29,4746

Εικόνα 17 Μέση τιμή (mean) παραμέτρων ανά υποομάδα. Πηγή: Προσωπικό αρχείο.

Εφαρμόστηκε η δοκιμασία *one-way ANOVA* για τις παραμέτρους *Macro-R%*, *Micro-R%*, *Hyper-R%*, *Hypo-He%*, *RET-He* και *IRF%*, αναφορικά με την ομάδα M1, όπου αποδείχθηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις υποομάδες ( $p < 0,05$ ). (Βλ. Εικ. 18)

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Macro-R%	Between Groups	91,802	4	22,950	43,299	<,001
	Within Groups	124,560	235	,530		
	Total	216,362	239			
Micro-R%	Between Groups	58493,099	4	14623,275	113,420	<,001
	Within Groups	30298,721	235	128,931		
	Total	88791,819	239			
Hypo-He%	Between Groups	5015,105	4	1253,776	13,920	<,001
	Within Groups	21166,367	235	90,070		
	Total	26181,472	239			
Hyper-He%	Between Groups	13,782	4	3,445	61,211	<,001
	Within Groups	13,228	235	,056		
	Total	27,009	239			
IRF%	Between Groups	4445,885	4	1111,471	24,861	<,001
	Within Groups	10506,383	235	44,708		
	Total	14952,267	239			
RET-He	Between Groups	4645,922	4	1161,481	80,655	<,001
	Within Groups	3384,133	235	14,401		
	Total	8030,055	239			

Εικόνα 18 Δοκιμασία one-way ANOVA. Εφόσον  $p < 0,05$ , δεχόμαστε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις υποομάδες. Πηγή: Προσωπικό αρχείο.

Η δοκιμασία *Tukey post-hoc*, ορίζει αναλυτικά τις διαφορές ανάμεσα στις υποομάδες. Μια πλήρης ανάπτυξη της δοκιμασίας υπάρχει στο Παράτημα Α. Προς παράδειγμα μπορούμε να σχολιάσουμε την εικόνα 19, στην οποία διακρίνουμε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p < 0,05$ ) στις τιμές της παραμέτρου *Micro-R%* ανάμεσα στην ετερόζυγη β-θαλασσαιμία και τις υπόλοιπες υποομάδες, υποδεικνύοντας έτσι τη σπουδαιότητα του δείκτη αυτού στη διαφορική διάγνωση.

		Sig.					
Micro-R%	Control group	Ετερόζυγη α-θαλασσαιμία	-10,2760	3,9334	,071	-21,089	,537
		Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	-45,0037*	2,3471	<,001	-51,456	-38,551
		Ετερόζυγη Ο Θράκη	-4,8060	2,6223	,357	-12,015	2,403
		Σιδηροπενία	-7,7617*	1,9481	<,001	-13,117	-2,406
	Ετερόζυγη α-θαλασσαιμία	Control group	10,2760	3,9334	,071	-,537	21,089
		Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	-34,7277*	3,9779	<,001	-45,663	-23,792
		Ετερόζυγη Ο Θράκη	5,4700	4,1462	,679	-5,928	16,868
		Σιδηροπενία	2,5143	3,7562	,963	-7,812	12,841
	Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	Control group	45,0037*	2,3471	<,001	38,551	51,456
		Ετερόζυγη α-θαλασσαιμία	34,7277*	3,9779	<,001	23,792	45,663
		Ετερόζυγη Ο Θράκη	40,1977*	2,6885	<,001	32,807	47,589
		Σιδηροπενία	37,2421*	2,0363	<,001	31,644	42,840
	Ετερόζυγη Ο Θράκη	Control group	4,8060	2,6223	,357	-2,403	12,015
		Ετερόζυγη α-θαλασσαιμία	-5,4700	4,1462	,679	-16,868	5,928
		Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	-40,1977*	2,6885	<,001	-47,589	-32,807
		Σιδηροπενία	-2,9557	2,3482	,717	-9,411	3,500
Σιδηροπενία	Control group	7,7617*	1,9481	<,001	2,406	13,117	
	Ετερόζυγη α-θαλασσαιμία	-2,5143	3,7562	,963	-12,841	7,812	
	Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	-37,2421*	2,0363	<,001	-42,840	-31,644	
	Ετερόζυγη Ο Θράκη	2,9557	2,3482	,717	-3,500	9,411	

Εικόνα 19 Απόσπασμα δοκιμασίας *Tukey post-hoc*. Παρατηρούμε ότι το  $p < 0,05$ , οπότε δεχόμαστε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στις τιμές του δείκτη *Micro-R%* ανάμεσα στους ασθενείς με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία και τα δείγματα των υπόλοιπων υποομάδων. Πηγή: Προσωπικό αρχείο.

Από το Παράρτημα Α βλέπουμε στατιστικά σημαντικές διαφορές των αποτελεσμάτων των παραμέτρων *Macro-R%*, *Micro-R%*, *Hyper-R%*, *Hypo-He%*, *RET-He* και *IRF%*, ανάμεσα στην ετερόζυγη β-θαλασσαιμία και τη μικροκυτταρική σιδηροπενία.

Έπειτα από αυτή την παρατήρηση, πραγματοποιήθηκαν *ROC* αναλύσεις των δεικτών *Macro-R%*, *Micro-R%*, *Hyper-R%*, *Hypo-He%*, *RET-He* και *IRF%*, για την αξιολόγησή τους σχετικά με τη διαφορική διάγνωση της ετερόζυγης β-θαλασσαιμίας σε πληθυσμό με μικροκυττάρωση, έναντι της μικροκυτταρικής σιδηροπενίας (ομάδα M2).

Από τα αποτελέσματα της ανάλυσης προκύπτει ότι στον πληθυσμό που είχαμε διαθέσιμο, οι δείκτες *Micro-R%* και *Hypo-He%* έχουν αυξημένες τιμές στους ασθενείς με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία, ενώ οι υπόλοιποι δείκτες έχουν μειωμένες τιμές σε σχέση με τις περιπτώσεις μικροκυτταρικής σιδηροπενίας. Τα δεδομένα που προέκυψαν φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 3.

Επιπλέον, εξετάστηκε μια νέα φόρμουλα ως διαφοροδιαγνωστικός δείκτης για την ετερόζυγη β-θαλασσαιμία σε πληθυσμό με μικροκυττάρωση συγκριτικά με τη μικροκυτταρική σιδηροπενία. Στη φόρμουλα  $MHRF100 [(Micro-R\% - Hypo-He\%) + (RET-He / Fer) / 100]$  που δημιουργήσαμε, εφαρμόστηκε η δοκιμασία *One-way Anova* (βλ. Εικ. 20), όπου αποδεικνύεται ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p < 0,05$ ) ανάμεσα στις δύο υποομάδες (ετερόζυγη β-θαλασσαιμία και μικροκυτταρική σιδηροπενία).

#### ANOVA

(MicroR-HypoHe) + (REthe / FER) / 100

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10263,475	1	10263,475	72,353	<,001
Within Groups	10922,720	77	141,854		
Total	21186,195	78			

Εικόνα 20 Δοκιμασία *One-way ANOVA* φόρμουλας *MHRF100* ανάμεσα σε ασθενείς με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία και μικροκυτταρική σιδηροπενία. Πηγή: Προσωπικό αρχείο.

Από τη δοκιμασία *ROC-Curve* η *AUC* είναι 0,920 (0,852-0,987) (βλ. Εικ. 21 και 22) και από τις συντεταγμένες της καμπύλης επιλέχθηκε ως καλύτερο *cut-off* η τιμή 16,47.

**Area Under the Curve**

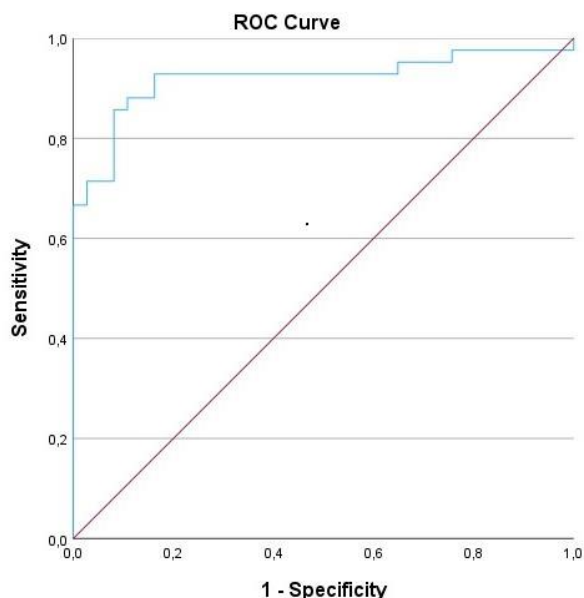
Test Result Variable(s): (MicroR-HypoHe) + (REThe / FER) / 100

Area	Std. Error <sup>a</sup>	Asymptotic Sig. <sup>b</sup>	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
,920	,035	,000	,852	,987

a. Under the nonparametric assumption

b. Null hypothesis: true area = 0.5

Εικόνα 21 Αποτελέσματα καμπύλης ROC φόρμουλας MHRF100. Η Area Under the Curve είναι 0,920. Πηγή: Προσωπικό αρχείο.



Εικόνα 22 ROC-Curve φόρμουλας MHRF100. Πηγή: Προσωπικό αρχείο.

Προκειμένου να διαπιστωθεί η διαφοροδιαγνωστική αξία της φόρμουλας εφαρμόστηκε η δοκιμασία *Crosstabs*. (Βλ. Εικ. 23) Ανάμεσα σε 81 δείγματα με μικροκυττάρωση, τα 39 δείγματα ορθά διαγνώστηκαν ως ετερόζυγη β-θαλασσαιμία (*true positive*), ενώ μόλις 6 λανθασμένα με μικροκυτταρική σιδηροπενία (*false positive*). Αντίστοιχα, 3 δείγματα λανθασμένα διαγνώστηκαν ως ετερόζυγη β-θαλασσαιμία (*false negative*), ενώ 31 ορθά με μικροκυτταρική σιδηροπενία (*true negative*), σε 2 δείγματα έλλειπαν δεδομένα και εξαιρέθηκαν από τη δοκιμασία.

**(MicroR%-HypoHe%) + (REThe / FER) / 100 \* Διάγνωση Crosstabulation**

			Διάγνωση		Total
			Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	Σιδηροπενία μικροκυτταρική	
(MicroR%-HypoHe%) + (REThe / FER) / 100	1	Count	39	6	45
		% within (MicroR%-HypoHe%) + (REThe / FER) / 100	86,7%	13,3%	100,0%
		% within Διάγνωση	92,9%	16,2%	57,0%
	2	Count	3	31	34
		% within (MicroR%-HypoHe%) + (REThe / FER) / 100	8,8%	91,2%	100,0%
		% within Διάγνωση	7,1%	83,8%	43,0%
Total	Count	42	37	79	
	% within (MicroR%-HypoHe%) + (REThe / FER) / 100	53,2%	46,8%	100,0%	
	% within Διάγνωση	100,0%	100,0%	100,0%	

Εικόνα 23 Δοκιμασία *Crosstabs* φόρμουλας MHRF100. Sensitivity 92,9%, Specificity 83,8%, PPV 86,7%, NPV 91,2%. Πηγή: Προσωπικό αρχείο.

Μέσω της δοκιμασίας *Crosstabs*, η φόρμουλα [MHRF100] που επιχειρήσαμε φαίνεται να έχει 92,9% ευαισθησία, 83,8% ειδικότητα, *positive predictive value (PPV)* 86,7% και *negative predictive value (NPV)* 91,2%. Το *Youden's index* είναι 76,6%. *Youden's index* μεγαλύτερα του 50% θεωρούνται αξιόπιστοι διαφοροδιαγνωστικοί δείκτες για την πρόγνωση νόσου.

Πίνακας 3 Area Under the Curve (AUC), Ευαισθησία, Ειδικότητα, Positive Predictive Value (PPV), Negative Predictive Value (NPV) και Youden's index στις ομάδες ετερόζυγης β-θαλασσαιμίας (β-TT) και μικροκυτταρικής σιδηροπενίας (IDA).

Παράμετρος	AUC (95%CI)	Cut-off	Ευαισθησία (Sensitivity%)	Ειδικότητα (Specificity%)	PPV (%)	NPV (%)	Youden's index
Macro-R%	0,763 (0,656-0,870)						47,9
β-TT		<2,25	61,4	86,5	84,4	65,3	
IDA		>2,25	86,5	61,4	65,3	84,4	
Micro-R%	0,863 (0,781-0,945)						61,2
β-TT		>24,4	90,9	70,3	78,4	86,7	
IDA		<24,4	70,3	90,9	86,7	78,4	
Hypo-He%	0,627 (0,503-0,750)						28,5
β-TT		>6,6	63,6	64,9	68,3	60,0	
IDA		<6,6	64,9	63,6	60,0	68,3	
Hyper-He%	0,701 (0,576-0,827)						45,0
β-TT		<0,35	90,9	54,1	70,2	83,3	
IDA		>0,35	54,1	90,9	83,3	70,2	
IRF%	0,591 (0,464-0,718)						22,7
β-TT		<20,05	65,9	56,8	64,4	58,3	
IDA		>20,05	56,8	65,9	58,3	64,4	
RET-He	0,673 (0,548-0,799)						36,4
β-TT		<25,55	93,2	43,2	66,1	84,2	
IDA		>25,55	43,2	93,2	84,2	66,1	
MHRF100	0,920 (0,852-0,987)						76,6
β-TT		>16,47	92,9	83,8	86,7	91,2	
IDA		<16,47	83,8	92,9	91,2	86,7	

### 5.5.3 Λευκοκυτταρικοί δείκτες

Ο υπολογισμός της μέσης τιμής των παραμέτρων *NE-SSC* και *NE-SFL* δείχνει μειωμένες τιμές σε ασθενείς με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα σε σχέση με τον υγιή πληθυσμό. (Βλ. Εικ.24)

		Descriptives							
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
NE-SSC	MDS	108	149,942	7,5811	,7295	148,496	151,388	111,7	166,0
	CONTROL GROUP	50	152,610	3,5299	,4992	151,607	153,613	144,6	161,4
	Total	158	150,786	6,6789	,5313	149,737	151,836	111,7	166,0
NE-SFL	MDS	108	45,366	4,4003	,4234	44,526	46,205	33,6	62,3
	CONTROL GROUP	50	45,518	1,9099	,2701	44,975	46,061	42,4	49,8
	Total	158	45,414	3,7867	,3013	44,819	46,009	33,6	62,3

Εικόνα 24 Μέση τιμή δεικτών *NE-SSC* (Ουδετερόφιλα – πλάγιος σκεδασμός) και *NE-SFL* (Ουδετερόφιλα – πλάγιος φθορισμός), ανάμεσα σε υγιή πληθυσμό και σε ασθενείς με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα. Πηγή: Προσωπικό αρχείο.

Διαφορές παρατηρούνται και ανάμεσα στις υποομάδες των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων. Μικρότερη διαφορά παρατηρείται ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου και στην υποομάδα με Ανθεκτική κυτταροπενία με μονογραμμική δυσπλασία (Ανθεκτική αναιμία) [RCUD (RA)]. Οι ασθενείς με Ανθεκτική αναιμία παρουσιάζουν δυσπλασία μόνο στην ερυθρά σειρά, οπότε οι λευκοκυτταρικοί δείκτες είναι αναμενόμενο να μην επηρεάζονται ιδιαίτερα. (Βλ. Εικ. 25)

		Descriptives							
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
NE-SSC	RCUD (RA)	90	150,537	5,3557	,5645	149,415	151,658	137,1	161,6
	RCMD	3	155,700	12,4952	7,2141	124,660	186,740	141,8	166,0
	RAEB-2	3	139,100	26,3689	15,2241	73,596	204,604	111,7	164,3
	MDS (DEL5q)	3	142,933	13,3800	7,7249	109,696	176,171	130,1	156,8
	AML (prior MDS)	9	148,022	10,4362	3,4787	140,000	156,044	133,8	160,0
	CONTROL GROUP	50	152,610	3,5299	,4992	151,607	153,613	144,6	161,4
	Total	158	150,786	6,6789	,5313	149,737	151,836	111,7	166,0
NE-SFL	RCUD (RA)	90	45,211	3,1218	,3291	44,557	45,865	33,9	53,0
	RCMD	3	50,100	3,0512	1,7616	42,520	57,680	47,0	53,1
	RAEB-2	3	48,267	13,6661	7,8901	14,318	82,215	35,0	62,3
	MDS (DEL5q)	3	42,767	8,4388	4,8721	21,804	63,730	37,5	52,5
	AML (prior MDS)	9	45,233	8,3275	2,7758	38,832	51,634	33,6	56,8
	CONTROL GROUP	50	45,518	1,9099	,2701	44,975	46,061	42,4	49,8
	Total	158	45,414	3,7867	,3013	44,819	46,009	33,6	62,3

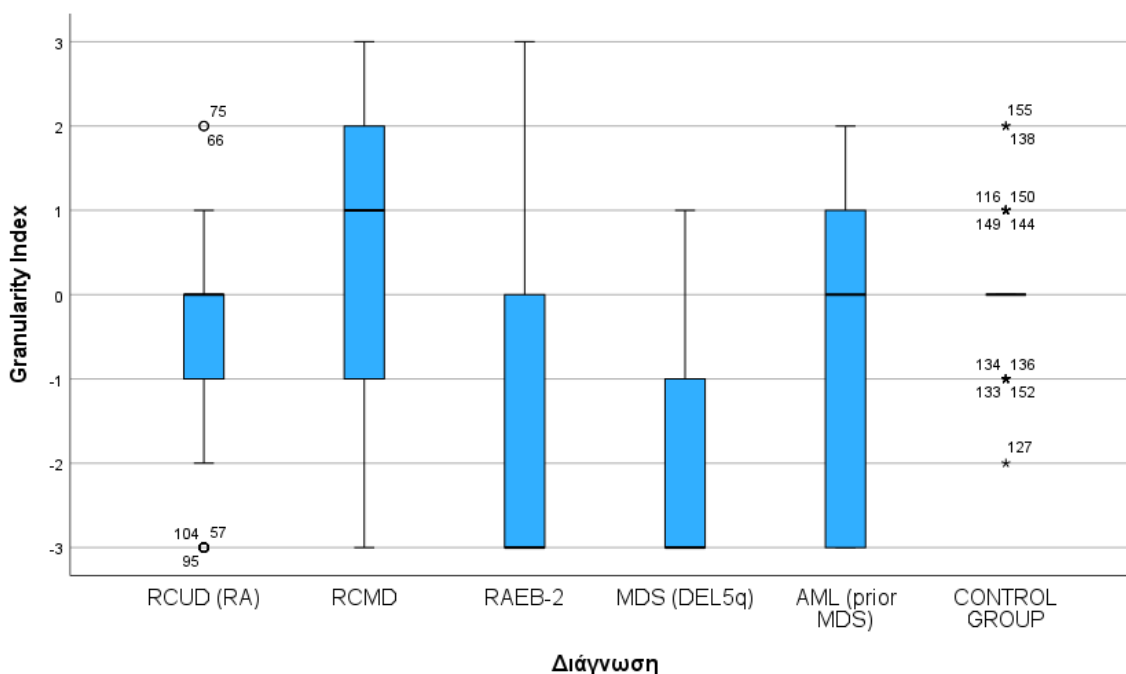
Εικόνα 25 Μέση τιμή δεικτών *NE-SSC* (Ουδετερόφιλα – πλάγιος σκεδασμός) και *NE-SFL* (Ουδετερόφιλα – πλάγιος φθορισμός), ανάμεσα σε υγιή πληθυσμό και σε υποομάδες ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα. Πηγή: Προσωπικό αρχείο.

Η μειωμένη κοκκίωση των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων είναι το συνηθέστερο χαρακτηριστικό της μυελοδυσπλασίας. Η παράμετρος *NE-SSC*, η οποία αντικατοπτρίζει

την κοκκίωση, χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του *Granularity Index (GI)*. Ορίστηκαν οι τιμές αναφοράς του *GI*, βάση της μέσης τιμής της παραμέτρου *NE-SSC*, αφαιρώντας και προσθέτοντας μία τυπική απόκλιση ( $mean \pm 1SD$ ). Το εύρος τιμών 149,1 – 156,1 SI αντιπροσωπεύει φυσιολογικό  $GI=0$ . Τιμές με αρνητικό *GI*, υποδηλώνουν μειωμένη κοκκίωση. (Βλ. Πιν. 4)

Πίνακας 4 Ορισμός του *Granularity Index (GI)*. *NE-SSC*: Ουδετερόφιλα – πλάγιος σκεδασμός

Εύρος τιμών		142,1-	145,6-	149,1-	156,2-	159,7-	
<i>NE-SSC</i>	<142,1	145,5	149,0	156,1	159,6	163,1	>163,1
<i>GI</i>	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3



Εικόνα 26 Το *Granularity index* ανάμεσα στις υποομάδες των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων και της ομάδας ελέγχου. *RCUD (RA)*: Ανθεκτική κυτταροπενία με μονογραμμική δυσπλασία (Ανθεκτική αναιμία), *RCMD*: Ανθεκτική κυτταροπενία με πολυγραμμική δυσπλασία, *RAEB-2*: Ανθεκτική αναιμία με περίσσεια θλαστών -2, *MDS (DeL5q)*: Μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο σχετιζόμενο με μεμονωμένη έλλειψη των μακρών σκελών του χρωμοσώματος 5, *AML (prior MDS)*: Οξεία Μυελογενείς Λευχαιμία (με προηγηθέν Μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο) και *Control group*: ομάδα ελέγχου. Πηγή: Προσωπικό αρχείο.

Στην εικόνα 26 παρατηρούμε ότι οι τιμές του *Granularity index* στην ομάδα ελέγχου συγκεντρώνονται ως επί το πλείστο στην τιμή  $GI=0$ . Οι τιμές της υποομάδας με Ανθεκτική κυτταροπενία με μονογραμμική δυσπλασία (Ανθεκτική αναιμία) [*RCUD (RA)*], όπως ήδη αναφέραμε δεν έχει μεγάλες αποκλείσεις από την ομάδα ελέγχου καθώς αφο-



ρά δυσπλασία στην ερυθρά σειρά μόνο. Το μειωμένο *Granularity index* στις υπόλοιπες υποομάδες είναι εμφανές.

## 5.6 Συμπεράσματα

Η ανάγκη δημιουργίας δεικτών διαφοροδιάγνωσης είναι κάτι που απασχολεί έντονα την ερευνητική κοινότητα τα τελευταία χρόνια. Από τη μελέτη μας φάνηκε ότι οι νέοι δείκτες που μας παρέχει ο αιματολογικός αναλυτής *Sysmex XN-1000* έχουν διαφοροδιαγνωστική αξία σε διαλογή για αιμοσφαιρινοπάθειες. Ιδιαίτερα ο δείκτης *Micro-R%*, ο οποίος με *Youden's index:61,2%*, φαίνεται να είναι πολλά υποσχόμενος. Η νέα φόρμουλα που επιχειρήσαμε [*MHRF100*] έδειξε να είναι ο πιο χρήσιμος δείκτης, με *Youden's index:76,6%*, για τη διαφοροδιάγνωση της ετερόζυγης β-θαλασσαιμίας από τη μικροκυτταρική σιδηροπενία.

Οι λευκοκυτταρικοί δείκτες *NE-SSC* και *NE-SFL*, είναι πολλά υποσχόμενοι δείκτες στην αναγνώριση μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων καθώς παρουσιάζουν διαφορές ανάμεσα στον υγιή πληθυσμό και σε ασθενείς με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα, με το δείκτη *NE-SSC* να υπερέχει έναντι του *NE-SFL*.



## Παράρτημα Α

### Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Διάγνωση	(J) Διάγνωση	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Macro-R%	Control group	Ετερόζυγη α-θαλασσαιμία	-,7620*	,2522	,023	-1,455	-,069
		Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	1,5075*	,1505	<,001	1,094	1,921
		Ετερόζυγη Ο Θράκη	-,3420	,1681	,253	-,804	,120
		Σιδηροπενία	,3506*	,1249	,043	,007	,694
	Ετερόζυγη α-θαλασσαιμία	Control group	,7620*	,2522	,023	,069	1,455
		Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	2,2695*	,2551	<,001	1,568	2,971
		Ετερόζυγη Ο Θράκη	,4200	,2658	,512	-,311	1,151
		Σιδηροπενία	1,1126*	,2408	<,001	,451	1,775
	Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	Control group	-1,5075*	,1505	<,001	-1,921	-1,094
		Ετερόζυγη α-θαλασσαιμία	-2,2695*	,2551	<,001	-2,971	-1,568
		Ετερόζυγη Ο Θράκη	-1,8495*	,1724	<,001	-2,323	-1,376
		Σιδηροπενία	-1,1569*	,1306	<,001	-1,516	-,798
	Ετερόζυγη Ο Θράκη	Control group	,3420	,1681	,253	-,120	,804
		Ετερόζυγη α-θαλασσαιμία	-,4200	,2658	,512	-1,151	,311
		Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	1,8495*	,1724	<,001	1,376	2,323
		Σιδηροπενία	,6926*	,1506	<,001	,279	1,107
	Σιδηροπενία	Control group	-,3506*	,1249	,043	-,694	-,007
		Ετερόζυγη α-θαλασσαιμία	-1,1126*	,2408	<,001	-1,775	-,451
		Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	1,1569*	,1306	<,001	,798	1,516
		Ετερόζυγη Ο Θράκη	-,6926*	,1506	<,001	-1,107	-,279
Micro-R%	Control group	Ετερόζυγη α-θαλασσαιμία	-10,2760	3,9334	,071	-21,089	,537
		Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	-45,0037*	2,3471	<,001	-51,456	-38,551
		Ετερόζυγη Ο Θράκη	-4,8060	2,6223	,357	-12,015	2,403
		Σιδηροπενία	-7,7617*	1,9481	<,001	-13,117	-2,406
	Ετερόζυγη α-θαλασσαιμία	Control group	10,2760	3,9334	,071	-,537	21,089
		Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	-34,7277*	3,9779	<,001	-45,663	-23,792
		Ετερόζυγη Ο Θράκη	5,4700	4,1462	,679	-5,928	16,868
		Σιδηροπενία	2,5143	3,7562	,963	-7,812	12,841
	Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	Control group	45,0037*	2,3471	<,001	38,551	51,456
		Ετερόζυγη α-θαλασσαιμία	34,7277*	3,9779	<,001	23,792	45,663
		Ετερόζυγη Ο Θράκη	40,1977*	2,6885	<,001	32,807	47,589
		Σιδηροπενία	37,2421*	2,0363	<,001	31,644	42,840
	Ετερόζυγη Ο Θράκη	Control group	4,8060	2,6223	,357	-2,403	12,015
		Ετερόζυγη α-θαλασσαιμία	-5,4700	4,1462	,679	-16,868	5,928
		Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	-40,1977*	2,6885	<,001	-47,589	-32,807
		Σιδηροπενία	-2,9557	2,3482	,717	-9,411	3,500
	Σιδηροπενία	Control group	7,7617*	1,9481	<,001	2,406	13,117
		Ετερόζυγη α-θαλασσαιμία	-2,5143	3,7562	,963	-12,841	7,812
		Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	-37,2421*	2,0363	<,001	-42,840	-31,644
		Ετερόζυγη Ο Θράκη	2,9557	2,3482	,717	-3,500	9,411
Hyo-He%	Control group	Ετερόζυγη α-θαλασσαιμία	-,4780	3,2876	1,000	-9,516	8,560
		Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	-13,1294*	1,9617	<,001	-18,522	-7,736
		Ετερόζυγη Ο Θράκη	-,2113	2,1917	1,000	-6,237	5,814
		Σιδηροπενία	-3,9067	1,6282	,119	-8,383	,569
	Ετερόζυγη α-θαλασσαιμία	Control group	,4780	3,2876	1,000	-8,560	9,516
		Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	-12,6514*	3,3248	,002	-21,791	-3,511
		Ετερόζυγη Ο Θράκη	,2667	3,4654	1,000	-9,260	9,793
		Σιδηροπενία	-3,4287	3,1395	,811	-12,059	5,202
	Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	Control group	13,1294*	1,9617	<,001	7,736	18,522
		Ετερόζυγη α-θαλασσαιμία	12,6514*	3,3248	,002	3,511	21,791
		Ετερόζυγη Ο Θράκη	12,9180*	2,2471	<,001	6,741	19,095
		Σιδηροπενία	9,2227*	1,7020	<,001	4,544	13,902
	Ετερόζυγη Ο Θράκη	Control group	,2113	2,1917	1,000	-5,814	6,237
		Ετερόζυγη α-θαλασσαιμία	-,2667	3,4654	1,000	-9,793	9,260
		Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	-12,9180*	2,2471	<,001	-19,095	-6,741
		Σιδηροπενία	-3,6953	1,9627	,329	-9,091	1,700
	Σιδηροπενία	Control group	3,9067	1,6282	,119	-,569	8,383
		Ετερόζυγη α-θαλασσαιμία	3,4287	3,1395	,811	-5,202	12,059
		Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	-9,2227*	1,7020	<,001	-13,902	-4,544
		Ετερόζυγη Ο Θράκη	3,6953	1,9627	,329	-1,700	9,091

## Παράρτημα Α (συνέχεια)

Hyper-He%	Control group	Ετερόζυγη α-θαλασσαιμία	,3980*	,0822	<,001	,172	,624	
		Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	,7007*	,0490	<,001	,566	,836	
		Ετερόζυγη Ο Θράκη	,0713	,0548	,690	-,079	,222	
		Σιδηροπενία	,3789*	,0407	<,001	,267	,491	
	Ετερόζυγη α-θαλασσαιμία	Control group	-,3980*	,0822	<,001	-,624	-,172	
		Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	,3027*	,0831	,003	,074	,531	
		Ετερόζυγη Ο Θράκη	-,3267*	,0866	,002	-,565	-,089	
		Σιδηροπενία	-,0191	,0785	,999	-,235	,197	
	Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	Control group	-,7007*	,0490	<,001	-,836	-,566	
		Ετερόζυγη α-θαλασσαιμία	-,3027*	,0831	,003	-,531	-,074	
		Ετερόζυγη Ο Θράκη	-,6294*	,0562	<,001	-,784	-,475	
		Σιδηροπενία	-,3218*	,0425	<,001	-,439	-,205	
	Ετερόζυγη Ο Θράκη	Control group	-,0713	,0548	,690	-,222	,079	
		Ετερόζυγη α-θαλασσαιμία	,3267*	,0866	,002	,089	,565	
		Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	,6294*	,0562	<,001	,475	,784	
		Σιδηροπενία	,3076*	,0491	<,001	,173	,442	
	Σιδηροπενία	Control group	-,3789*	,0407	<,001	-,491	-,267	
		Ετερόζυγη α-θαλασσαιμία	,0191	,0785	,999	-,197	,235	
		Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	,3218*	,0425	<,001	,205	,439	
		Ετερόζυγη Ο Θράκη	-,3076*	,0491	<,001	-,442	-,173	
	IRF%	Control group	Ετερόζυγη α-θαλασσαιμία	1,39600	2,31624	,975	-4,9715	7,7635
			Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	-7,59536*	1,38212	<,001	-11,3949	-3,7958
			Ετερόζυγη Ο Θράκη	-3,85067	1,54416	,096	-8,0957	,3943
			Σιδηροπενία	-10,20381*	1,14714	<,001	-13,3574	-7,0502
		Ετερόζυγη α-θαλασσαιμία	Control group	-1,39600	2,31624	,975	-7,7635	4,9715
			Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	-8,99136*	2,34241	,001	-15,4308	-2,5519
			Ετερόζυγη Ο Θράκη	-5,24667	2,44153	,203	-11,9586	1,4653
			Σιδηροπενία	-11,59981*	2,21192	<,001	-17,6805	-5,5191
		Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	Control group	7,59536*	1,38212	<,001	3,7958	11,3949
			Ετερόζυγη α-θαλασσαιμία	8,99136*	2,34241	,001	2,5519	15,4308
			Ετερόζυγη Ο Θράκη	3,74470	1,58315	,129	-,6075	8,0969
			Σιδηροπενία	-2,60845	1,19911	,193	-5,9049	,6880
		Ετερόζυγη Ο Θράκη	Control group	3,85067	1,54416	,096	-,3943	8,0957
			Ετερόζυγη α-θαλασσαιμία	5,24667	2,44153	,203	-1,4653	11,9586
			Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	-3,74470	1,58315	,129	-8,0969	,6075
			Σιδηροπενία	-6,35314*	1,38277	<,001	-10,1545	-2,5518
Σιδηροπενία		Control group	10,20381*	1,14714	<,001	7,0502	13,3574	
		Ετερόζυγη α-θαλασσαιμία	11,59981*	2,21192	<,001	5,5191	17,6805	
		Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	2,60845	1,19911	,193	-,6880	5,9049	
		Ετερόζυγη Ο Θράκη	6,35314*	1,38277	<,001	2,5518	10,1545	
RET-He		Control group	Ετερόζυγη α-θαλασσαιμία	5,86200*	1,31456	<,001	2,2482	9,4758
			Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	13,24927*	,78441	<,001	11,0929	15,4057
			Ετερόζυγη Ο Θράκη	1,64200	,87637	,334	-,7672	4,0512
			Σιδηροπενία	6,15596*	,65105	<,001	4,3662	7,9457
		Ετερόζυγη α-θαλασσαιμία	Control group	-5,86200*	1,31456	<,001	-9,4758	-2,2482
			Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	7,38727*	1,32941	<,001	3,7326	11,0419
			Ετερόζυγη Ο Θράκη	-4,22000*	1,38567	,022	-8,0293	-,4107
			Σιδηροπενία	,29396	1,25535	,999	-3,1571	3,7450
		Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	Control group	-13,24927*	,78441	<,001	-15,4057	-11,0929
			Ετερόζυγη α-θαλασσαιμία	-7,38727*	1,32941	<,001	-11,0419	-3,7326
			Ετερόζυγη Ο Θράκη	-11,60727*	,89850	<,001	-14,0773	-9,1372
			Σιδηροπενία	-7,09331*	,68054	<,001	-8,9642	-5,2224
		Ετερόζυγη Ο Θράκη	Control group	-1,64200	,87637	,334	-4,0512	,7672
			Ετερόζυγη α-θαλασσαιμία	4,22000*	1,38567	,022	,4107	8,0293
			Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	11,60727*	,89850	<,001	9,1372	14,0773
			Σιδηροπενία	4,51396*	,78478	<,001	2,3566	6,6714
	Σιδηροπενία	Control group	-6,15596*	,65105	<,001	-7,9457	-4,3662	
		Ετερόζυγη α-θαλασσαιμία	-,29396	1,25535	,999	-3,7450	3,1571	
		Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	7,09331*	,68054	<,001	5,2224	8,9642	
		Ετερόζυγη Ο Θράκη	-4,51396*	,78478	<,001	-6,6714	-2,3566	

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

## Αναφορές

1. Urrechaga E, Borque L, Escanero JF. Erythrocyte and reticulocyte parameters in iron deficiency and thalassemia. *Journal of clinical laboratory analysis*. 2011;25(3):223-8.
2. Urrechaga E, Borque L, Escanero JF. Potential utility of the new Sysmex XE 5000 red blood cell extended parameters in the study of disorders of iron metabolism. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2009;47(11):1411-6.
3. Di Luise D, Giannotta JA, Ammirabile M, De Zordi V, Torricelli S, Bottalico S, et al. Cell Population Data NE-WX, NE-FSC, LY-Y of Sysmex XN-9000 can provide additional information to differentiate macrocytic anaemia from myelodysplastic syndrome: A preliminary study. *International journal of laboratory hematology*. 2022;44(1):e40-e3.
4. Schoorl M, Schoorl M, van Pelt J, Bartels PC. Application of Innovative Hemocytometric Parameters and Algorithms for Improvement of Microcytic Anemia Discrimination. *Hematology reports*. 2015;7(2):5843.
5. Cornet E, Boubaya M, Troussard X. Contribution of the new XN-1000 parameters NEUT-RI and NEUT-WY for managing patients with immature granulocytes. *International journal of laboratory hematology*. 2015;37(5):e123-6.
6. Goel S, Sachdev R, Gajendra S, Jha B, Sahni T, Dorwal P, et al. Picking up myelodysplastic syndromes and megaloblastic anemias on peripheral blood: use of NEUT-X and NEUT-Y in guiding smear reviews. *International journal of laboratory hematology*. 2015;37(2):e48-51.
7. Le Roux G, Vlad A, Eclache V, Malanquin C, Collon JF, Gantier M, et al. Routine diagnostic procedures of myelodysplastic syndromes: value of a structural blood cell parameter (NEUT-X) determined by the Sysmex XE-2100. *International journal of laboratory hematology*. 2010;32(6 Pt 1):e237-43.
8. Furundarena JR, Araiz M, Uranga M, Sainz MR, Agirre A, Trassorras M, et al. The utility of the Sysmex XE-2100 analyzer's NEUT-X and NEUT-Y parameters for detecting neutrophil dysplasia in myelodysplastic syndromes. *International journal of laboratory hematology*. 2010;32(3):360-6.
9. Zimmermann M, Cremer M, Hoffmann C, Weimann K, Weimann A. Granularity Index of the SYSMEX XE-5000 hematology analyzer as a replacement for manual microscopy of toxic granulation neutrophils in patients with inflammatory diseases. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2011;49(7):1193-8.
10. Osman J, Lambert J, Temple M, Devaux F, Favre R, Flaujac C, et al. Rapid screening of COVID-19 patients using white blood cell scattergrams, a study on 381 patients. *Br J Haematol*. 2020;190(5):718-22.
11. Δημήτρης Λουκόπουλος ΜΠ. Μαθήματα Αιματολογίας. Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο: Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών; 2015.
12. Arneth BM, Menschikowki M. Technology and new fluorescence flow cytometry parameters in hematological analyzers. *Journal of clinical laboratory analysis*. 2015;29(3):175-83.
13. Giles I. The Thing about Fluorescence Technology. *Sysmex Journal International*. 2006;16 No1:17-8.
14. Becker PH, Fenneteau O, Da Costa L. Performance evaluation of the Sysmex XN-1000 hematology analyzer in assessment of the white blood cell count differential in pediatric specimens. *International journal of laboratory hematology*. 2016;38(1):54-63.

15. Zeeshan-Haider R, Urrechaga E, Uddin-Ujjan I, Sultan-Shamsi T. Neutrophil Scattering Data Driven Pre-Microscopic Flagging of Acute Leukemic Cases. *Rev Invest Clin.* 2020;72(1):37-45.
16. Hoffmann JJ, Urrechaga E, Aguirre U. Discriminant indices for distinguishing thalassemia and iron deficiency in patients with microcytic anemia: a meta-analysis. *Clinical chemistry and laboratory medicine.* 2015;53(12):1883-94.
17. Ευδοκία Παγκάλου ΓΜ. ΤΙΜΗΤΙΚΟΣ ΤΟΜΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΟΥ ΓΙΑΝΝΗ ΜΕΛΕΤΗ Αιμοσφαιρινοπάθειες. ΤΙΜΗΤΙΚΟΣ ΤΟΜΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΟΥ ΓΙΑΝΝΗ ΜΕΛΕΤΗ Αιμοσφαιρινοπάθειες 2017. p. 561-79.
18. Oshiro I, Takenaka T, Maeda J. New method for hemoglobin determination by using sodium lauryl sulfate (SLS). *Clin Biochem.* 1982;15(2):83-8.
19. Hoffmann J, Urrechaga E. Role of RDW in mathematical formulas aiding the differential diagnosis of microcytic anemia. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation.* 2020;80(6):464-9.
20. Gao J, Liu W. Advances in screening of thalassaemia. *Clin Chim Acta.* 2022;534:176-84.
21. Veda P. Evaluation of macrocytosis in routine hemograms. *Indian journal of hematology & blood transfusion : an official journal of Indian Society of Hematology and Blood Transfusion.* 2013;29(1):26-30.
22. Mutua BM, Sowayi G, Okoth P. Red cell distribution width as a surrogate marker of haemoglobinopathies in western Kenya. *Afr J Lab Med.* 2022;11(1):1644.
23. Bessman JD, Feinstein DI. Quantitative anisocytosis as a discriminant between iron deficiency and thalassemia minor. *Blood.* 1979;53(2):288-93.
24. Turgutkaya A, Akin N, Sargin G, Bolaman Z, Yavasoglu I. The relationship between red cell distribution width and prognostic scores in myelodysplastic syndrome. *Hematol Transfus Cell Ther.* 2022;44(3):332-5.
25. Fernando Augusto Caporal SRC. Evaluation of RDW-CV, RDW-SD and MATH-1SD for the detection of erythrocyte anisocytosis observed by optical microscopy. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.* 2013;49:324-31.
26. Bahr TM, Christensen TR, Henry E, Wilkes J, Ohls RK, Bennett ST, et al. Neonatal Reference Intervals for the Complete Blood Count Parameters MicroR and HYPO-He: Sensitivity Beyond the Red Cell Indices for Identifying Microcytic and Hypochromic Disorders. *J Pediatr.* 2021;239:95-100 e2.
27. Schapkaitz E. Stability of New Erythrocyte and Reticulocyte Parameters in Testing for Anemia on the Sysmex XN 9000. *Lab Med.* 2018;49(3):219-25.
28. Lesesve JF, Asnafi V, Braun F, Zini G. Fragmented red blood cells automated measurement is a useful parameter to exclude schistocytes on the blood film. *International journal of laboratory hematology.* 2012;34(6):566-76.
29. Watanabe K, Kawai Y, Takeuchi K, Shimizu N, Iri H, Ikeda Y, et al. Reticulocyte maturity as an indicator for estimating qualitative abnormality of erythropoiesis. *Journal of clinical pathology.* 1994;47(8):736-9.
30. Agorasti A, Trivellas T, Papadopoulos V, Konstantinidou D. Innovative parameters RET-Y, sTfR, and sTfR-F index in patients with microcytic, hypochromic anemia--their special value for hemoglobinopathies. *Laboratory hematology : official publication of the International Society for Laboratory Hematology.* 2007;13(2):63-8.

31. Buttarello M. Laboratory diagnosis of anemia: are the old and new red cell parameters useful in classification and treatment, how? *International journal of laboratory hematology*. 2016;38 Suppl 1:123-32.
32. Hwang SM, Nam Y. Complete blood count and cell population data parameters from the Abbott Alinity hq analyzer are useful in differentiating myelodysplastic syndromes from other forms of cytopenia. *International journal of laboratory hematology*. 2022;44(3):468-76.
33. Ashley Ortiz JD. Performance Comparison of Sysmex Hematology Analyzers XN-550 and XN-10. *Sysmex Journal International*. 2020;30 No1:9-15.
34. Ogawa C, Tsuchiya K, Maeda K. Reticulocyte hemoglobin content. *Clin Chim Acta*. 2020;504:138-45.
35. Kadegasem P, Songdej D, Lertthammakiat S, Chuansumrit A, Paisooksantivatana K, Mahaklan L, et al. Reticulocyte hemoglobin equivalent in a thalassemia-prevalent area. *Pediatr Int*. 2019;61(3):240-5.
36. Henriot I, Launay E, Boubaya M, Cremet L, Illiaquer M, Caillon H, et al. New parameters on the hematology analyzer XN-10 (Sysmex™) allow to distinguish childhood bacterial and viral infections. *International journal of laboratory hematology*. 2017;39(1):14-20.
37. Thomas C, Thomas L. Biochemical markers and hematologic indices in the diagnosis of functional iron deficiency. *Clin Chem*. 2002;48(7):1066-76.
38. Sawako Kawauchi YT, Mari Kono, Atsushi Wada, Takashi Morikawa. Comparison of the Leukocyte differentiation Scattergrams Between the XN-Series and the XE-Series of Hematology Analyzers. *Sysmex Journal International*. 2013;24 No1:1-8.
39. Boquoi A, Barthuber C, Strapatsas J, Kuendgen A, Kobbe G, Fenk R, et al. Neut-X can be successfully used as diagnostic and prognostic tool in MDS. *Leuk Res*. 2019;86:106224.
40. Dennison D, Al Khabori M, Al Mamari S, Aurelio A, Al Hinai H, Al Maamari K, et al. Circulating activated neutrophils in COVID-19: An independent predictor for mechanical ventilation and death. *Int J Infect Dis*. 2021;106:155-9.
41. Kwiecien I, Rutkowska E, Kulik K, Klos K, Plewka K, Raniszewska A, et al. Neutrophil Maturation, Reactivity and Granularity Research Parameters to Characterize and Differentiate Convalescent Patients from Active SARS-CoV-2 Infection. *Cells*. 2021;10(9).
42. M. Ustyantseva OIK, V. V. Agadzhanyan. Innovative Technologies in the Evaluation of the Neutrophil Functional Activity in Sepsis. *Sysmex Journal International*. 2019;29 No1:8-13.
43. Stiel L, Rabouel Y, Debliquis A, Pointurier V, Mootien J, Kuteifan K. NEUT-SFL in Patients with COVID-ARDS: A Novel Biomarker for Thrombotic Events? *Dis Markers*. 2021;2021:4361844.
44. Myari A, Papapetrou E, Tsaousi C. Diagnostic value of white blood cell parameters for COVID-19: Is there a role for HFLC and IG? *International journal of laboratory hematology*. 2022;44(1):104-11.
45. Martens RJH, van Adrichem AJ, Mattheij NJA, Brouwer CG, van Twist DJL, Broerse J, et al. Hemocytometric characteristics of COVID-19 patients with and without cytokine storm syndrome on the sysmex XN-10 hematology analyzer. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2021;59(4):783-93.
46. Garcia de Gadiana-Romualdo L, Diaz Lopez MI, Crespo Alvarez E, Martinez Manzano A, Urrechaga E, Orgaz Morales MT. Usefulness of the extended inflammatory

parameters related to neutrophil activation reported on Sysmex XN-1000 haematology analyser as indicators of acute appendicitis: comparison with canonical inflammatory laboratory tests. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 2022;82(6):492-4.

47. Lopic I, Brencic T, Rogic D, Pozaic P, Juricic G, Honovic L. The value of extended inflammatory parameters obtained on Sysmex XN-1000 haematology analyser as early laboratory indicators of COVID-19. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 2022;82(3):257-9.

48. Rohlfing AK, Rath D, Geisler T, Gawaz M. Platelets and COVID-19. *Hamostaseologie*. 2021;41(5):379-85.

49. Koupenova M, Clancy L, Corkrey HA, Freedman JE. Circulating Platelets as Mediators of Immunity, Inflammation, and Thrombosis. *Circ Res*. 2018;122(2):337-51.

50. Carlo Brugnara PB. Iron therapy. In: Carole Beaumont PB, Yves Beuzard, Carlo Brugnara, editor. *Disorders of erythropoiesis, erythrocytes and iron metabolism: European School of Haematology*; 2009. p. 512-5.

51. Ανδρούλλα Ελευθερίου ΜΑ. Διαταραχές της αιμοσφαιρίνης (αιμοσφαιρινοπάθειες). Κύπρος: Team up creations LTD; 2011.

52. Giambona A, Passarello C, Renda D, Maggio A. The significance of the hemoglobin A(2) value in screening for hemoglobinopathies. *Clin Biochem*. 2009;42(18):1786-96.

53. Bajwa H, Basit H. Thalassemia. *StatPearls*. Treasure Island (FL)2022.

54. Kattamis A, Kwiatkowski JL, Aydinok Y. Thalassaemia. *Lancet*. 2022;399(10343):2310-24.

55. Ravalet N, Foucault A, Picou F, Gombert M, Renoult E, Lejeune J, et al. Automated Early Detection of Myelodysplastic Syndrome within the General Population Using the Research Parameters of Beckman-Coulter DxH 800 Hematology Analyzer. *Cancers (Basel)*. 2021;13(3).

56. Χαρίκλεια Κελαϊδή ΚΣ. Κυτταρογενετικές ανωμαλίες στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα: Κλινική και προγνωστική σημασία. *The Journal of the Hellenic Society of Hematology*. 2011;2 No2:177-86.

57. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Sole F, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012;120(12):2454-65.

58. Ελένη Π. Κουρέα ΆΤ. Ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων. *The Journal of the Hellenic Society of Hematology*. 2011;2 No2:187-92.

59. Malcovati L, Cazzola M. Recent advances in the understanding of myelodysplastic syndromes with ring sideroblasts. *Br J Haematol*. 2016;174(6):847-58.

60. Μαρίνα Καρακάντζα ΑΨ. Ο ρόλος της κυτταρομετρίας ροής στη μελέτη των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων. *The Journal of the Hellenic Society of Hematology*. 2011;2 No2:193-204.

61. Συμεωνίδης Α. Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα με απώλεια των μακρών σκελών του χρωμοσώματος 5 και "Σύνδρομο" del-5q. *The Journal of the Hellenic Society of Hematology*. 2011;2 No2:205-13.

62. Haferlach C, Bacher U, Tiu R, Maciejewski JP, List A. Myelodysplastic syndromes with del(5q): indications and strategies for cytogenetic testing. *Cancer Genet Cytogenet*. 2008;187(2):101-11.

## Πηγές Εικόνων

Εξώφυλλο και Εικόνα 7: <https://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/sysmex-parameters/neutrophil-activation.html> (Τροποποιημένο)

Εικόνα 1: <https://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/sysmex-parameters/micromacror.html> (Τροποποιημένο)

Εικόνα 2: <https://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/sysmex-parameters/hypo-hehyper-he.html> (Τροποποιημένο)

Εικόνα 3: <https://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/sysmex-parameters/fragmented-red-blood-cells-frc.html> (Τροποποιημένο)

Εικόνα 4: *Systemex, Kobe, Japan* (Τροποποιημένο)

Εικόνα 5: *Proceedings of the Sysmex European Symposium 2005* (Τροποποιημένο)

Εικόνα 6: *Systemex Journal International Vol24 No.1* (Τροποποιημένο)

Εικόνα 8 *Carlo Brugnara PB. Iron therapy. In: Carole Beaumont PB, Yves Beuzard, Carlo Brugnara, editor. Disorders of erythropoiesis, erythrocytes and iron metabolism: European School of Haematology; 2009. p. 512-5. (Τροποποιημένο)*

Εικόνα 9: <https://fadic.net/haemoglobin/> (Τροποποιημένο)

Εικόνα 10: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Postnatal\\_genetics\\_en.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Postnatal_genetics_en.svg) (Τροποποιημένο)

Εικόνα 11: *Αρχείο Αιματολογικού εργαστηρίου Γ.Ν. Ξάνθης* (Τροποποιημένο)

Εικόνα 12: *Cazzola et al., Blood 2013; 122(5): 4021-4034* (Τροποποιημένο)

Εικόνα 13: *Haferlach C, Bacher U, Tiu R, Maciejewski JP, List A. Myelodysplastic syndromes with del(5q): indications and strategies for cytogenetic testing. Cancer Genet Cytogenet. 2008;187(2):101-11 (Τροποποιημένο)*

Εικόνα 14-26: *Προσωπικό αρχείο*