



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΑΕΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΑΙΡΟΠΟΙΗΣΗ ΓΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟΦΟΙΤΩΝ ΑΕΙ (ΠΕΓΑ)

«Οι σύγχρονες τεχνικές βιο-ανάλυσης στην υγεία, τη γεωργία, το περιβάλλον και τη διατροφή»

Αιμοσφαιρινοπάθειες

Οι αιμοσφαιρινοπάθειες, δηλ. οι διαταραχές της αιμοσφαιρίνης αποτελούν τις καλύτερα χαρακτηρισμένες κληρονομικές διαταραχές. Είναι το συχνότερο μονογονιδιακό νόσημα και οι τρέχουσες εκτιμήσεις υποδεικνύουν ότι περίπου το 5% του πληθυσμού είναι φορείς αλληλομόρφων που σχετίζονται με διαταραχές της αιμοσφαιρίνης με κλινική σημασία. Η δομή της αιμοσφαιρίνης ήταν από τις πρώτες που προσδιορίστηκαν ενώ τα αντίστοιχα γονίδια τα πρώτα που κλωνοποιήθηκαν.

Δομή και λειτουργία της αιμοσφαιρίνης

Η αιμοσφαιρίνη είναι ο μεταφορέας του οξυγόνου στα ερυθρά αιμοσφαίρια το οποίο προσλαμβάνεται από τους πνεύμονες. Επίσης είναι υπεύθυνη και για τη μεταφορά του διοξειδίου του άνθρακα, που παράγεται από τα κύτταρα του σώματος. Η αιμοσφαιρίνη των ενηλίκων, η οποία συμβολίζεται ως HbA, αποτελείται από 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες (2 αλυσίδες α και 2 αλυσίδες β, α₂β₂), που ονομάζονται σφαιρίνες, που καθεμία είναι συνδεδεμένη με μία ομάδα αίμης. Οι αλυσίδες συνδέονται μεταξύ τους με μη ομοιοπολικούς δεσμούς (υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, ιοντικούς δεσμούς και δεσμούς υδρογόνου). Οι αλυσίδες α αποτελούνται από 141 αμινοξέα και οι αλυσίδες β από 146 και το τελικό μόριο έχει σφαιρική δομή **(Διαφάνειες 1 και 2)**.

Η αίμη είναι μία πορφυρίνη η οποία λόγω του σιδήρου που περιέχει, είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση και τη μεταφορά του οξυγόνου. Ο σίδηρος μπορεί να βρίσκεται σε δύο καταστάσεις οξείδωσης, Fe +2 και Fe +3, ενώ το οξυγόνο δεσμεύεται μόνο από τη σιδηροαιμοσφαιρίνη, δηλαδή την αιμοσφαιρίνη με Fe +2.

Γονίδια σφαιρινών, τύποι αιμοσφαιρίνης και έκφρασή τους κατά την ανάπτυξη και την ενήλικη ζωή

Εκτός από την HbA, που είναι η κύρια αιμοσφαιρίνη στους ενήλικες, υπάρχουν άλλες πέντε ακόμα αιμοσφαιρίνες με παρόμοια δομή. Οι υπόλοιπες αιμοσφαιρίνες έχουν παρόμοια δομή και αποτελούνται από δύο αλυσίδες α ή τύπου α (α-like) και δύο αλυσίδες β ή τύπου β. Αυτές οι αλυσίδες παράγονται από

διαφορετικά γονίδια. Τα γονίδια των αλυσίδων α και τύπου α εντοπίζονται όλα μαζί σε σειρά στο χρωμόσωμα 16 και τα γονίδια των αλυσίδων β ή τύπου β στο χρωμόσωμα 11. Όσον αφορά το σύμπλεγμα των γονιδίων α, διαδοχικά στο χρωμόσωμα εντοπίζονται δύο παρόμοια γονίδια, τα α1 και α2. Ομοίως, και τα γονίδια της ομάδας των γονιδίων της β-σφαιρίνης εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα. Στις αλυσίδες τύπου-α ανήκουν οι σφαιρίνες ζ, α1 και α2 και στις τύπου-β οι σφαιρίνες ε, γ, δ και β (**Διαφάνειες 3 και 4**).

Κατά τα πρώτα στάδια της εμβρυικής ανάπτυξης παράγονται οι σφαιρίνες α, ζ και ε από το λεκιθικό ασκό. Αντίστοιχα, οι πρώτες αιμοσφαιρίνες είναι η Hb Gower 1 (ζ2ε2), η Hb Gower 2 (α2ε2) και η Hb Portland (ζ2γ2). Αυτές κατά την εμβρυική ανάπτυξη σταδιακά αντικαθίστανται από την HbF (α2γ2), η οποία παράγεται στο εμβρυϊκό ήπαρ. Οι αλυσίδες ζ και ε εξαφανίζονται κατά την 10^η εβδομάδα της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Περίπου στην 8^η εβδομάδα της κύησης, η κύρια αιμοσφαιρίνη είναι η HbF, η οποία όμως αρχίζει και μειώνεται κατά τη 16^η εβδομάδα της κύησης. Τελικά, στους ενήλικες, φυσιολογικά, το ποσοστό της HbF είναι μόλις 1%. Στους ενήλικες, η ερυθροποίηση πραγματοποιείται κυρίως στο μυελό των οστών αλλά και στο σπλήνα. Επίσης στους ενήλικες παράγεται και σε χαμηλά επίπεδα (~2%) η αιμοσφαιρίνη HbA2 (α2δ2), η σύνθεση της οποίας έχει ήδη ξεκινήσει πριν από τη γέννηση. Δηλαδή στους ενήλικες τα γονίδια που συμμετέχουν κυρίως στην παραγωγή της αιμοσφαιρίνης είναι τα δύο γονίδια α (α1 και α2) και το γονίδιο β (**Διαφάνειες 5-7**).

Αυτή η διαφορά στον αριθμό των γονιδίων σε συνδυασμό με το πρότυπο έκφρασής τους κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της ενήλικης ζωής αποτελούν τη βάση για την κατανόηση της παθογένειας των αιμοσφαιρινοπαθειών. Είναι πιθανότερο ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο της β-σφαιρίνης να οδηγήσουν σε κάποια διαταραχή επειδή θα επηρεαστεί το 50% των β-αλυσίδων. Αντίθετα, μεταλλάξεις σε γονίδιο α αλυσίδας θα έχει επίπτωση μόνο στο 25% αυτών των αλυσίδων. Επίσης, οι μεταλλάξεις στο γονίδιο β δεν έχουν επίπτωση στην εμβρυική ανάπτυξη επειδή κατ' αυτήν η κύρια σφαιρίνη τύπου-β είναι η γ-σφαιρίνη. Αντίθετα, οι μεταλλάξεις στην α-αλυσίδα μπορεί να είναι σημαντικές τόσο κατά την εμβρυική ανάπτυξη όσο και κατά την ενήλικη ζωή καθώς οι α αλυσίδες συμμετέχουν σε όλες τις αιμοσφαιρίνες από τα πρώιμα στάδια της εμβρυογένεσης.

Κατηγορίες αιμοσφαιρινοπαθειών

Οι αιμοσφαιρινοπάθειες διακρίνονται σε τρεις κύριες ομάδες βάσει των επιπτώσεων που προκαλούν οι αντίστοιχες μεταλλάξεις, δηλ. αν επηρεάζουν τη δομή της αιμοσφαιρίνης, τη σύνθεση ή το πρότυπο έκφρασης κατά την ανάπτυξη:

- Οι θαλασαιμίες είναι ποσοτικές αλλαγές των αιμοσφαιρινών και οδηγούν σε μειωμένα επίπεδα έκφρασης κάποιας αλυσίδας αλλάζοντας κατά συνέπεια και τη στοιχειομετρία των διαφορετικών αλυσίδων. Ο όρος θαλασαιμία προέρχεται από τη λέξη θάλασσα υποδηλώνοντας ότι αυτό το νόσημα ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά σε άτομα μεσογειακής καταγωγής. Εντούτοις, τόσο η α- όσο και η β-θαλασαιμία εμφανίζονται με μεγάλη συχνότητα σε πολλούς πληθυσμούς.
- Οι δομικές παραλλαγές προκαλούν αλλαγή στην πρωτεΐνη αλλά όχι στο ρυθμό παραγωγής της αιμοσφαιρίνης.
- Η κληρονομική διατήρηση της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης, που αφορά σχετικά ηπιότερες καταστάσεις οφείλεται σε διαταραχή στο πρότυπο έκφρασης των σφαιρινών και ειδικότερα κατά την μεταστροφή από τη γ- στη β-σφαιρίνη.

Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί περισσότερες από 1000 μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τις α- και τις β-αλυσίδες και οι οποίες επηρεάζουν τόσο τη δομή όσο και τη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης. Οι μεταλλάξεις αυτές εντοπίζονται τόσο μέσα στα γονίδια όσο και στις ρυθμιστικές περιοχές τους, οι οποίες εντοπίζονται στις χρωμοσωματικές περιοχές των συμπλεγμάτων των γονιδίων των σφαιρινών. Επιπλέον, ορισμένες μεταλλάξεις έχουν ταυτοποιηθεί και εκτός των συμπλεγμάτων των γονιδίων, οι οποίες φαίνεται ότι εντοπίζονται σε περιοχές που ρυθμίζουν την ερυθροειδική έκφραση των γονιδίων.

Μία σημαντική, από κλινική άποψη, παρατήρηση είναι ότι δεν είναι ασυνήθιστο να συνυπάρχουν στο ίδιο άτομο αλληλόμορφα και για τους δύο τύπους θαλασαιμίας καθώς και αλληλόμορφα υπεύθυνα για δομικές ανωμαλίες της αιμοσφαιρίνης. Η συνύπαρξη αυτή μπορεί να οδηγήσει σε κλινικά σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφορετικών αλληλομόρφων του ίδιου γονιδίου ή

μεταξύ των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων διαφορετικών γονιδίων της σφαιρίνης (Διαφάνεια 8).

Η α-θαλασσαιμία

Η α-θαλασσαιμία είναι μία ποσοτική ανεπάρκεια α σφαιρινών που οφείλεται κυρίως σε ελλείμματα του γονιδίου της α σφαιρίνης. Τα ελλείμματα αυτά συνήθως είναι μεγάλα και αφορούν ολόκληρο ή τμήμα του συμπλέγματος των γονιδίων α. Σπανιότερα εντοπίζονται μικρότερα ελλείμματα ή σημειακές μεταλλάξεις. Οι μεταλλάξεις που οδηγούν σε πλήρη απώλεια της σύνθεσης των γονιδίων α ονομάζονται α^0 ενώ αυτές που οδηγούν σε μερική απώλεια α^+ . Επίσης, το φυσιολογικό αλληλόμορφο που έχει δυο γονίδια α συμβολίζεται ως «αα», το έλλειμμα ενός γονιδίου α ως «-α» και το έλλειμμα δύο γονιδίων στο ίδιο αλληλόμορφο ως «--».

Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί περισσότερες από 80 διαφορετικές μεταλλάξεις που σχετίζονται με α-θαλασσαιμία. Οι περισσότερες αντιστοιχούν σε ελλείμματα που αφήνουν ένα μόνο λειτουργικό γονίδιο α στο χρωμόσωμα. Επίσης, έχουν αναφερθεί τουλάχιστον 40 σημειακές μεταλλάξεις οι οποίες εντοπίζονται κυρίως στο γονίδιο α2. Αρκετές από αυτές επηρεάζουν την επεξεργασία του RNA ή τη μετάφραση.

Ανάλογα με τον αριθμό των γονιδίων που λείπουν, τα αντίστοιχα άτομα μπορεί να

- είναι φορείς (η λέξη στίγμα δεν ενδείκνυται και δεν χρησιμοποιείται) όταν λείπει ένα γονίδιο α οι οποίοι δεν παρουσιάζουν αιματολογικές διαταραχές γιατί το έλλειμμα των α-αλυσίδων καλύπτεται από την λειτουργία των τριών φυσιολογικών γονιδίων
- είναι φορείς λόγω ελλείμματος ή μεταλλάξεων σε δύο γονίδια. Συνήθως δεν έχουν συμπτώματα ή έχουν ήπια αναιμία
- έχουν ενδιάμεση α-θαλασσαιμία λόγω ελλείμματος τριών γονιδίων α και να έχουν ήπια, μέτρια ή έντονη αναιμία. Σε ορισμένα άτομα απαιτείται μετάγγιση αίματος.
- έχουν αιμοσφαιρινοπάθεια Bart's (εμβρυϊκό ύδωπα ή μείζων α-θαλασσαιμία) λόγω ελλείμματος και των 4 γονιδίων α. Στα άτομα αυτά σχεδόν όλη η αιμοσφαιρίνη είναι Hb Bart's (γ_4) ενώ έχουν ένα μικρό ποσοστό

αιμοσφαιρίνης Portland ($\zeta_2\gamma_2$). Η κατάσταση αυτή δεν είναι συμβατή με τη ζωή και τα έμβρυα πεθαίνουν πριν τη γέννηση τους ή αμέσως μετά.

Η μειωμένη ποσότητα των αλυσίδων α οδηγεί σε συσσωματώματα τετραμερών σφαιρινών β_4 (Hb H) και γ_4 (Hb Bart's). Αυτές οι μορφές δεν μπορούν να απελευθερώσουν κάτω από φυσιολογικές συνθήκες το οξυγόνο στους ιστούς, είναι συνεπώς είναι αναποτελεσματικοί φορείς οξυγόνου (**Διαφάνειες 9-13**).

Η β-θαλασσαιμία

Η β-θαλασσαιμία είναι το γενετικό νόσημα με τη μεγαλύτερη συχνότητα φορέων στην Ελλάδα (~8% και σε ορισμένες περιοχές έως και 15% του πληθυσμού). Κατ' αντιστοιχία με την α -θαλασσαιμία, στην β-θαλασσαιμία υπάρχει μειωμένη παραγωγή της β-σφαιρίνης, διαταραχή της στοιχειομετρίας των αλυσίδων, καθίζηση συσσωματωμάτων των α -αλυσίδων και καταστροφή των ερυθροκυττάρων.

Επειδή οι β αλυσίδες είναι απαραίτητες μόνο μετά τη γέννηση [όταν η β σφαιρίνη αντικαθιστά τη γ-σφαιρίνη] τα συμπτώματα της β-θαλασσαιμίας πρωτοεμφανίζονται μερικούς μήνες μετά τη γέννηση. Ωστόσο, επειδή το γονίδιο δ είναι φυσιολογικό, συνεχίζεται η παραγωγή της HbA₂. Μάλιστα στους φορείς β-θαλασσαιμίας (που δεν έχουν συμπτώματα) παρατηρείται αύξηση των επιπέδων της HbA₂. Επίσης αύξηση παρατηρείται και στα επίπεδα της HbF πιθανώς λόγω αυξημένης παραγωγής του μικρού πληθυσμού των ώριμων ερυθροκυττάρων που περιέχουν HbF (**Διαφάνεια 14**).

Σε αντίθεση με την α -θαλασσαιμία, οι β-θαλασσαιμίες οφείλονται συνήθως σε σημειακές μεταλλάξεις. Οι περισσότερες μπορούν να ταξινομηθούν στις εξής κατηγορίες:

- Μεταλλάξεις στον υποκινητή.
- Μεταλλάξεις στην ωρίμανση του RNA (π.χ. στην ουρά πολύ-A, στην 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή 3'UTR)
- Μεταλλάξεις που δημιουργούν κωδικόνια λήξης της μετάφρασης
- Μεταλλάξεις που αλλάζουν το πλαίσιο ανάγνωσης.
- Ανασυνδυασμένες αιμοσφαιρίνες (π.χ. αιμοσφαιρίνη Lepore) (**Διαφάνεια 15**).

Σε περιοχές όπου παρουσιάζεται μεγάλη συχνότητα β-θαλασσαιμίας υπάρχουν τόσες πολλές διαφορετικές μεταλλάξεις, ώστε τα άτομα που φέρουν δύο μεταλλαγμένα αλληλόμορφα να είναι συνήθως σύνθετοι ετεροζυγώτες και όχι ομοζυγώτες για το ίδιο αλληλόμορφο. Τα άτομα με δύο μεταλλαγμένα αλληλόμορφα έχουν μείζονα θαλασσαιμία, η οποία χαρακτηρίζεται από βαριά αναιμία και απαιτεί ιατρική αντιμετώπιση εφ' όρου ζωής. Όταν τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα επιτρέπουν ελάχιστη μόνο παραγωγή της β-σφαιρίνης, ώστε να μην ανιχνεύεται η HbA, η ασθένεια ονομάζεται β⁰-θαλασσαιμία. Εάν κάποια ποσότητα HbA είναι ανιχνεύσιμη, τότε η ασθένεια ονομάζεται β⁺-θαλασσαιμία. Αν και οι ομοζυγώτες έχουν ποικίλη κλινική εικόνα, ανάλογα με το συνδυασμένο αποτέλεσμα των δύο αλληλομόρφων που διαθέτουν, η επιβίωση τους είναι πολύ μειωμένη σε σχέση με το γενικό πληθυσμό.

Τα ομόζυγα για τη β-θαλασσαιμία βρέφη εμφανίζουν αναιμία συνήθως πριν την ηλικία των δύο ετών. Η αντιμετώπιση της θαλασσαιμίας βασίζεται σήμερα στην καταπολέμηση της αναιμίας και της επέκτασης του μυελού με μετάγγιση αίματος καθώς και στον έλεγχο της συνακόλουθης συσσώρευσης σιδήρου με τη χορήγηση χηλικών παραγόντων. Η μεταμόσχευση του μυελού των οστών είναι αποτελεσματική, αλλά αποτελεί επιλογή μόνο στην περίπτωση που βρεθεί ένα HLA-συμβατό μέλος, κατά κανόνα της οικογένειας (**Διαφάνεια 16**).

Οι φορείς ενός μόνο αλληλομόρφου β-θαλασσαιμίας είναι ασυμπτωματική και λέγεται ότι έχουν ελάσσονα θαλασσαιμία. Τα άτομα αυτά διαθέτουν υποχρωματικά, μικροκυτταρικά ερυθροκύτταρα και μπορεί να εμφανίσουν ήπια αναιμία που είναι δυνατόν να διαγνωστεί αρχικά ως σιδηροπενική. Η διάγνωση της ελάσσονος θαλασσαιμίας μπορεί να διευκολυνθεί από την ηλεκτροφόρηση της αιμοσφαιρίνης, η οποία αποκαλύπτει κατά κανόνα αύξηση των επιπέδων της Hb A₂ (α₂δ₂).

Οι γονότυποι των φορέων στην Ελλάδα παρουσιάζουν αρκετές διαφοροποιήσεις. Οι μεταλλαγές IVS-1 στο νουκλεοτίδιο 1 (IVS1-1 G->T), IVS-1 στο νουκλεοτίδιο 6 (IVS1-6 T->G), IVS-1 στο νουκλεοτίδιο 110, (IVS1-110 G->A) IVS-2 στο νουκλεοτίδιο 745 (IVS2-745 C->G) και η μεταλλαγή στο κωδικόνιο 39 (cd39 C->T) είναι οι πιο συχνές στους Μεσογειακούς πληθυσμούς και συνιστούν

περίπου το 91%-95% των μεταλλαγμένων αλληλόμορφων που οδηγούν σε β-θαλασσαιμία.

Η δρεπανοκυτταρική αναιμία

Η δρεπανοκυτταρική αναιμία οφείλεται σε μία συγκεκριμένη μετάλλαξη που οδηγεί σε αμινοξική αντικατάσταση στο 6^ο αμινοξύ της β-σφαιρίνης (από γλουταμινικό σε βαλίνη) (**Διαφάνεια 17**). Η νόσος κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο δηλ. τα άτομα που πάσχουν φέρουν σε ομοζυγωτία αυτή τη μετάλλαξη. Το αποτέλεσμα αυτής της μετάλλαξης είναι η αλλαγή στη δομή των αλυσίδων β που οδηγεί σε αλλαγή της στερεοδιάταξης. Η αποξυγονωμένη HbS (όπως συμβολίζεται η αιμοσφαιρίνη με τη συγκεκριμένη μετάλλαξη) σχηματίζει πολυμερείς ινώδεις δομές που έχουν ως αποτέλεσμα μεταβολή του σχήματος του κυττάρου από αμφίκυκλο σε δρεπανοειδές. Αυτά τα παραμορφωμένα ερυθροκύτταρα έχουν μικρότερη ελαστικότητα σε σχέση με τα φυσιολογικά γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε απόφραξη των τριχοειδών αγγείων, σε καταστροφή του ερυθρού αιμοσφαιρίου και αναιμία (**Διαφάνειες 18-19**).

Το νόσημα πρωτοαναγνωρίστηκε από τον καρδιολόγο James B. Herrick το 1910, σε έναν ασθενή από τις Δυτικές Ινδίες, ο οποίος περιέγραψε το χαρακτηριστικό σχήμα των ερυθρών αιμοσφαιρίων και έδωσε και την αντίστοιχη ονομασία στο νόσημα. Η συχνότητα φορέων στους Αφροαμερικανούς εκτιμάται σε 1 στα 10 άτομα και στους μεσογειακούς λαούς σε 1 στα 40 άτομα. Οι φορείς της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας χαρακτηρίζονται από το πλεονέκτημα του ετεροζυγώτη, δηλ. από το πλεονέκτημα επιβίωσης έναντι στο *Plasmodium falciparum* που προκαλεί την ελονοσία (**Διαφάνεια 20**). Στην Ελλάδα περίπου το 1-1.5% του πληθυσμού είναι φορείς της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας. Οι ομοζυγώτες (πάσχοντες) φέρουν την παθολογική HbS στα ερυθροκύτταρά τους σε ποσοστό 100 %, ενώ οι ετεροζυγώτες σε ποσοστό 40%. Τα συμπτώματα της νόσου συνήθως δεν εμφανίζονται πριν από τον 6ο μήνα της ζωής (οπότε το μεγαλύτερο μέρος της HbF αντικαθίσταται από την HbS).

Κατά την εργαστηριακή διάγνωση των φορέων εντοπίζονται φυσιολογικές τιμές στην γενική αίματος και 35-40% HbS στην ηλεκτροφόρηση ή την ανάλυση HPLC της αιμοσφαιρίνης. Η επιβεβαίωση της διάγνωσης γίνεται με ηλεκτροφόρηση

με ισοηλεκτρική εστίαση (IEF), τέρστ δρεπάνωσης, παρατήρηση δρεπανοκυττάρων στο δείγμα και με ανάλυση DNA (**Διαφάνεια 21**). Η γενετική ανάλυση (ταυτοποίηση των μεταλλαγών) είναι απαραίτητη για την ασφαλή διάγνωση, γενετική συμβουλευτική και τον προγεννητικό έλεγχο.

Μοριακή διάγνωση αιμοσφαιρινοπαθειών

Στην Ελλάδα, λόγω της υψηλής συχνότητας φορέων εφαρμόζεται εδώ και 30 περίπου χρόνια το Εθνικό Πρόγραμμα Πρόληψης των Αιμοσφαιρινοπαθειών (ΕΠΠΑ) που περιλαμβάνει μια Μονάδα Προγεννητικής Διάγνωσης (στο Λαϊκό Νοσοκομείο) και τις Μονάδες Πρόληψης της MA (Αθήνα και 15 Μονάδες στην περιφέρεια). Η μεθοδολογία ανίχνευσης και διάγνωσης των φορέων αιμοσφαιρινοπαθειών που πραγματοποιείται στις Μονάδες Πρόληψης, βασίζεται στην ανάλυση αιματολογικών δεικτών, την κυτταρολογική ανάλυση και την βιοχημική ανάλυση των αιμοσφαιρινών. Η προγεννητική διάγνωση ξεκίνησε με μεθόδους βιοχημικής γενετικής, δηλ. ανάλυση των σφαιρινών στον 5^ο μήνα εγκυμοσύνης, ενώ αργότερα, από τη δεκαετία του 80 έως σήμερα γίνεται με ανάλυση εμβρυϊκού DNA που απομονώνεται από εμβρυϊκά κύτταρα (τροφοβλαστικού ιστού ή αμνιακά) στον 3^ο-4^ο μήνα εγκυμοσύνης.

Παρόλο που στην Ελλάδα δεν θεσμοθετήθηκε ο υποχρεωτικός έλεγχος των γονέων που επρόκειτο να αποκτήσουν παιδί, η προγεννητική διάγνωση που εφαρμόζεται έχει μειώσει δραματικά την γέννηση ομόζυγων περιστατικών. Τα τελευταία 35 χρόνια, περίπου 12.000 γονείς που ανήκαν σε ομάδα υψηλού κινδύνου απόκτησαν ένα υγιές παιδί, ενώ 4.000 ομόζυγικά έμβρυα δε γεννήθηκαν (Κέντρο Μεσογειακής Αναιμίας Αθηνών). Παρόλο που τα στοιχεία είναι δυσάρεστα, υπάρχει ελπίδα για την ανάπτυξη νεότερων μεθόδων θεραπείας, όπως η γονιδιακή θεραπεία ή οι προεμφυτευτικές τεχνικές.

Γενικά, αν και οι περισσότεροι φορείς μπορούν να εντοπιστούν μέσω απλών εξετάσεων αίματος, η γνώση των μεταλλάξεων της νόσου είναι απαραίτητη για την γενετική συμβουλευτική της αναπαραγωγής και την προγεννητική διάγνωση.

Η μεθοδολογία που ακολουθείται για τη μοριακή διάγνωση των μεταλλάξεων στις θαλασσαιμίες, ποικίλλει. Στη δρεπανοκυτταρική αναιμία, στην οποία εντοπίζεται

μία μόνο συγκεκριμένη μετάλλαξη, συνήθως χρησιμοποιείται η ανάλυση PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) επειδή υπάρχει διαφοροποίηση σε θέση αναγνώρισης που αναγνωρίζεται από ένζυμο περιορισμού μεταξύ του φυσιολογικού και του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου. Στη β-θαλασσαιμία, εάν είναι γνωστές ήδη οι μεταλλάξεις από τους γονείς π.χ. η ανάλυση γίνεται κατευθυνόμενα για αυτές. Εάν δεν είναι γνωστές, η μεθοδολογία που χρησιμοποιείται εξαρτάται από το διαγνωστικό εργαστήριο. Για παράδειγμα χρησιμοποιούνται οι εξής:

- ARMS [σύστημα ανίχνευσης μεταλλάξεων ανθεκτικών στην ενίσχυση, amplification refractory mutation system (ARMS-PCR)]
- Ανάλυση με χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών
- Αλληλούχηση
- Ανάλυση DGGE / DHPLC [Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα με κλίση αποδιατακτικού μέσου & Denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC), Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με αποδιάταξη]
- Real Time PCR / Ανάλυση HRM (ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου & High
- Resolution Melting (Τήξη υψηλής ανάλυσης)
- Αντίστροφο στύπωμα κηλίδας (Reverse dot blot)

Σε κάθε περίπτωση οι απαντήσεις δίνονται το πολύ σε δύο εβδομάδες.

Τέλος, παρόλη τη δυνατότητα μοριακής διάγνωσης και τις θεραπευτικές προσεγγίσεις, ιδιαίτερα σημαντικές είναι οι στρατηγικές πρόληψης μέσω εκπαίδευσης, ενημέρωσης και ευαισθητοποίησης τόσο του πληθυσμού όσο και των επαγγελματιών υγείας. Επίσης, σημαντικός είναι ο έλεγχος του πληθυσμού για τον εντοπισμό φορέων, η σωστή παροχή γενετικής συμβουλευτικής και η εφαρμογή του προγεννητικού ελέγχου σε συνδυασμό με τη δυνατότητα 'θεραπευτικής' διακοπής της κύησης. Όπως και στην περίπτωση της κυστικής ίνωσης έτσι και στις αιμοσφαιρινοπάθειες, συγκεκριμένα εργαστήρια παρέχουν τη δυνατότητα της προεμφυτευτικής διάγνωσης μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση.

Βιβλιογραφία

- Ιατρική Γενετική, Thompson & Thompson, Εκδόσεις Πασχαλίση, 2012.
- Joanne Traeger-Συνοδινού, Χριστίνα Βρεττού, Μανούσος Παπαδάκης, Εμμανουήλ Καναβάκης (2011). Η μοριακή βάση των Μεσογειακών Συνδρόμων, «Αίμα», τόμος 2, τεύχος 3.
- Herrick JB. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. Arch Intern Med. 1910;6: 517–21.
- Loukopoulos D. Haemoglobinopathies in Greece: prevention programme over the past 35 years. Indian J Med Res. 2011; 134(4): 572–576.
- Cao A, Saba L, Galanello R, Rosatelli M. Molecular diagnosis and carrier screening for B-thalassemia. J Am Med Assoc. 2007;278:1273–1277
- Ladis V, Chouliaras G, Berdousi H, Kanavakis E, Kattamis C. Longitudinal study of survival and causes of death in patients with thalassemia major in Greece. Ann N Y Acad Sci. 2005; 1054: 445–450.

Μοριακή διάγνωση σπάνιων μονογονιδιακών νοσημάτων

Για όλα τα μονογονιδιακά νοσήματα για τα οποία έχει ταυτοποιηθεί το υπεύθυνο γονίδιο/γονίδια είναι δυνατή η μοριακή διάγνωση. Στα διαγνωστικά εργαστήρια προσφέρεται μοριακή διάγνωση για διάφορα νοσήματα, όπως για φαιτυλεκτονουρία (ενζυμοπάθεια), μυικές δυστροφίες, οικογενή υπερχοληστερολαιμία, αιμορροφιλία κ.λπ. Σε κάθε περίπτωση και ιδιαίτερα στα πολύ σπάνια νοσήματα, για τα οποία συνήθως δεν παρέχεται μοριακή διάγνωση στα διαγνωστικά κέντρα της Ελλάδας, θα πρέπει να μελετηθεί αναλυτικότητα η διεθνής βιβλιογραφία ώστε να προσδιοριστούν όλες οι μεταλλάξεις που έχουν ταυτοποιηθεί έως τώρα σε αντίστοιχους ασθενείς.

Ένα παράδειγμα μοριακής διάγνωσης ενός πολύ σπάνιου νοσήματος (συχνότητα 1 στα 200.000 άτομα), του συνδρόμου Netherton, παρουσιάζεται στην αναρτημένη ανακοίνωση που επισυνάπτεται. Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε από το Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής & Εξελικτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας σε συνεργασία με τις Δερματολογικές Κλινικές του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και του Α.Π.Θ.