



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»

Κατηγορίες γενετικών νοσημάτων του ανθρώπου

Τα γενετικά νοσήματα με βάση την αιτιολογία τους διακρίνονται σε τρεις κύριες κατηγορίες:

- στα μονογονιδιακά,
- τα χρωμοσωματικά και
- τα πολυπαραγοντικά

1. Μονογονιδιακά νοσήματα

Τα μονογονιδιακά νοσήματα οφείλονται σε μεταλλάξεις ενός συγκεκριμένου γονιδίου. Η μετάλλαξη μπορεί να εντοπίζεται είτε στο ένα μόνο αντίγραφο γονιδίου (δηλ. στο ένα αλληλόμορφο) στο ένα χρωμόσωμα από το ζεύγος ομολόγων χρωμοσωμάτων είτε και στα δύο αλληλόμορφα. Οι μεταλλάξεις αυτές προφανώς οδηγούν σε δραματικό λάθος στη γενετική πληροφορία καθώς μία τέτοια μετάλλαξη είναι ικανή από μόνη της να οδηγήσει σε κλινικό φαινότυπο.

Η κληρονόμηση των μονογονιδιακών νοσημάτων εμφανίζει χαρακτηριστικά πρότυπα κληρονόμησης. Συνήθως αυτά τα νοσήματα είναι σπάνια στον πληθυσμό και εμφανίζουν συχνότητες 1 στα 1000 άτομα ή και πολύ μικρότερες. Υπάρχουν βέβαια και συγκεκριμένες εξαιρέσεις οι οποίες θα αναφερθούν στη συνέχεια. Παρόλη τη χαμηλή συχνότητά τους, στο σύνολό τους αφορούν σημαντικό ποσοστό του πληθυσμού (έως και 2%). Η πλειοψηφία (~90%) των μονογονιδιακών νοσημάτων πρωτοεκδηλώνεται κατά την παιδική ηλικία. Στα μονογονιδιακά νοσήματα συγκαταλέγονται και αυτά που οφείλονται σε μετάλλαξη στο DNA του μιτοχονδρίου (**Διαφάνεια 1**).

Στην βάση δεδομένων OMIM (On line Mendelian Inheritance in Man, <http://www.omim.org/>) περιλαμβάνονται ~4000 μονογονιδιακά νοσήματα. Για την πλειοψηφία αυτών (~3400) είναι γνωστό το υπεύθυνο γονίδιο, μεταλλάξεις του οποίου προκαλούν το αντίστοιχο νόσημα. Συνολικά, μέχρι τώρα έχουν ταυτοποιηθεί ~2000 γονίδια. Υπάρχουν αρκετές περιπτώσεις που μεταλλάξεις σε διαφορετικά γονίδια μπορούν να οδηγήσουν στο ίδιο νόσημα (γενετική ετερογένεια) καθώς και περιπτώσεις που διαφορετικές μεταλλάξεις στο ίδιο γονίδιο οδηγούν σε διακριτά

νοσήματα (ετερογένεια αλληλομόρφου). Ο αριθμός των 2000 γονιδίων (από τα ~23.000 που έχει ο άνθρωπος), τα οποία έχουν συσχετισθεί έως τώρα με κάποιο μονογονιδιακό νόσημα είναι πιθανόν ότι θα αυξηθεί με την εφαρμογή σύγχρονων προσεγγίσεων και μοριακών αναλύσεων μεγάλης κλίμακας που εφαρμόζονται πλέον **(Διαφάνεια 2)**.

Όπως προαναφέρθηκε οι μονογονιδιακές διαταραχές εμφανίζουν χαρακτηριστικά πρότυπα κληρονομησης τα οποία απεικονίζονται σε γενεαλογικά δένδρα με βάση το οικογενειακό ιστορικό. Αυτά τα δένδρα αποτελούν μία σχηματική απεικόνιση των ατόμων μιας οικογένειας, των νοσούντων και μη, με τυποποιημένα σύμβολα **(Διαφάνειες 3 και 4)**. Τα πρότυπα κληρονομησης εξαρτώνται από το αν το μεταλλαγμένο γονίδιο εντοπίζεται σε αυτοσωματικό (τα ζεύγη χρωμοσωμάτων 1 έως 22) ή φυλετικό (χρωμοσώματα X και Y) χρωμόσωμα και από το αν ο παθολογικός φαινότυπος είναι επικρατής ή υπολειπόμενος, δηλ. για την εκδήλωσή του αρκεί μετάλλαξη στο ένα από τα δύο ή και στα δύο αλληλόμορφα (αντίγραφα γονιδίων στα δύο χρωμοσώματα ενός ζεύγους) ενός συγκεκριμένου γονιδίου, αντίστοιχα. Συνεπώς, υπάρχουν 4 κύρια χαρακτηριστικά πρότυπα μονογονιδιακής κληρονομησης:

- Αυτοσωματικό επικρατές
- Αυτοσωματικό υπολειπόμενο
- Συνδεδεμένο με το χρωμόσωμα X, επικρατές
- Συνδεδεμένο με το χρωμόσωμα X, υπολειπόμενο

Για την εκδήλωση των επικρατών νοσημάτων αρκεί η ύπαρξη ενός μόνο μεταλλαγμένου αλληλομόρφου. Ωστόσο, παρόλο που οι ετεροζυγώτες για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο πάσχουν, συνήθως οι ομοζυγώτες έχουν βαρύτερο φαινότυπο. Όσον αφορά την επίπτωση των μεταλλάξεων αυτές είτε μπορεί να είναι κέρδους λειτουργίας, δηλ. το μεταλλαγμένο συνεχίζει και παράγει προϊόν το οποίο παρεμβάλλεται με κάποιο τρόπο στη λειτουργία του προϊόντος που παράγεται από το φυσιολογικό αλληλόμορφο είτε δεν παράγει προϊόν και η συνολική ποσότητα που παράγεται από το φυσιολογικό αλληλόμορφο δεν επαρκεί για να καλύψει τις ανάγκες του κυττάρου/ιστού/οργανισμού. Η τελευταία περίπτωση χαρακτηρίζεται ως απλοανεπάρκεια **(Διαφάνεια 5)**.

Για την εκδήλωση των υπολειπόμενων νοσημάτων θα πρέπει να υπάρχουν μεταλλάξεις και στα δύο αλληλόμορφα. Αυτές οι μεταλλάξεις μπορεί να είναι ίδιες μεταξύ τους ή διαφορετικές. Στην τελευταία περίπτωση το άτομο που τις φέρει ονομάζεται σύνθετος ετεροζυγώτης. Οι μεταλλάξεις που έχουν περιγραφεί στα υπολειπόμενα νοσήματα είναι κυρίως απώλειας λειτουργίας, δηλ. οδηγούν σε προϊόν γονιδίου που είτε δεν είναι λειτουργικό είτε έχει μειωμένη δραστηριότητα είτε παράγεται σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με το φυσιολογικό.

Για την κατανόηση του τρόπου κληρονόμησης των νοσημάτων που είναι συνδεδεμένα με το χρωμόσωμα X, θα πρέπει να γίνουν κατανοητές ορισμένες βασικές αρχές. Τα αρσενικά άτομα έχουν μόνο ένα χρωμόσωμα X και άρα έχουν ένα μόνο αντίγραφο για τα γονίδια που είναι συνδεδεμένα με το X. Αντίθετα, τα θηλυκά άτομα, που έχουν 2 χρωμοσώματα X, έχουν δύο αντίγραφα για τα γονίδια που είναι συνδεδεμένα με το X και μπορούν να είναι ομόζυγα (δύο ίδια αντίγραφα) ή ετερόζυγα (δύο διαφορετικά αντίγραφα, αλληλόμορφα). Επίσης για τα περισσότερα γονίδια του χρωμοσώματος X, τα θηλυκά έχουν απενεργοποιημένο το ένα αντίγραφο και έτσι αντισταθμίζεται η γονιδιακή δόση μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ατόμων. Για να εκδηλωθούν τα υπολειπόμενα νοσήματα που είναι συνδεδεμένα με το χρωμόσωμα X στα θηλυκά άτομα θα πρέπει να είναι μεταλλαγμένα και τα δύο αντίγραφα γονιδίου (αλληλόμορφα) ενώ στα αρσενικά άτομα αρκεί να είναι μεταλλαγμένα το ένα (και μοναδικό) αλληλόμορφο που φέρουν **(Διαφάνειες 6-9)**.

Στη συνέχεια θα αναλυθεί η παθοφυσιολογία, ο τρόπος κληρονόμησης και οι προσεγγίσεις μοριακής διάγνωσης δύο μονογονιδιακών νοσημάτων, της κυστικής ίνωσης και των αιμοσφαιρινοπαθειών. Η επιλογή των συγκεκριμένων νοσημάτων βασίστηκε στην υψηλή συχνότητα που έχουν στον πληθυσμό και συνεπώς στο ενδιαφέρον που παρουσιάζουν όσον αφορά τη διάγνωση φορέων, την προγεννητική διάγνωση και τις θεραπευτικές προσεγγίσεις

A. Κυστική ίνωση

Τρόπος κληρονόμησης και συχνότητα εμφάνισης

Η κυστική ίνωση (ή ινοκυστική νόσος, κωδικός #219700 στη βάση δεδομένων OMIM) είναι μια από τις συχνότερες γενετικές, μενδελικά κληρονομούμενες,

ασθένειες του ανθρώπου. Ο τρόπος κληρονόμησής της είναι αυτοσωμικός υπολειπόμενος, δηλαδή για να νοσήσει ένα άτομο θα πρέπει αφενός και οι δύο γονείς του να είναι φορείς και αφετέρου να κληρονομήσει τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα των γονέων του.

Στους Καυκάσιους, η συχνότητα φορέων, οι οποίοι είναι ασυμπτωματικοί, είναι ιδιαίτερα υψηλή, περίπου 4%, ενώ η συχνότητα των ασθενών εκτιμάται σε 1 στα 2500 άτομα. Ωστόσο, η κυστική ίνωση έχει διαγνωσθεί σε όλες τις πληθυσμιακές ομάδες σε χαμηλότερες συχνότητες (η αντίστοιχη συχνότητα στους Ασιάτες είναι 1/100,000 γεννήσεις) (**Διαφάνεια 10**).

Ο κίνδυνος απόκτησης πάσχοντος παιδιού για ένα ζευγάρι εξαρτάται από τη συχνότητα εμφάνισης του νοσήματος στην πληθυσμιακή ομάδα στην οποία ανήκουν. Έτσι, για τους Βορειοαμερικανούς, που κατάγονται από τη Βόρεια Ευρώπη και δεν έχουν οικογενειακό ιστορικό της νόσου ο κίνδυνος να είναι ένα άτομο φορέας είναι περίπου 1 στα 29 και συνεπώς ο κίνδυνος ενός ζευγαριού να αποκτήσει ένα προσβεβλημένο παιδί είναι 1 στα 3200. Για τα ζευγάρια τα οποία έχουν ήδη ένα παιδί με ινοκυστική νόσο, ο κίνδυνος επανεμφάνισης του νοσήματος στα επόμενα παιδιά είναι 25%.

Το 1997, στο Συνέδριο των Εθνικών Ινστιτούτων Υγείας υπήρξε ομόφωνη απόφαση και συνεστήθη η εφαρμογή ελέγχου ανίχνευσης φορέων σε όλες τις έγκυες γυναίκες και τα ζευγάρια που προγραμματίζουν εγκυμοσύνη στις ΗΠΑ. Το Αμερικανικό Κολέγιο Μαιευτικής και Γυναικολογίας υιοθέτησε αυτήν την οδηγία. Έτσι, από το 2004, περίπου το 25% των εγκύων γυναικών στις ΗΠΑ, υπεβλήθησαν σε έλεγχο ανίχνευσης φορέων ινοκυστικής νόσου.

Παθοφυσιολογία της κυστικής ίνωσης

Η κυστική ίνωση οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου *CFTR* που κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη-ρυθμιστή της διαμεμβρανικής αγωγιμότητας (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator). Ο ρόλος της πρωτεΐνης CFTR είναι η μεταφορά ιόντων χλωρίου στα επιθηλιακά κύτταρα, όπου εντοπίζεται στην κορυφαία μεμβράνη τους. Αυτά είναι και τα κύτταρα που προσβάλλονται κατά τη

νόσο. Μέσω της μεταφοράς ιόντων χλωρίου η CFTR διατηρεί την ενυδάτωση των εκκρίσεων στους αεροφόρους οδούς και πόρους (**Διαφάνεια 11**).

Η διαταραχή της λειτουργίας της επηρεάζει κυρίως τα όργανα που εκκρίνουν βλέννα όπως το αναπνευστικό σύστημα, το πάγκρεας, η χολή, το γεννητικό σύστημα του άρρενος, το έντερο και οι ιδρωτοποιοί αδένες. Ειδικότερα στους πνεύμονες, η αφυδατωμένη και κολλώδης βλέννα που συσσωρεύεται αποφράσσει την κυκλοφορία του αέρα και ευνοεί την ανάπτυξη παθογόνων οργανισμών, με τελικό αποτέλεσμα την καταστροφή των ιστών και την αναπνευστική ανεπάρκεια. Αντίστοιχα στο πάγκρεας, η απώλεια ενυδάτωσης των εκκρίσεων οδηγεί στην κατακράτηση των ενζύμων του παγκρέατος με αποτέλεσμα την καταστροφή του παρεγχύματος και την ίνωση του οργάνου. Τέλος, η δυσλειτουργία της CFTR στους ιδρωτοποιούς αδένες και πόρους οδηγεί στην αύξηση της συγκέντρωσης του χλωριούχου νατρίου του ιδρώτα (**Διαφάνειες 12-14**). .

Ιστορική αναδρομή

Η πρώτη ολοκληρωμένη περιγραφή της παθολογίας της κυστικής ίνωσης έγινε το 1938 από τον Andersen. Εκείνη την εποχή, το επίκεντρο της κλινικής έρευνας ήταν η παγκρεατική ίνωση και η διαταραχή στην απορρόφηση των τροφών (λόγω των παχίων εκκρίσεων που επηρεάζουν το πάγκρεας και εμποδίζουν τα πεπτικά ένζυμα να φτάσουν στα έντερα όπου συμμετέχουν στη διάσπαση και την απορρόφηση των τροφών).

Αρκετά αργότερα αναγνωρίστηκε ότι η πνευμονική νόσος αποτελεί την κύρια αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας. Τότε, η διάγνωση της νόσου γινόταν αποκλειστικά με βάση τα κλινικά χαρακτηριστικά και η μέση επιβίωση ήταν περίπου 6 μήνες. Η συμμετοχή των ιδρωτοποιών αδένων στην παθοφυσιολογία της νόσου αποκαλύφθηκε κατά τη διάρκεια ενός καύσωνα το 1948 επειδή αρκετοί ασθενείς με κυστική ίνωση μεταφέρθηκαν σε νοσοκομεία με υπονατριαιμική αφυδάτωση (λόγω αυξημένης απώλειας νατρίου και ύδατος από τους ιδρωτοποιούς αδένες). Αυτό το γεγονός και ο περαιτέρω έλεγχος των ασθενών οδήγησε στην ανάπτυξη της μέτρησης του χλωρίου στον ιδρώτα («Το τεστ ιδρώτα») από τους Gibson και Cooke το 1959 ως διαγνωστικό τεστ για την κυστική ίνωση (**Διαφάνεια 15**).

Ο συνδυασμός της ανάπτυξης ενός αξιόπιστου και απλού διαγνωστικού τεστ σε συνδυασμό με την αυξημένη επιβίωση των ασθενών, οδήγησαν στον προσδιορισμό μιας σειράς καλά χαρακτηρισμένων κλινικών χαρακτηριστικών. Για τις επόμενες δεκαετίες, ο συνδυασμός αυτών των κλινικών χαρακτηριστικών (προοδευτικά εξελισσόμενη πνευμονική νόσος, ανεπάρκεια του εξωκρινούς παγκρέατος, αποφρακτική αζωοσπερμία, καθυστέρηση της ανάπτυξης κ.λπ) με τα αποτελέσματα στο «τεστ ιδρώτα» (αυξημένη συγκέντρωση χλωρίου στον ιδρώτα) αποτέλεσαν το πρότυπο για τη διάγνωση της κυστικής ίνωσης. Ωστόσο, υπάρχει σημαντική ποικιλότητα στην κλινική εικόνα των ασθενών, με ορισμένους να εμφανίζουν συμπτώματα από τη γέννηση ενώ άλλους να είναι ασυμπτωματικοί για μήνες ή ακόμα και χρόνια.

Παρόλο που δεν υπάρχει θεραπεία για την κυστική ίνωση, η αντιμετώπιση των συμπτωμάτων έχει αυξήσει σημαντικά το προσδόκιμο ζωής στα 30-40 έτη. Η αντιμετώπιση στοχεύει στην κάθαρση των εκκρίσεων στους πνεύμονες, την καταπολέμηση των πνευμονικών λοιμώξεων, την αναπλήρωση των παγκρεατικών ενζύμων και την πρόληψη της εντερικής απόφραξης. Ωστόσο, όσον αφορά τους πνεύμονες, η μόνη αποτελεσματική θεραπεία της αναπνευστικής ανεπάρκειας είναι η μεταμόσχευση.

Η ανακάλυψη του γονιδίου *CFTR* το 1989, μεταλλάξεις του οποίου ευθύνονται για την κυστική ίνωση οδήγησε αφενός στην συσχέτιση συγκεκριμένων κλινικών χαρακτηριστικών με συγκεκριμένους γονοτύπους (μεταλλάξεις) και αφετέρου άνοιξε το δρόμο για τη μοριακή διάγνωση της νόσου.

Το γονίδιο και η πρωτεΐνη CFTR - Μεταλλάξεις

Το γονίδιο *CFTR* εντοπίζεται στη χρωμοσωματική περιοχή 7q13 περίπου 190 kb. Περιλαμβάνει 27 εξόνια και κωδικοποιεί μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη 1480 αμινοξέων, η οποία φέρει τις εξής περιοχές: δύο διαμεμβρανικές περιοχές με έξι διαμεμβρανικές ακολουθίες έκαστη, δύο περιοχές πρόσδεσης του ATP και μία ρυθμιστική περιοχή που φέρει πολλές θέσεις φωσφορυλίωσης. Ο διάυλος σχηματίζεται από τις 12 διαμεμβρανικές ακολουθίες. Το άνοιγμα και το κλείσιμο του διαύλου επιτυγχάνεται από την υδρόλυση του ATP το οποίο προσδένεται στις δύο

περιοχές που προαναφέρθηκαν. Η φωσφορυλίωση της ρυθμιστικής περιοχής ελέγχει σε μεγάλο βαθμό τη λειτουργία του διαύλου (**Διαφάνειες 11, 16 και 17**). .

Η πρώτη μετάλλαξη που εντοπίστηκε στο *CFTR* σε ασθενείς με κυστική ίνωση ήταν το έλλειμμα τριών νουκλεοτιδίων, που αντιστοιχεί στο έλλειμμα μιας φαινυλαλανίνης στο επίπεδο της πρωτεΐνης στη θέση 508. Αυτή η μετάλλαξη συμβολίζεται ΔF508 και εντοπίζεται στην πρώτη περιοχή σύνδεσης του ATP. Η συχνότητά της είναι ιδιαίτερα υψηλή και κατά μέσο όρο στους Καυκάσιους αντιστοιχεί σε ποσοστό ~60% των μεταλλάξεων που έχουν ταυτοποιηθεί ως τώρα. Ειδικότερα, στη Βόρεια Ευρώπη η συχνότητά της είναι 70% ενώ στη Νότια Ετρώπη είναι 30-50%. (**Διαφάνειες 18-19**).

Παρόλο που η ΔF508 είναι η πιο συχνή μετάλλαξη, μέχρι τώρα έχουν αναφερθεί περισσότερες από 1400 διαφορετικές μεταλλάξεις στο γονίδιο *CFTR* που σχετίζονται με την κυστική ίνωση. Η συχνότητα και το είδος της μετάλλαξης διαφέρει μεταξύ των πληθυσμιακών ομάδων. Στους Καυκάσιους, ελάχιστες έχουν συχνότητα μεγαλύτερη από 0,5% (λιγότερες από δέκα) ενώ οι υπόλοιπες είναι πιο σπάνιες. Περίπου οι μισές από τις μεταλλάξεις που έχουν ταυτοποιηθεί είναι παρερμηνεύσιμες, δηλαδή προκαλούν αμινοξική αντικατάσταση ενώ λιγότερες από το 1% είναι γονιδιωματικές αναδιατάξεις. Ελάχιστες μεταλλάξεις (6) έχουν βρεθεί σε όλες τις πληθυσμιακές ομάδες. Παρόλο που έχουν ταυτοποιηθεί τόσες πολλές διαφορετικές μεταλλάξεις που συσχετίζονται με την εμφάνιση της νόσου, η λειτουργική τους επίπτωση στην πρωτεΐνη έχει μελετηθεί για σχετικά λίγες από αυτές (**Διαφάνειες 20-22**).

Παρόλα αυτά, έχουν περιγραφεί συγκεκριμένοι γενικοί μηχανισμοί και κατηγορίες πρωτεϊνικής δυσλειτουργίας. Με βάση αυτό, η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει μεταλλάξεις που δημιουργούν πρώιμο κωδικόνιο λήξης της μετάφρασης της πρωτεΐνης ή αστάθεια στα μόρια mRNA. Η δεύτερη κατηγορία αφορά μεταλλάξεις που διαταράσσουν την αναδίπλωση της πρωτεΐνης με συνέπεια να δημιουργείται πρόβλημα στην επεξεργασία της, που φυσιολογικά πραγματοποιείται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στο σύστημα Golgi. Αυτή η επεξεργασία είναι απαραίτητη για την έκκρισή της. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκει και η μετάλλαξη ΔF508 που προαναφέρθηκε. Αυτά τα μεταλλαγμένα μόρια δεν μπορούν να εξέλθουν από το ενδοπλασματικό δίκτυο λόγω λανθασμένης αναδίπλωσής τους. Η τρίτη κατηγορία περιλαμβάνει μεταλλάξεις που επηρεάζουν τη ρύθμιση της πρωτεΐνης

καθώς εντοπίζονται στις περιοχές πρόσδεσης του ATP και στη ρυθμιστική περιοχή. Η τέταρτη κατηγορία μεταλλάξεων οδηγεί σε διαταραχές της αγωγιμότητας του χλωρίου και εντοπίζονται στις διαμεμβρανικές περιοχές. Η πέμπτη κατηγορία περιλαμβάνει μεταλλάξεις που σχετίζονται με μειωμένα επίπεδα παραγωγής ή τελικής αφθονίας μορίων mRNA. Τέλος, η έκτη κατηγορία αφορά μεταλλάξεις που δεν επηρεάζουν τη σύνθεση των μορίων της πρωτεΐνης αλλά τελικά τα καθιστούν ασταθή στην κυτταρική μεμβράνη όπου είναι ο τελικός εντοπισμός τους. Ορισμένες μεταλλάξεις, όπως η ΔF508, θεωρούνται σοβαρές και συσχετίζονται με βαριά κλινική εικόνα ενώ άλλες θεωρούνται πιο ήπιες. Συνεπώς σε αρκετές περιπτώσεις η εύρεση της μετάλλαξης μπορεί να βοηθήσει στην πρόγνωση της βαρύτητας της νόσου (**Διαφάνεια 23**).

Μοριακή διάγνωση μεταλλάξεων

Η γνώση των μεταλλάξεων που εντοπίζονται σε έναν πληθυσμό παρέχει χρήσιμες πληροφορίες για την εφαρμογή προγραμμάτων πρόληψης κατά τα οποία είναι δυνατόν να εντοπιστούν οι φορείς και να πραγματοποιηθεί προγεννητική διάγνωση. Ο σκοπός του μοριακού ελέγχου είναι να δώσει τη δυνατότητα στα ζευγάρια που πρόκειται να τεκνοποιήσουν τη δυνατότητα επιλογής διακοπής της κύησης. Στην περίπτωση που δεν εφαρμοστεί προγεννητικός έλεγχος ή εάν οι γονείς επιλέξουν την ολοκλήρωση της κύησης, η άμεση διάγνωση των νεογνών που πάσχουν μπορεί να βοηθήσει εν μέρει π.χ. με την παροχή ειδικής διατροφής και παγκρεατικών ενζύμων. Με βάση αυτό, αιτιολογείται και ο καθολικός έλεγχος των νεογνών.

Γενικά, ο καθολικός έλεγχος του πληθυσμού για την ανίχνευση φορέων εφαρμόζεται εάν είναι δυνατή η ανίχνευση του 90% των μεταλλάξεων. Για την κυστική ίνωση το αντίστοιχο ποσοστό είναι χαμηλότερο (της τάξεως του 80-85%). Ωστόσο, στις Η.Π.Α, εφαρμόζεται έλεγχος των ζευγαριών, τα οποία όμως απευθύνονται σε ιδιωτικές ιατρικές υπηρεσίες. Έτσι, καθώς δεν είναι εφικτό να πραγματοποιηθεί μοριακός έλεγχος όλων των ατόμων που βρίσκονται σε αναπαραγωγική ηλικία, συνήθως εφαρμόζεται σε άτομα που έχουν ένα συγγενή που πάσχει. Αυτό έχει το πλεονέκτημα της ανίχνευσης φορέων σε ομάδες υψηλού κινδύνου. Μάλιστα, ο μοριακός έλεγχος σε αυτά τα άτομα είναι αρκετά ευκολότερος

επειδή έχουν ήδη ταυτοποιηθεί οι μεταλλάξεις στο άτομο που πάσχει οπότε ο έλεγχος στους συγγενείς είναι κατευθυνόμενος και αφορά μόνο τις συγκεκριμένες μεταλλάξεις.

Ο προσδιορισμός της ομάδας υψηλού κινδύνου στις χώρες που δεν εφαρμόζεται καθολικός έλεγχος του πληθυσμού δεν είναι παγιωμένος και γενικά υπάρχει έντονος προβληματισμός. Γενικά, συστήνεται η επιλογή των ατόμων να βασίζεται στην ιδιαιτερότητα κάθε πληθυσμού. Από την άλλη, ο μοριακός έλεγχος σαφώς και μπορεί να εφαρμοσθεί σε όλα τα ζευγάρια που το επιθυμούν με την προϋπόθεση ότι μπορούν να καλύψουν το κόστος και ότι πραγματοποιείται σε εργαστήριο που μπορεί να ανιχνεύσει μεγάλο ποσοστό των μεταλλάξεων (85-90%).

Το γεγονός ότι η μετάλλαξη ΔF508 αντιστοιχεί σε ιδιαίτερα υψηλό ποσοστό στο σύνολο των μεταλλάξεων βοηθάει στις περιπτώσεις μοριακού ελέγχου ασθενών που δεν έχουν οικογενειακό ιστορικό της νόσου. Σε αυτές τις περιπτώσεις πραγματοποιείται έλεγχος για την ύπαρξη αυτής της μετάλλαξης και στη συνέχεια για άλλες 22 που είναι μεν λιγότερο συχνές αλλά όχι και ιδιαίτερα σπάνιες. Οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις, οι οποίες έχουν προταθεί από το Αμερικανικό Κολέγιο Ιατρικής Γενετικής, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σε άλλες περιπτώσεις, π.χ. για την ταυτοποίηση φορέων και την προγεννητική διάγνωση. Επειδή πλέον είναι γνωστές οι μεταλλάξεις που σχετίζονται με την κυστική ίνωση για πολλές πληθυσμιακές ομάδες, σε κάθε ομάδα εφαρμόζεται άμεσος έλεγχος για τις συγκεκριμένες μεταλλάξεις. Στο πλαίσιο της προγεννητικής διάγνωσης, που εφαρμόζεται όταν και οι δύο γονείς είναι φορείς (και συνεπώς ο κίνδυνος γέννησης παιδιού που πάσχει είναι 25%), συνήθως εφαρμόζεται λήψη δείγματος από χοριακές λάχνες νωρίς κατά την κύηση (10η με 12η εβδομάδα) και ακόλουθη μοριακή ανάλυση.

Επιπλέον, ο μοριακός έλεγχος για μεταλλάξεις στο *CFTR* θα πρέπει να εφαρμόζεται και σε άρρενες που εμφανίζουν υπογονιμότητα και έχουν οικογενειακό ιστορικό μονόπλευρης ή αμφοτερόπλευρης έλλειψης σπερματικού πόρου, κλινικό χαρακτηριστικό της κυστικής ίνωσης, καθώς και στις συντρόφους τους.

Στην Ελλάδα, και στην ευρύτερη περιοχή της Μεσογείου, η μοριακή διάγνωση της νόσου είναι αρκετά δυσκολότερη σε σχέση με άλλες πληθυσμιακές ομάδες λόγω των υψηλών επιπέδων γενετικής ετερογένειας (αριθμού διαφορετικών μεταλλάξεων), γεγονός που αφενός απαιτεί τη διερεύνηση μεγάλου αριθμού

μεταλλάξεων και αφετέρου μπορεί να οδηγήσει σε διαγνωστικά προβλήματα ιδιαίτερα στις περιπτώσεις νέων ή πολύ σπάνιων μεταλλάξεων, κυρίως των παρερμηνεύσιμων για τις οποίες δεν είναι δυνατή η αξιολόγηση της κλινικής τους σημασίας εάν δεν υπάρχουν προηγούμενες πληροφορίες από λειτουργικά πειράματα. Ενδεικτικά, σε μία μεγάλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Ελλάδα και στην οποία εφαρμόστηκε μοριακή ανάλυση σε 437 ασθενείς, ταυτοποιήθηκαν 80 διαφορετικές μεταλλάξεις, οι 20 από τις οποίες έχουν βρεθεί μόνο σε Έλληνες. Από τις 80 μεταλλάξεις, οι 8 ήταν αρκετά συχνές-σε αυτές ανήκει και η ΔF508 με συχνότητα εμφάνισης στη συγκεκριμένη μελέτη 53,4%, 12 μεταλλάξεις εμφάνισαν συχνότητα από 0,5% έως 1% ενώ οι υπόλοιπες 60 ήταν πολύ σπάνιες και ταυτοποιήθηκαν σε 1 έως 3 χρωμοσώματα (**Διαφάνεια 24**).

Ο χαρακτηρισμός των μεταλλάξεων και των συχνοτήτων τους είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την εφαρμογή προγραμμάτων μοριακού ελέγχου του πληθυσμού και για την προγεννητική διάγνωση. Η προγεννητική διάγνωση σε ζευγάρια που έχουν κίνδυνο απόκτησης παιδιού με τη νόσο 25% (επειδή και οι δύο είναι φορείς) αποτελεί μία εύκολη περίπτωση από την άποψη της μοριακής διάγνωσης. Σε αυτές τις περιπτώσεις και εφόσον έχουν ταυτοποιηθεί οι μεταλλάξεις στους γονείς πριν από την κύηση, ο μοριακός έλεγχος μπορεί να πραγματοποιηθεί σε δείγμα από χοριακές λάχνες ή από αμνιακό υγρό σε διάστημα λίγων ημερών.

Μεθοδολογία μοριακής διάγνωσης και προεμφυτευτικός έλεγχος

Η μεθοδολογία που εφαρμόζεται στα διαγνωστικά εργαστήρια ποικίλλει και αντίστοιχα ποικίλλει και το ποσοστό των μεταλλάξεων που μπορούν να ανιχνεύσουν. Για παράδειγμα, τα διαθέσιμα αυτοματοποιημένα κιτ (έτοιμα αντιδραστήρια για την εκτέλεση ενός πειράματος) που υπάρχουν στο εμπόριο δεν είναι κατάλληλα για χώρες που παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια μεταλλάξεων, όπως είναι η Ελλάδα. Η ικανότητα ανίχνευσής τους για τις μεταλλάξεις στην Ελλάδα ανέρχεται μόνο στο 70-75%. Ωστόσο, αρκετά διαγνωστικά εργαστήρια εφαρμόζουν και άλλες εναλλακτικές μεθόδους που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR), π.χ. ανάλυση DGGE (ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης με αυξανόμενη συγκέντρωση αποδιατακτικών ουσιών, denaturing gradient gel electrophoresis), multiplex PCR, ανάλυση της κωδικής περιοχής ολόκληρου του γονιδίου με PCR-αλληλούχηση. Ανάλογα με την προσέγγιση που

ακολουθείται τα διαγνωστικά εργαστήρια μπορούν να ανιχνεύσουν από το 70% έως και όλες τις γνωστές μεταλλάξεις, με αντίστοιχο κόστος εξέτασης.

Πλέον, σε συγκεκριμένα διαγνωστικά εργαστήρια είναι εφικτή και η προεμφυτευτική μοριακή διάγνωση. Αυτή μπορεί να εφαρμοσθεί σε περιπτώσεις ζευγαριών που είναι και οι δύο φορείς και οι οποίοι δεν επιθυμούν να πραγματοποιηθεί ο μοριακός έλεγχος κατά τη διάρκεια της κύησης εφόσον όμως έχει βρεθεί η υπεύθυνη μετάλλαξη και στους δύο. Για να εφαρμοσθεί η προεμφυτευτική μοριακή διάγνωση, δηλ. ο έλεγχος κυττάρων των εμβρύων ώστε να μεταφερθούν στη μήτρα μόνο υγιή θα πρέπει να προηγηθεί εξωσωματική γονιμοποίηση.

Βιβλιογραφία

- Ιατρική γενετική, Thompson & Thompson, Εκδόσεις Πασχαλίδη, 2012.
- Andersen D (1938) Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathological study. *Am J Dis Child* 56:344–399
- Gibson LE, Cooke RE (1959) A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* 23:545–549
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z et al (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245:1066–1073
- Kanavakis A., Efthymiadou S., Strofalis S., Doudounakis J., Traeger-Synodinos and M Tzetis Cystic fibrosis in Greece: molecular diagnosis, haplotypes, prenatal diagnosis and carrier identification amongst high-risk individuals. *Clin Genet* 2003; 63: 400–409
- M. Poulou, I. Fylaktou, M. Fotoulaki, E. Kanavakis, M. Tzetis (2012) Cystic fibrosis genetic counseling difficulties due to the identification of novel mutations in the CFTR gene. *Journal of Cystic Fibrosis*, 11 (4):344-348
- Kanavakis E, Efthymiadou A, Strofalis S, Doudounakis S, Traeger-Synodinos J, Tzetis M. Cystic fibrosis in Greece: molecular diagnosis, haplotypes, prenatal diagnosis and carrier identification amongst high-risk individuals. *Clin Genet*.2003;63(5):400–409]

- Newborn screening for cystic fibrosis (2012) Wagener JS, Zemanick ET, Sontag MK. *Curr Opin Pediatr* 24(3):329-35.