



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



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

## Γονιδιακή θεραπεία της μεσογειακής αναιμίας

POST GRADUATE THESIS

### Gene therapy for thalassemia



**ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/NAME OF STUDENT**

Δαλαβάγκας Αντώνης  
**Dalavagkas Antonis**

**ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR**

Κριεμπάρδης Αναστάσιος  
Kriebardis Anastasios

**ΑΙΓΑΛΕΩ/ΑΙΓΑΛΕΟ 2022**



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



POST GRADUATE THESIS

## **Gene therapy for thalassemia**

DALAVAGKAS ANTONIS

20027

[dalavagkasantonis@hotmail.gr](mailto:dalavagkasantonis@hotmail.gr)

FIRST SUPERVISOR

KRIEMBARDIS ANASTASIOS

SECOND SUPERVISOR

GEORGATZAKOU HARA

AIGALEO 2022

## Επιτροπή εξέτασης

Ημερομηνία εξέτασης: 3 Οκτωβρίου 2022

	Ονόματα εξεταστών	Υπογραφή
1 <sup>ος</sup> Εξεταστής	Αναστάσιος Κριεμπάρδης	
2 <sup>ος</sup> Εξεταστής	Χαρά Γεωργατζάκου	

### **Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας**

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος Δαλαβάρκας Αντώνιος του Σπυρίδωνος, με αριθμό μητρώου 20027 φοιτητής 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».

Ο Δηλών

## **Αφιέρωσεις**

Στην οικογένειά μου που μου συμπαράσταθη στην ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειάς μου.

## Περίληψη

Η Μεσογειακή Αναιμία ή Θαλασσαιμία, όπως αλλιώς ονομάζεται, αποτελεί μια κληρονομούμενη ασθένεια με αυτοσωμικό υπολειπόμενο γονίδιο και εμφανίζεται σε παγκόσμιο επίπεδο, σε αντίθεση με αυτό που υποδηλώνει η ονομασία της. Η Μεσογειακή Αναιμία επιβαρύνει σε σημαντικό βαθμό την ποιότητα ζωής του ασθενούς τόσο σωματικά όσο και οικονομικά, ακόμα και σε οικονομικά αναπτυγμένες χώρες καθώς επίσης και το προσδόκιμο επιβίωσης του.

Οι μεταγγίσεις αίματος διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ζωή αυτών των ανθρώπων και γι' αυτό οι συγκεκριμένοι ασθενείς χαρακτηρίζονται ως:

- α) εξαρτώμενοι μεταγγίσεων (TDT- transfusion depended thalassemia) και θα πρέπει να υποβάλλονται σε τακτικές μεταγγίσεις και σε θεραπεία με χηλικούς παράγοντες. Αυτοί είναι κυρίως ασθενείς με κύρια β-θαλασσαιμία (μείζονα ή νόσο του Cooley), όπου έχουμε παντελή έλλειψη των β-αλυσίδων ( $\beta^0$ ) ή παράγονται σε πολύ μικρή ποσότητα ( $\beta^+$ ) και άλλες σοβαρές μορφές όπως πχ. HbE/β-θαλασσαιμία όπου υποβάλλονται σε μεταγγίσεις από τα πρώτα χρόνια της ζωής τους.
- β) μη εξαρτώμενοι (NTDT – non- transfusion depended thalassemia) των οποίων η επιβίωση δεν εξαρτάται από τις συχνές μεταγγίσεις αίματος. Σε αυτούς ανήκουν ασθενείς με ενδιάμεση β-θαλασσαιμία ( $\beta^+$  ή  $\beta^{++}$ ) ή ελάσσονα (ετερόζυγη) β-θαλασσαιμία (ασυμπτωματικοί ασθενείς) οι οποίοι αναγκάζονται να υποβληθούν σε σποραδικές μεταγγίσεις αίματος σε μεγαλύτερες ηλικίες (στα τελευταία χρόνια της παιδικής τους ηλικίας και στην ενήλικη ζωή τους) ή όταν βρεθούν σε έκτακτες καταστάσεις όπως στην εγκυμοσύνη, σε λοιμώξεις ή στο χειρουργείο. Οι τελευταίοι δεν παύουν να βρίσκονται σε κίνδυνο λόγω της υποκείμενης αναιμίας και της υπερφόρτωσης με σίδηρο, έστω και αν οι καταστάσεις αυτές είναι σε μεγάλο βαθμό περιορισμένες σε σχέση με την πρώτη ομάδα (Carpellini, 2017).

Στην παρούσα βιβλιογραφική μελέτη έχουν χρησιμοποιηθεί αναφορές από δημοσιευμένες μελέτες στη βάση δεδομένων MEDLINE οι οποίες αναζητήθηκαν με τη μηχανή αναζήτησης της PubMed, με σκοπό να επισημανθούν οι μέχρι σήμερα ανεπαρκείς μέθοδοι αντιμετώπισης της μεσογειακής αναιμίας και να αναδειχθούν οι νέοι δρόμοι που χαράζονται για τη ριζική αντιμετώπιση της με την ολοκλήρωση των μελετών που γίνονται στο πεδίο της γονιδιακής θεραπείας.

**Λέξεις κλειδιά:**

Γονιδιακή θεραπεία, β-θαλασσαιμία, αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο, μετάγγιση αίματος, φορέας, υπερφόρτωση σιδήρου, δρεπανοκυτταρική αναιμία.

## **Abstract**

Mediterranean Anemia or Thalassemia, as it is also called, is an inherited disease with an autosomal recessive gene and occurs worldwide, contrary to what its name suggests. Mediterranean Anemia places a significant burden on the patient's quality of life both physically and economically, even in economically developed countries, as well as on their life expectancy.

Blood transfusion play an important role in the lives of those people and tha is why these patients are classified as:

- a) Transfusion depended thalassemia (TDT) and should undergo regular transfusions and iron chelation therapy. These are mainly patients with primary (major or Cooley disease), beta thalassemia where there is absence of beta chains ( $\beta^0$ ) and other severe forms such as HbE/ $\beta$ -thalassemia, who undergo from the early years of their life.
- b) Non- transfusion depended (NTDT) whose survival does not depend on frequent blood transfusion. These are patients with moderate ( $\beta^+$  or  $\beta^{++}$ ) or minor (heterozygous) beta thalassemia (asymptomatic patients) who have to undergo sporadic blood transfusions in older age (in the last years of childhood and in adulthood) or when they are in emergency situations such as pregnancy, infections or surgery. The latter are still at risk due to underlying anemia and iron overload even if these situations are largely limited compared to the first group (Cappellini, 2017).

In this bibliographic study, references from published studies in the MEDLINE database, which were searched using the PubMed search engine, have been used, in order to underline the currently inadequate methods for the treatment of thalassemia and in order to highlight the new paths that are being charted for its radical treatment with the completion of studies in the field of gene therapy.

## **Key words:**

Gene therapy,  $\beta$ -thalassemia, hematopoietic stem cell, blood transfusion, vector, iron overload, sickle cell disease.



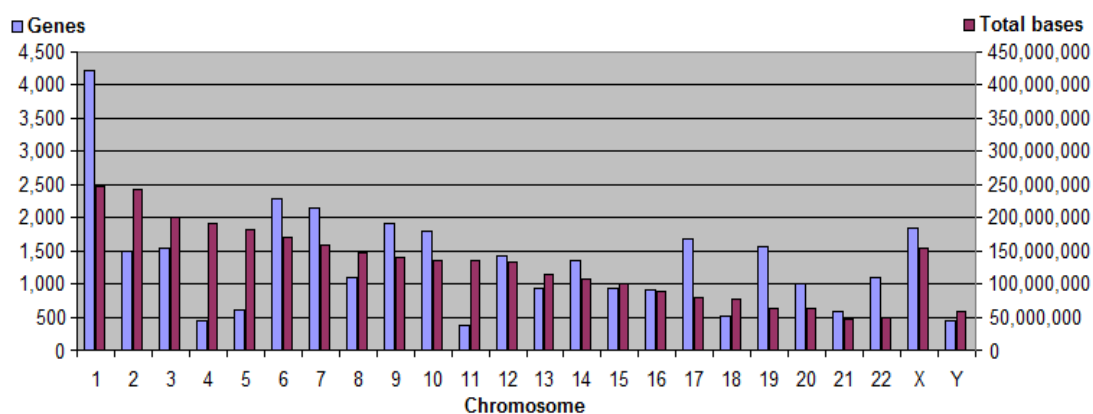
## Περιεχόμενα

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας.....	iv
Αφιερώσεις.....	v
Περίληψη .....	vi
Abstract .....	viii
Πρόλογος.....	1
Γενικά επιδημιολογικά στοιχεία .....	2
Παθοφυσιολογία μορίου αιμοσφαιρίνης .....	4
A-Θαλασσαιμία .....	5
B-Θαλασσαιμία.....	7
Δρεπανοκυτταρική αναιμία .....	10
Κλινική εικόνα .....	11
Θεραπευτικές προσεγγίσεις στη μεσογειακή αναιμία .....	13
Ο ρόλος των μεταγγίσεων και συνέπειές τους .....	13
Μεταμόσχευση μυελού οστών .....	15
Γονιδιακή θεραπεία.....	16
Φορέας .....	17
Στρατηγικές χρήσεις του Lentiviral Vector.....	20
Ο Lentivirus (LVs) ως φορέας στη μέθοδο της γονιδιακής θεραπείας.....	22
Δομή του lentivirus .....	22
Παθογένεια του lentivirus .....	23
Χρήση του lentivirus στη γονιδιακή θεραπεία.....	24
Ο Lentiviral σε κλινικές δοκιμές στη β-μεσογειακή αναιμία .....	28
Το σκεύασμα Zynteglo .....	32
Γονιδιακή θεραπεία στη δρεπανοκυτταρική αναιμία.....	32
Έλληνες επιστήμονες στις κλινικές μελέτες της γονιδιακής θεραπείας .....	36
Γενικά στατιστικά δεδομένα από την εφαρμογή των προτεινόμενων θεραπειών.....	37
Συμπεράσματα .....	39
Αναφορές .....	40
Πηγές Εικόνων .....	48



## Πρόλογος

Η ολοκλήρωση του προγράμματος για το ανθρώπινο γονιδίωμα (human genome) στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα (2001) που αποκωδικοποίησε το σύνολο των αλληλουχιών των νουκλεϊκών οξέων του ανθρώπου ώθησε στην αντιμετώπιση κληρονομούμενων ασθενειών από την επιστημονική κοινότητα. Στα 23 ζεύγη χρωμοσωμάτων του κυτταρικού πυρήνα ταυτοποιήθηκαν περίπου 3 δισεκατομμύρια ζεύγη βάσεων (2.851.330.913 νουκλεοτίδια) που κωδικοποιούν περίπου 20.000 με 25.000 πρωτεΐνες (Consortium, 2004).



**Εικόνα 1.** Διάγραμμα που δείχνει τον αριθμό ζευγών βάσεων και γονιδίων σε κάθε χρωμόσωμα του ανθρώπου.

Η χαρτογράφηση αυτή οδήγησε σε μια εναλλακτική προσέγγιση ασθενειών που οφείλονται σε γονιδιακές βλάβες. Τέτοιου είδους βλάβες που εντοπίζονται κυρίως με κληρονομούμενη μετάλλαξη στο αλληλόμορφο γονίδιο οδηγούν σε τροποποίηση της έκφρασης της πληροφορίας που φέρνει και αλλαγή του φαινοτύπου. Η θαλασσαιμία ή μεσογειακή αναιμία συνδέεται με ελλιπή παραγωγή αιμοσφαιρίνης στον οργανισμό, της υπεύθυνης δηλαδή πρωτεΐνης που μεταφέρει το οξυγόνο στους ιστούς. Πρόκειται για μια από τις πολλές ασθένειες όπου η γονιδιακή θεραπεία εμπεριέχεται στο πεδίο δράσης της. Άλλες ασθένειες όπως η αιμορροφιλία (ή αιμοφιλία) (Nathwani, 2019), παθήσεις της όρασης (αχρωματοψία κ.α.) (Hassall, 2017), η νωτιαία μυϊκή δυστροφία (Kirschner, 2020), οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (όπως οι νόσοι Parkinson, Alzheimer, Huntington) (Sudhakar, 2019), διάφορες μορφές καρδιοπαθειών (Deng, 2020), η κυστική ίνωση (Maule, 2020), κάποιες μορφές καρκίνου (Sun, 2019) αποτελούν ανοικτό πεδίο

έρευνας για την εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν οι μελέτες οι οποίες, ιδιαίτερα στις μέρες μας λόγω της πανδημίας από τον ιό COVID-19, εμφανίζουν μεγάλη πρόοδο και χρησιμοποιούν τα δεδομένα από την εφαρμογή της γενετικής μηχανικής για την κατασκευή εμβολίου για την αντιμετώπιση της ασθένειας SARS-CoV-2 για την ενίσχυση του αμυντικού συστήματος του ασθενούς (Nakagami, 2021).

Ανάλογα με την ασθένεια εφαρμόζεται και διαφορετικό θεραπευτικό πρωτόκολλο, τροποποιώντας παραμέτρους όπως το αλληλόμορφο υγιές γονίδιο που πρέπει να εισαχθεί, το είδος των κυττάρων που στοχεύονται μέσω της θεραπείας και ο φορέας που θα χρησιμοποιηθεί ως μεταφορέας του αλληλόμορφου «φυσιολογικού» γονιδίου.

Η μεσογειακή αναιμία ή θαλασσαιμία οφείλεται σε έλλειψη ή ποσοτική μετάλλαξη του υπεύθυνου γονιδίου κατά την οποία παρουσιάζεται μειωμένη σύνθεση ή/και έλλειψη μίας αλυσίδας (α ή β) που συμμετέχουν στο σχηματισμό του μορίου της αιμοσφαιρίνης. Αντίθετα η δρεπανοκυτταρική αναιμία προκαλείται από μια ποιοτική-σημειακή βλάβη των παραγόμενων σφαιρινών. Ως αποτέλεσμα των παραπάνω είναι η διαταραχή της σύνθεσης φυσιολογικών μορίων αιμοσφαιρίνης και εμφάνιση της αναιμίας.

### **Γενικά επιδημιολογικά στοιχεία**

Αυτή η κληρονομική νόσος που μεταβιβάζεται με υπολειπόμενο αυτοσωμικό γονίδιο εμφανίζει ιδιαίτερο επιδημιολογικό ενδιαφέρον στην περιοχή της Μεσογείου Θάλασσας (εξ ου και η ονομασία της από τις ελληνικές λέξεις «θάλασσα» και «αίμα»). Σύμφωνα με τον κ. Λουκόπουλο αυτή η επεξήγηση μάλλον αποτελεί παρερμηνεία ενός κειμένου του Έλληνα ιστορικού Ξενοφώντα όπου αναφερόμενος στην ασθένεια αυτή η οποία εμφανιζόταν σε περιοχές γύρω από τη θάλασσα εννοούσε του Εύξεινου Πόντου και όχι της Μεσογείου (Λουκόπουλος, 2015).

Ιστορικά, η επικράτηση της β-θαλασσαιμίας είναι στενά συνδεδεμένη κυρίως με τις περιοχές που βρέχονται από τη Μεσόγειο θάλασσα, αλλά και τις περιοχές της Μέσης Ανατολής, της Κεντρικής Ασίας, της Ινδίας, της Νοτιανατολικής Ασίας και της υποσαχάριας Αφρικής, με μεγάλο ποσοστό εμφάνισης στην Κύπρο (ποσοστό 14% του πληθυσμού της), στην Σαρδηνία (με ποσοστό 10,3% του πληθυσμού της) και στην Νότια

Ασία. Συναντάται επίσης στις περιοχές της Βόρειας Ευρώπης και Αμερικής, αν και σε λιγότερο ποσοστό (Galanello, 2010). Τα μεγάλα αυτά ποσοστά εμφάνισης της β-θαλασσαιμίας στις περιοχές αυτές σχετίζονται με την ταυτόχρονη παρουσία του πλασμώδιου της μαλάριας (*Plasmodium falciparum malariae*). Ουσιαστικά αποτελεί μια φυσική προστασία των λαών που ζουν σε υγρά κλίματα από το πλασμώδιο (*Plasmodium*) της ελονοσίας, όπως δηλώνει και η ετυμολογία της λέξης «έλος και νόσος» εφόσον το φυσικό του περιβάλλον ανάπτυξης είναι περιοχές ιδιαίτερα γύρω από ελώδη μέρη (Clegg, 1999).

Η μαλάρια ονομάζεται διεθνώς *malariae* από τις ιταλικές λέξεις *mal* + *aria* που σημαίνει κακός αέρας, επειδή πίστευαν οι άνθρωποι ότι οφείλονταν στην κακής ποιότητας αέρα, σε «κακό, δύσσομο αέρα» που επικρατεί σε ελώδεις περιοχές οι οποίες μυρίζουν (Μπαμπινιώτης, 2002). Μεταδίδεται στον άνθρωπο (δευτερεύων ξενιστής) από το μολυσμένο σάλιο του θηλυκού κουνουπιού του γένους *Anopheles* (Ανοφελές) που αποτελεί και τον πρωτεύων ξενιστή (WHO, 2021). Μέσω της κυκλοφορίας φτάνουν στο ήπαρ όπου ωριμάζουν και αναπαράγονται και κατόπιν προσβάλλουν τα ερυθρά αιμοσφαίρια. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια που φέρουν τη μετάλλαξη δεν ευνοούν τον πολλαπλασιασμό του πρωτόζωου. Συγκεκριμένα έχει παρατηρηθεί ότι άτομα που φέρουν γονιδιακές μεταλλάξεις που σχετίζονται με την μορφολογία και αντιγονικότητα των ερυθρών αιμοσφαιρίων οι οποίες είναι:

- η θαλασσαιμία (α, β)
- η δρεπανοκυτταρική αναιμία (ή αιμοσφαιρινοπάθεια S)
- οι αιμοσφαιρινοπάθειες C και E
- η ανεπάρκεια του ενζύμου γλυκόζη 6-φωσφορικής δεϋδρογονάσης (G6PD)
- η απουσία των Duffy αντιγόνων

οδηγούν σε μη λειτουργικά μόρια αιμοσφαιρίνης. Έτσι με έμμεσο τρόπο διακόπτεται ο κύκλος ζωής του πλασμωδίου. Στη δρεπανοκυτταρική αναιμία για παράδειγμα η απόκλιση από το φυσιολογικό σχήμα του ερυθρού αιμοσφαιρίου μειώνει το προσδόκιμο όριο ζωής του, κάτι που επιβαρύνεται και από την μόλυνσή του από το παράσιτο (Kwiatkowski, 2005), (Hedrick, 2011), (Weatherall, 2008). Σε γενικές γραμμές θα μπορούσαμε να αναφέρουμε ότι περίπου 300.000 νέοι άνθρωποι γεννιούνται κάθε χρόνο παγκοσμίως με τις γονιδιακές διαταραχές που χαρακτηρίζονται στην β-θαλασσαιμία και δρεπανοκυτταρική αναιμία (Weatherall, 2010).

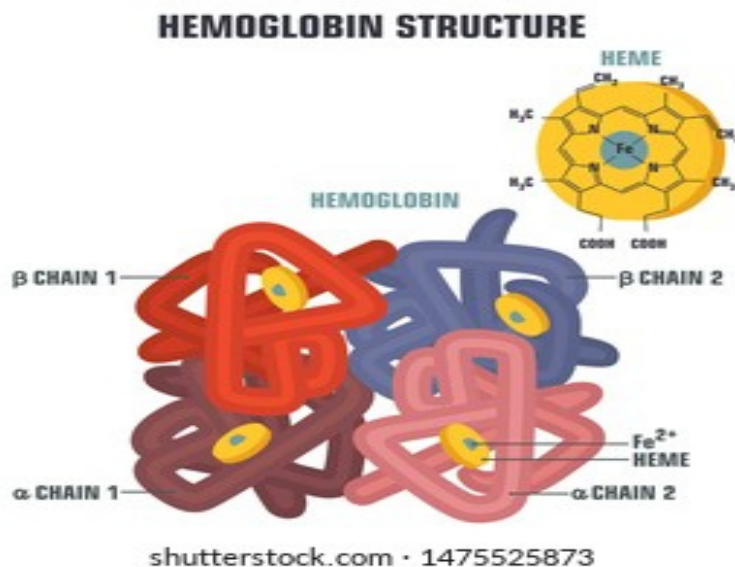
Εντούτοις, τα τελευταία χρόνια, έχει αρχίσει να εμφανίζεται και σε μη κατεχοχίν ενδημικές περιοχές λόγω των μεγάλων πληθυσμιακών μετακινήσεων, όπως μεταναστευτικά κύματα λαών εξαιτίας πολεμικών συρράξεων (Colaḥ, 2010). Σύμφωνα με τα δεδομένα των Ηνωμένων Εθνών το 2017 καταγράφηκε μια μετακίνηση 25,4 εκατομμύρια προσφύγων σε παγκόσμιο επίπεδο. Η μετακίνηση αυτή των προσφυγικών ροών σημειώθηκε και από περιοχές όπου ενδημεί η β-θαλασσαιμία (όπως είναι η Συρία, το Αφγανιστάν, το Μιανμάρ) και φιλοξενήθηκαν από χώρες όπως η Γερμανία, η Ελλάδα, η Ιταλία, η Τουρκία, ο Λίβανος, το Ιράν και το Πακιστάν (UNHCR, 2018).

### **Παθοφυσιολογία μορίου αιμοσφαιρίνης**

Το μόριο της αιμοσφαιρίνης που είναι μια σφαιρική πρωτεΐνη του αίματος αποτελείται από την αίμη και την σφαιρίνη. Τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες σφαιρίνης ανά δύο όμοιες ενώνονται η κάθε μία αντίστοιχα με τέσσερα μόρια αίμης στα ριβοσωμάτια του ενδοπλασματικού δικτύου με κύρια την χαρακτηριστική ικανότητά της να συνδέεται χαλαρά και αμφίδρομα με το μόριο του οξυγόνου. Σε αυτή την ικανότητά της στηρίζεται ο λειτουργικός της ρόλος στο φαινόμενο της αναπνοής. Συνδέεται με το οξυγόνο στους πνεύμονες όπου η μερική πίεση του οξυγόνου στους πνεύμονες είναι  $P_{aO_2}=110\text{mmHg}$  έως  $P_{aO_2}=90\text{mmHg}$  στις κυψελίδες και το απελευθερώνει στα ιστικά τριχοειδή εξαιτίας της σημαντικά χαμηλής πίεσης του ( $P_{aO_2}=40\text{mmHg}$  στα αρτηρίδια) (Guyton, 1990). Το κάθε μόριο αίμης περιέχει ένα άτομο σιδήρου. Άρα σε κάθε μόριο αιμοσφαιρίνης συναντάμε τέσσερα άτομα σιδήρου, τα οποία παρουσιάζουν μεγαλύτερη ικανότητα σύνδεσης με το οξυγόνο και λιγότερη με το διοξείδιο του άνθρακα. Επίσης το μόριο της αίμης μπορεί να συνδεθεί και με άλλα αέρια μόρια όπως νιτρικά ιόντα ( $NO^2^-$ ), μονοξείδιο του αζώτου (NO), μονοξείδιο του θείου (SO), μονοξείδιο του άνθρακα (CO) επηρεάζοντας την σύνδεση με το μόριο του οξυγόνου. Συγκεκριμένα η δεσμευτική ικανότητα του μονοξειδίου του οξυγόνου (CO) είναι 240 φορές ισχυρότερη σε σχέση με το οξυγόνο ( $O_2$ ). Επομένως μια συγκέντρωση 0,1% σε CO στον αέρα θα οδηγήσει σε καταστάσεις λιποθυμικές μέχρι και θανατηφόρες για το άτομο που τον εισπνεύσει (Ahmed, 2020).

Αποτελείται φυσιολογικά από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, δύο α και δύο β συνταγμένες σε ένα τετραμερές μόριο. Ανάλογα ποια από τις αλυσίδες είναι η παθολογική (μειωμένη παραγωγή της) διακρίνουμε την α-θαλασσαιμία όπου παράγεται σε μειωμένη ποσότητα η α-σφαιρίνη και την β-θαλασσαιμία όπου παράγεται σε

μειωμένη ποσότητα η β-σφαιρίνη. Όπως θα αναφερθεί και διεξοδικότερα παρακάτω, έχει βρεθεί ότι η έκφραση της α-σφαιρίνης κωδικοποιείται από δυο πολύ στενά συνδεδεμένα γονίδια που εντοπίζονται στο χρωμόσωμα 16, ενώ η β-σφαιρίνη κωδικοποιείται από ένα μοναδικό γονίδιο, που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11. Εξαιτίας της συνάντησης των αυτοσωμικών χρωμοσώματα ανά ζεύγη, η α-σφαιρίνη κωδικοποιείται από τέσσερα αλληλόμορφα γονίδια και η β-σφαιρίνη από δυο αλληλόμορφα γονίδια. Με βάση τους νόμους του Mendel (Gregor Johann Mendel, 1822-1884) για τα κληρονομούμενα αυτοσωμικά υπολειπόμενα γονίδια διακρίνουμε τις κάτωθι περιπτώσεις. Επίσης υπάρχουν και οι «παραλλαγές της αιμοσφαιρίνης» (hemoglobin variants) όπου αποτελούν ποιοτικές διαταραχές εξαιτίας των οποίων μεταβάλλεται η πρωτοταγής δομή των αλυσίδων της σφαιρίνης (α ή β).



Εικόνα 2. Δομή του μορίου της αιμοσφαιρίνης.

### Α-Θαλασσαιμία

Στην α-θαλασσαιμία τα 2 γονίδια του χρωμοσώματος 16 που κωδικοποιούνται για την έκφραση της α-αλυσίδας είναι τα HBA1 και HBA2. Το γεγονός ότι η έκφραση των α-αλυσίδων κωδικοποιείται από 2 αλληλόμορφα γονίδια και ότι το HBA2 (A2) εκφράζεται εντονότερα από το HBA1 (A1) κάνει πιο περίπλοκο το γεγονός του φαινότυπου. Το έλλειμμα των α-αλυσίδων καλύπτεται από την περίσσεια των β-αλυσίδων στους

ενήλικες και των γ-αλυσίδων στα νεογνά. Ανάλογα με το πού εντοπίζεται η μετάλλαξη διακρίνουμε τις ακόλουθες μορφές:

- A-Μεσογειακή Αναιμία<sup>1</sup> ή «αθόρυβη-silent», όπου υπάρχει μετάλλαξη στο ένα από τα τέσσερα α γονίδια
- A-Μεσογειακή Αναιμία 2 ή «triat», όπου υπάρχει μετάλλαξη σε δυο από τα τέσσερα α γονίδια και διακρίνεται σε ετερόζυγη και ομόζυγη ανάλογα με το αν υπάρχει μετάλλαξη σε διαφορετικό αλληλόμορφο ή και στα δυο αλληλόμορφα γονίδια.
- Αιμοσφαιρινοπάθεια H(Hb H), όπου υπάρχει μετάλλαξη σε τρία από τα τέσσερα α γονίδια. Το παθολογικό αυτό τετραμερές ενώ παρουσιάζει υψηλή απορροφητικότητα οξυγόνου είναι εντούτοις εξαιρετικά ασταθές με συνέπεια να εμφανίζονται εντός του ώριμου ερυθρού αιμοσφαιρίου τα Σωματία- έγκλειστα Heinz (δηλαδή μικρά, ακανόνιστα σωματίδια μετουσιωμένης αιμοσφαιρίνης) και να το οδηγεί σε πρόωρη αιμόλυση.
- Εμβρυϊκός ύδρωπας (Hb Bart's), όπου υπάρχει μετάλλαξη και στα τέσσερα α γονίδια. Αποτελεί μη συμβατή μορφή μετάλλαξης και οδηγεί σε θάνατο το νεογνό αμέσως μετά τη γέννηση από τη στιγμή που έχουμε μειωμένη παραγωγή της α-αλυσίδας της αιμοσφαιρίνης (Farashi, 2018).

Συμβολικά απεικονίζεται ως:

- A<sup>0</sup> το γονίδιο όπου εκδηλώνει αδυναμία σύνθεσης α-αλυσίδων γιατί παρατηρείται η έλλειψή του
- A<sup>+</sup> το γονίδιο όπου επιτρέπει σύνθεση α-αλυσίδων

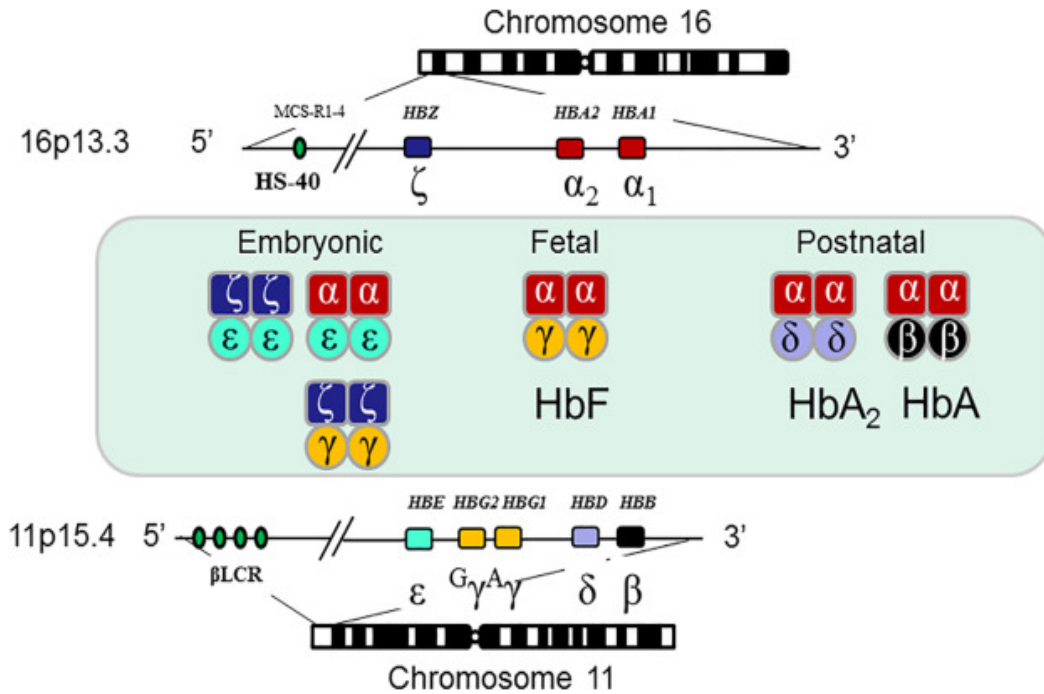
Οπότε για τους παραπάνω φαινότυπους διακρίνω τους κάτωθι γονότυπους αντίστοιχα:

- -α/α: Α-μεσογειακή αναιμία, ετερόζυγη
- --/α: όταν η έλλειψη έχει συμβεί και στα δύο γονίδια του ίδιου χρωμοσώματος
- -α/-α: όταν η έλλειψη έχει συμβεί σε δύο γονίδια διαφορετικών χρωμοσωμάτων
- --/-α: όταν η έλλειψη έχει συμβεί σε τρία γονίδια
- --/--: όταν η έλλειψη αφορά το σύνολο των αλληλόμορφων γονιδίων

Από τα παραπάνω εύκολα εξάγεται το συμπέρασμα ότι η κλινική εικόνα του ασθενούς ποικίλει ανάλογα με τους συνδυασμούς των γονιδίων που θα συμβούν και κυμαίνεται από τελείως ασυμπτωματική μέχρι πολύ σοβαρές και ασύμβατες



καταστάσεις με την ίδια τη ζωή. Γενικά η κλινική εικόνα θα καθοριστεί από το ποσό των α-αλυσίδων που θα ενωθούν με τις φυσιολογικά παραγόμενες β-αλυσίδες για να σχηματίσουν την HbA, (2α,2β) (Λουκόπουλος, 2015).



**Εικόνα 3.** Σχηματική απεικόνιση της τοποθέτησης των γονιδίων για την έκφραση της α και β σφαιρίνης στα χρωμοσώματα 16 και 11 αντίστοιχα. Η εμβρυϊκή και νεογνική αιμοσφαιρίνη απεικονίζονται μέσα στο πλαίσιο. Επίσης παρατηρούμε από αριστερά προς τα δεξιά την εξέλιξη της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης: Hb Gower-1 ( $\zeta_2\varepsilon_2$ ), Hb Gower-2 ( $\alpha_2\varepsilon_2$ ) και Hb Gower-3 ( $\zeta_2\gamma_2$ ). Οι αιμοσφαιρίνες HbF, HbA<sub>2</sub> και HbA παραμένουν ενεργές και μετά την γέννηση του ατόμου.

### Β-Θαλασσαιμία

Στην β-θαλασσαιμία το γονίδιο HBB (του χρωμοσώματος 11) που κωδικοποιεί την έκφραση της β-αλυσίδας παρουσιάζει μια γενετική βλάβη, την απώλεια του γονιδίου ή τη μετάλλαξη του. Ως συνέπεια αυτής είναι η υπολειτουργία ή η πλήρης αναστολή του που εξαρτάται από το αν η βλάβη αφορά το ένα ή και τα δύο αλληλόμορφα (ομόζυγη β θαλασσαιμία ή νόσος του Cooley). Ο οργανισμός προκειμένου να καλύψει το κενό των β-αλυσίδων που συμμετέχουν στην παραγωγή της για να ανταπεξέλθει στις ανάγκες μεταφοράς οξυγόνου σχηματίζει τετραμερή των α-αλυσίδων με τις σφαιρίνες δ ή γ, σχηματίζοντας τις αιμοσφαιρίνες:

- HbA2 που αποτελείται από 2α και 2δ αλυσίδες και αποτελεί υπό κανονικές συνθήκες το 2% - 3% της συνολικής αιμοσφαιρίνης HbA.
- HbF (fetal= εμβρυϊκός) που αποτελείται από 2α και 2γ αλυσίδες.

Συμβολικά απεικονίζεται ως:

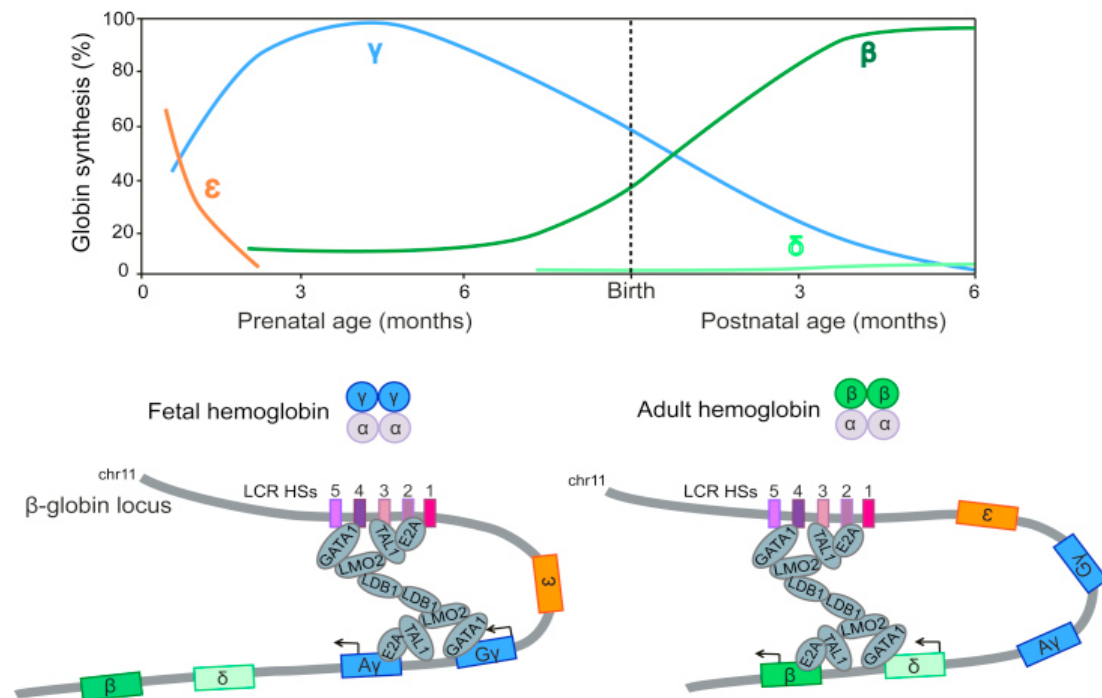
- B<sup>0</sup> το γονίδιο που εκδηλώνει αδυναμία σύνθεσης β αλυσίδων
- B<sup>+</sup> το γονίδιο που επιτρέπει μερική σύνθεση β αλυσίδων (Thein, 2018).



**Εικόνα 4.** Σχηματική απεικόνιση των νόμων του Mendel σε κληρονομούμενη αυτοσωμική υπολειπόμενη έκφραση γονιδίου όπως είναι η μεσογειακή αναιμία. Στην πρώτη περίπτωση όπου ο ένας γονέας είναι φορέας υπάρχει 50% πιθανότητα να γεννηθεί παιδί φορέας, ενώ όταν και οι δυο γονείς είναι φορείς έχουν πιθανότητα να αποκτήσουν παιδί ομόζυγο ως προς το μεταλλαγμένο γονίδιο 25%, 25% παιδί χωρίς μετάλλαξη και 50% παιδί φορέα.

Η β θαλασσαιμία χαρακτηρίζεται από περίπου 200 διαφορετικές μεταλλάξεις που λαμβάνουν χώρα στην περιοχή-ομάδες (clusters) η οποία ελέγχει την έκφραση του γονιδίου της β-σφαιρίνης. Ως συνέπεια έχουν την μείωση ή ακύρωση της παραγωγής της β-σφαιρίνης (β<sup>+</sup> και β<sup>0</sup> γονότυποι αντίστοιχα). Οποιαδήποτε μείωση στην παραγωγή των αλυσίδων οδηγεί αυτόματα και στη διαταραχή του λόγου του α/β. Έτσι συσσωρεύονται οι αλυσίδες που δεν έχουν συζευχθεί κατά την ανάπτυξη του ερυθροκυττάρου για να σχηματίσουν το τετραμερές μόριο της αιμοσφαιρίνης και προκαλούν καθίζηση μέσα στο μόριό του με τελική συνέπεια την καταστροφή του. Για παράδειγμα στην περίπτωση της β-θαλασσαιμίας οι β-αλυσίδες δεν παράγονται σε επαρκείς ποσότητες οπότε και έχουμε συσσώρευση α-αλυσίδων. Η παραγωγή παθολογικών ερυθρών αιμοσφαιρίων, δηλαδή η παραγωγή ερυθρών με διαταραγμένη την αναλογία των α και β σφαιρινών στο μόριό τους, στο μυελό των οστών χαρακτηρίζεται ως μη αποτελεσματική ερυθροποίηση. Η υπερπαραγωγή της α-σφαιρίνης οδηγεί σε αναποτελεσματική ερυθροποίηση, ενδομυελική απόπτωση των

πρόδρομων ερυθρών σειρών και αιμολυτική αναιμία. Ασθενείς με β-θαλασσαιμία (μεσαίου και μικρού βαθμού) μπορούν να ζήσουν χωρίς τακτική μετάγγιση αίματος. Αντίθετα, ασθενείς με μεγάλου βαθμού β-θαλασσαιμίας εξαρτώνται από τις μεταγγίσεις αίματος ενώ συγχρόνως πάσχουν από σοβαρή αναιμία, χρόνια αιμόλυση, υπερφόρτωση σιδήρου, ηπατοσπληνομεγαλία και επιπλοκές από δυσλειτουργία του καρδιακού και ενδοκρινικού συστήματος. Το προσδόκιμο επιβίωσης είναι συνυφασμένο με το επίπεδο της επαρκούς υποστηρικτικής φροντίδας (Cavazzana, 2017).



**Εικόνα 5.** Η εξέλιξη της ανθρώπινης β-σφαιρίνης κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του ανθρώπου από την εμβρυική φάση έως την ενηλικίωση του.

Όπως φαίνεται στο παραπάνω σχήμα η εξέλιξη της β-σφαιρίνης περιλαμβάνει τις εξής φάσεις: Η ε-σφαιρίνη εμφανίζεται τους πρώτους μήνες της εμβρυϊκής ζωής και αντικαθίσταται από την γ-σφαιρίνη πριν την γέννα. Όταν πλησιάζουν οι 9 μήνες η γ-σφαιρίνη αντικαθίσταται από την β-σφαιρίνη και η οποία είναι η κυρίαρχη σφαιρίνη σε όλη την ενήλικη ζωή. Στους ενήλικες το γονίδιο της δ-σφαιρίνης εκφράζεται ελάχιστα. Ουσιαστικά οι περιοχές σύνδεσης (στο χρωμόσωμα 11) του πενταμερούς συμπλόκου LCR HSs (LCR: locus control region που περιέχει ενισχυτικά στοιχεία του DNA, τις HSs

δηλαδή τις DNase hypersensitive sites απαραίτητες για υψηλού βαθμού έκφρασης του γονιδίου της β σφαιρίνης) με αντίστοιχες περιοχές (Aγ-Gγ/ β-δ) καθορίζει την έκφραση της νεογνικής ή ενήλικης ερυθροβλάστης αντίστοιχα. Η τοποθέτηση της LCR αγκύλης στη β σφαιρίνη προάγει διαφορετικά δυναμικά αναπτυξιακά στοιχεία που έρχονται σε αντιπαράθεση μεταξύ τους γιατί καθορίζουν την έκφραση της εμβρυικής γ και ενήλικης β σφαιρίνης αντίστοιχα. Τα πενταμερή σύμπλοκα (περιλαμβανομένων των GATA1, TAL1, E2A, LM02 και LDB1) φαίνεται να διαδραματίζουν μεσολαβητικό ρόλο στο σχηματισμό της αγκύλης, μεταξύ της περιοχής της LCR και των προαγωγών της σφαιρίνης και κατ' επέκταση στην έκφραση του γονιδίου της β σφαιρίνης (Cavazzana, 2017).

### **Δρεπανοκυτταρική αναιμία**

Η δρεπανοκυτταρική αναιμία είναι μια από τις πιο κοινές διαταραχές του αίματος από την οποία πάσχουν περίπου 100.000 Αμερικανοί σύμφωνα με μελέτη του 2008 (Hassell, 2010) και περίπου 300.000 μωρά γεννιούνται κάθε χρόνο σε όλο τον κόσμο (Odam, 2014). Η SCD (sickle cell disease) προκαλείται από μια σημειακή μετάλλαξη στο 6<sup>ο</sup> αμινοξύ στο γονίδιο της β-σφαιρίνης, (στο 11<sup>ο</sup> χρωμόσωμα) όπου το νουκλεοτίδιο GAG αλλάζει σε GTG, δηλαδή η αδενίνη αντικαθίσταται από θυμίνη και άρα το τελικό προϊόν που θα ήταν το υδρόφιλο γλουταμινικό οξύ αντικαθίσταται από την υδρόφοβη βαλίνη (Ingram, 1957). Έτσι προκύπτει η αιμοσφαιρίνη S (HbS), που αποκαλύπτει το δομικό της πρόβλημα σε όξινες καταστάσεις ή σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου όπου πολυμερίζεται η τεταρτοταγής δομή της με συνέπεια την αλλαγή του σχήματος των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Σε γενικές γραμμές θα μπορούσαμε να αναφέρουμε ότι επηρεάζεται από τη θερμοκρασία, το PH, το μονοξείδιο του άνθρακα και τα επίπεδα της 2,3-DPG (Eaton, 1987). Από δισκοειδή μορφή που έχει το φυσιολογικό ερυθρό κύτταρο εμφανίζει μια ανελαστική σε σχήμα δρεπάνου με ό,τι αυτό συνεπάγεται στην αλλαγή της ελαστικότητάς τους. Γίνονται δύσκαμπτα και άρα οδηγούνται σε καταστροφή τους. Ουσιαστικά πρόκειται για μια ασθένεια που αποκαλύπτει το πρόσωπό της σε καταστάσεις υποξίας, όπου τα δρεπανοειδή κύτταρα παγιδεύονται κατά τη δίοδο τους στα μικρά αγγεία με συνέπεια την εκδήλωση έντονων πόνων στο άτομο (Platt, 1991). Η καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων και η αιμόλυσή τους, η καταστροφή των οργάνων και τελικά η μείωση του προσδόκιμου επιβίωσης είναι καταστάσεις που αντιμετωπίζουν οι ασθενείς αυτοί (Platt, 1994). Τελικά διαπιστώνουμε ότι αν και έχει

μελετηθεί αρκετά καλά, περίπου περισσότερο από 60 χρονιά και είναι γνωστή η φύση της γενετικής της βλάβης, ήδη από το 1957 από τον Ingram, ελάχιστα έχει προσφέρει η επιστήμη στους ασθενείς αυτούς.

### **Κλινική εικόνα**

Οι μεταλλάξεις μπορούν να συμβούν σε οποιαδήποτε φάση της αντιγραφής του γενετικού υλικού και η κλινική εικόνα του ασθενούς είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τον κληρονομούμενο γονότυπο. Όπως είναι αναμενόμενο οι φορείς (ετεροζυγωτές) είναι κλινικά υγιείς, χωρίς να μειονεκτούν σε σύγκριση των «υγείων – φυσιολογικών» ατόμων που δεν φέρουν την μετάλλαξη στο γονίδιό τους. Αντισταθμιστικοί παράγοντες όπως η αύξηση του ερυθροκυτταρικού 2,3 BPG (2,3 διφωσφο – γλυκερινικό οξύ), διευκολύνει την αποδέσμευση του οξυγόνου από το ερυθρό κύτταρο και την κανονική οξυγόνωση των ιστών. Ασθενείς με β ομόζυγη θαλασσαιμία (thalassemia major) παρουσιάζουν σοβαρή αναιμία και ηπατοσπληνομεγαλία. Από την έναρξη της παιδικής τους ηλικίας, από τα 2 έτη, είναι υποχρεωμένοι να παρακολουθούνται από επαγγελματίες υγείας για την χορήγηση θεραπείας, ειδάλως το προσδόκιμο επιβίωσής τους παραμένει χαμηλό. Οι συχνές μεταγγίσεις αίματος και η αποσιδήρωσή τους μέσω χηλικών παραγόντων αποβλέπουν στην όσο το δυνατόν περισσότερο φυσιολογική ανάπτυξή τους. Στον αντίποδα ασθενείς με μέτριου βαθμού θαλασσαιμία (thalassemia intermedia) παρουσιάζουν χαμηλότερου βαθμού αναιμία και ως εκ τούτου δεν απαιτείται συχνά να υποβάλλονται σε μεταγγίσεις αίματος. Συνήθως βρίσκονται σε κίνδυνο λόγω υπερφόρτωσης από σίδηρο εξαιτίας της αυξημένης εντερικής απορρόφησης του σιδήρου ως συνέπεια της αναποτελεσματικής ερυθροποίησης. Η μελέτη των ερυθρών αιμοσφαιρίων (ερυθροκυτταρικοί δείκτες και πλακάκι) αποκαλύπτει μικροκυτταρική υποχρωμία με άωρες μορφές ερυθρών (εμπύρηννα) στο περιφερικό αίμα, ενώ από την ανάλυση της αιμοσφαιρίνης με ηλεκτροφόρηση αποκαλύπτεται ότι ο οργανισμός προσπαθεί να καλύψει το κενό της ποσότητας της HbA με διατήρηση και αύξηση της παραγωγής της HbF και μετά τους 12 μήνες ζωής του νεογέννητου (Origa, 2021).

Ουσιαστικά ασθενείς με ετερόζυγη μορφή θαλασσαιμίας είναι ευαισθητοποιημένοι ως προς το γεγονός της μειωμένης ποσότητας σιδήρου η οποία μεταφέρεται από τα τροποποιημένα μορφολογικά μόρια της αιμοσφαιρίνης τους και κατ' επέκταση της ποσότητας του οξυγόνου που αποδεσμεύεται στους ιστούς τους. Έτσι

προσαρμόζουν τις δραστηριότητές τους στο γεγονός αυτό – για παράδειγμα δεν θα γίνουν αθλητές δρομείς ή ορειβάτες – και συνεπώς γνωρίζουν τους νόμους της κληρονομικότητας που διέπουν το νόσημα τους.

Στους ομόζυγους ασθενείς η κλινική εικόνα εξαρτάται όχι μόνο από το βαθμό της αναιμίας (μειωμένοι ερυθροκυτταρικοί δείκτες όπως οι MCV, MCH) αλλά και από την περίσσεια των α-αλυσίδων (για τους ασθενείς με ομόζυγη β αναιμία) που δεν έχουν συνδεθεί με τις β-αλυσίδες για το σχηματισμό των τετραμερών της αιμοσφαιρίνης με συνέπεια αυτές να δρουν ως επιβλαβείς για την ίδια τη ζωή του ερυθρού όπως τα σωματία Heinz. Αυτές κατακρημνίζονται μέσα στο ερυθρό επηρεάζοντας τη σωστή λειτουργία του ερυθρού που είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την μορφολογική του ακεραιότητα. Η αύξηση του ρυθμού κυστιδοποίησης προκαλεί την τροποποίηση του λόγου επιφανείας/όγκου του ερυθρού και ακολούθως επιφέρει διαταραχές στην πλαστικότητα του, δηλαδή στην ελαστική του παραμορφωτική ικανότητα. Αυτά τα αλληλένδετα γεγονότα με τη σειρά τους προκαλούν την αυξημένη συγκράτησή του κατά την διόδό του από το σπλήνα και το ήπαρ με άμεση συνέπεια την καταστροφή του. Η σπληνομεγαλία, η ηπατομεγαλία και η εξωαγγειακή αιμόλυση που έχει ως συνέπεια την αύξηση του βιοχημικού δείκτη της έμμεσης χολερυθρίνης με επέκταση της επιβάρυνσης της καρδιακής κυκλοφορίας και άρα της καρδιακής λειτουργίας, είναι χαρακτηριστικά φαινόμενα σε άτομα με ομόζυγο γονότυπο. Η σπηνεκτομή αν και μπορεί να θεωρηθεί ως λύση ανάγκης, αφού θα αποσυμφορήσει την κυκλοφορία του αίματος από το φιλτράρισμα τους από τα κατεστραμμένα ερυθρά, εντούτοις θα έχει αρνητικό αντίκτυπο στην μειωμένη άμυνα του οργανισμού αφού μέρος του αμυντικού ΔΕΣ με τα ιστικά μακροφάγα των σπληνικών κόλπων θα αφαιρεθούν καθιστώντας το άτομο επιρρεπές σε λοιμώξεις. Επίσης η αύξηση της χολερυθρίνης που εκκρίνεται στη χολή είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία χολολίθων με τα όποια προβλήματα αυτό συνεπάγεται.

Επιπλέον στην προσπάθεια του οργανισμού να ανταπεξέλθει στο έλλειμμα των φυσιολογικών ερυθρών κυττάρων παρατηρείται μια υπερπλασία του ερυθροποιητικού μυελού – που δυστυχώς είναι και μη αποδοτική – για αύξηση της ερυθροποίησης που οδηγεί σε οστικές παραμορφώσεις των πλατεών οστών με εμφανή αυτά του προσώπου. (χαρακτηριστικό μογγολοειδές προσώπείο). Η ανάπτυξη ερυθροποιητικού ιστού εκτός των ορίων των οστών μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές αναπηρίες όταν αναπτυχθεί για παράδειγμα στο σπονδυλικό σωλήνα ή στα σπονδυλικά τμήματα όπου εφαρμόζονται

πιεστικές δυνάμεις πάνω στον νωτιαίο μυελό ή στις εξερχόμενες ρίζες των νεύρων (Λουκόπουλος, 2015).

### **Θεραπευτικές προσεγγίσεις στη μεσογειακή αναιμία**

#### **Ο ρόλος των μεταγγίσεων και συνέπειές τους**

Η αξία των μεταγγίσεων ως θεραπευτική προσέγγιση των ασθενών αυτών εμφανίζεται αναγκαία και ως ενδιάμεση «εύκολη λύση» πριν την μεταμόσχευση του μυελού, χωρίς όμως να είναι ελεύθερες επιπλοκών και αιτία επιπρόσθετων προβλημάτων. Το προσδόκιμο επιβίωσης των ατόμων αυτών είναι πολύ μικρό χωρίς την κατάλληλη θεραπεία και ιδιαίτερα χωρίς τις μεταγγίσεις αίματος, με συνέπεια να φτάνουν μέχρι την ηλικία των 7 ετών λόγω της ανεπαρκούς ερυθροποίησης. Η συχνότητα των μεταγγίσεων στην οποία υποβάλλονται εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως η ηλικία, το σωματικό βάρος, το μέγεθος της σπλήνας στην καταστροφή των ερυθρών κυττάρων κλπ. Συνήθως χορηγούνται στους ασθενείς αυτούς ανάλογα με το βαθμό πάθησης στον οποίο ανήκουν μία έως τρεις μονάδες συμπυκνωμένων ερυθρών (ο ένας ασκός ΣΕ περιέχει 200 mg σιδήρου) σε διάστημα από μία έως τέσσερις εβδομάδες (Κοίπαγου, και συν., 2014). Σε γενικές γραμμές αυτός ο ρυθμός μετάγγισης ερμηνεύεται σε πρόσληψη 15-20mg σιδήρου την ημέρα, όταν η συνιστώμενη καθημερινή πρόσληψη σιδήρου αντιστοιχεί σε 6mg/ημέρα. Σε περιπτώσεις όπου θεραπείες αποσιδήρωσης δεν εφαρμόζονται στους παραπάνω ασθενείς το προσδόκιμο επιβίωσης είναι τα 20 έτη κυρίως λόγω της συσσώρευσης σιδήρου σε ζωτικά όργανα, ιδίως στον καρδιακό ιστό, στο συκώτι, στη σπλήνα, στο πάγκρεας και σε άλλα ενδοκρινικά όργανα αλλά και της τοξικής δράσης που προκαλούν σε αυτά. Χωρίς την εφαρμογή κάποιου πρωτοκόλλου αγωγής χηλικών παραγόντων οι συγκεκριμένοι ασθενείς δύσκολα θα ξεπεράσουν τα 50 έτη ζωής (Zurlo, 1989), (Borgna-Pignatti, 2006).

Η πρόσληψη μεγάλων ποσοτήτων σιδήρου στα άτομα αυτά οδηγεί σε υπερφόρτωση σιδήρου του οργανισμού τους εξαιτίας των συχνών μεταγγίσεων προκαλώντας πολλές φορές θανατηφόρες συνέπειες. Η καρδιακή βλάβη από τη συσσώρευση ποσοτήτων σιδήρου στο μυοκάρδιο είναι μία από τις σημαντικές παρενέργειες της θεραπείας αυτής. Η χορήγηση χηλικών παραγόντων, φαρμακευτικών δηλαδή ουσιών που έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν μεταλλικά ιόντα όπως αυτά του σιδήρου και να δημιουργούν αδρανή σύμπλοκα, δεν έχει απόλυτη επιτυχία. Η θεραπεία

με υποδόρια χορήγηση της ουσίας deferoxamine (DFO) δεν είχε τα αναμενόμενα αποτελέσματα αφού το 50% των ασθενών ηλικίας άνω των 35 ετών απεβίωσε. Η δια του στόματος χορήγηση των χηλικών παραγόντων deferiprone και deferasirox φαίνεται να οδηγεί σε καλύτερη απόκριση όσον αφορά τη μείωση των επιπέδων σιδήρου στον καρδιακό ιστό αλλά απαιτεί περαιτέρω έρευνα (Cianciulli, 2008).

Σε παρόμοια συμπεράσματα καταλήγουν και άλλες μελέτες όπου η δια του στόματος χορήγηση σε καθημερινή βάση της κλασσικής χηλικής ουσίας deferoxamine (Desferal) λόγω της χαμηλής απορρόφησης από το στομάχι θα πρέπει να αντικατασταθεί από την ενδοφλέβια ή υποδόρια χορήγηση, που σε καθημερινή βάση φαίνεται δυσκολόχρηστη. Εναλλακτικές μορφές σκευασμάτων όπως των deferiprone (Ferriprox) και deferasirone (Exjade) ή ο συνδυασμός τους (της υποδόριας χορήγησης deferoxamine με per os της deferiprone) φαίνεται πιο υποσχόμενες (Flaten, 2012).

Η σημασία της έγκαιρης μέτρησης των ποσοτήτων σιδήρου που συσσωρεύονται στα όργανα έχει απασχολήσει αρκετούς επιστήμονες που προσπαθούν να βρουν νέους αποτελεσματικούς τρόπους μέτρησής τους με αξιοπιστία. Για παράδειγμα η εφαρμογή της μαγνητικής τομογραφίας (MRI) κερδίζει σημαντικό ρόλο στον έγκαιρο και έγκυρο προσδιορισμό αυτού του μετάλλου στα διάφορα όργανα του σώματος του ασθενούς (Kolnagou, 2018), (Modell, 2008).

Ο Εθνικός Οργανισμός Υγείας σε ανακοίνωσή του στις 14.06.2020 με αφορμή την παγκόσμια ημέρα αιμοδοτών σημείωσε ότι η προσέλευση των αιμοδοτών και άρα η διαθεσιμότητα του αίματος από τις αρχές της πανδημίας έχει παρουσιάσει μείωση που κυμαίνεται από 25% έως 60% ανάλογα με την Νοσοκομειακή Μονάδα. Κατά συνέπεια γίνονται αντιληπτές οι τεράστιες ελλείψεις σε ασκούς που υπάρχουν, όχι μόνο για τους πολυμεταγγιζόμενους ασθενείς, αλλά και για την κάλυψη κυρίως χειρουργικών αναγκών που προκύπτουν στακαρδιολογικά και ορθοπεδικά περιστατικά άλλα και γενικά σε άλλα. Αν στα στοιχεία αυτά προστεθεί και το γεγονός ότι στην Ελλάδα πάσχουν από μεσογειακή αναιμία 2.900 άτομα (με βάση δεδομένων έρευνας του Υπουργείου Υγείας και Πρόνοιας, του έτους 1997) και κάθε χρόνο προστίθενται περίπου 10 νέα άτομα, μπορεί κανείς εύκολα να καταλάβει γιατί είναι επιτακτική η ανάγκη εύρεσης νέων μεθόδων θεραπείας πλην την μετάγγισης αίματος (ΕΟΔΥ, 2020).



Δεν αναφερόμαστε βέβαια στην μέριμνα που πρέπει να λάβει το κράτος για την κάλυψη τόσο της ψυχολογικής υποστήριξης όσο και της επαγγελματικής αποκατάστασης των ατόμων αυτών προκειμένου να ενταχθούν πλήρως στην κοινωνία.

### **Μεταμόσχευση μυελού οστών**

Από το 1957, όπου οι πρώτες κλινικές μελέτες για την μεταμόσχευση μυελού των οστών άρχισαν δειλά-δειλά να εφαρμόζονται, μέχρι πριν μερικά χρόνια (2019) το πρόβλημα της μεταμόσχευσης μυελού των οστών (αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων) παραμένει σε γενικές γραμμές το ίδιο. Σημαντικός ενδιάμεσος σταθμός στην περίοδο αυτή αποτελεί το 1992, όπου έγιναν ουσιώδεις επιστημονικές παρατηρήσεις από τη σχολή Cerrellini στη Νεάπολη της Ιταλίας. Κατά την πάροδο περίπου των 60 ετών εκατοντάδες χιλιάδες μεταμοσχεύσεις από αρχέγονα και πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα έχουν εφαρμοστεί σε ασθενείς για να θεραπευθούν κακοήθειες του αίματος ή αιματολογικές ασθένειες (π.χ. μεσογειακή αναιμία) διατηρώντας τους στη ζωή που υπό άλλες περιπτώσεις θα τους είχαν σκοτώσει. Παρόλα αυτά αποτελεί ακόμα πρόκληση για την ιατρική κοινότητα η αντιμετώπιση της απόρριψης του μοσχεύματος. Η αλλογενής μεταμόσχευση των HSCs (Hematopoietic Stem cells) προς το παρόν αποτελεί λύση επιλογής για τις β αιμοσφαιρινοπάθειες αλλά μόνο ένα μικρό ποσοστό των ασθενών αυτών μπορεί να ωφεληθεί επειδή πρέπει να πραγματοποιηθούν σε εξειδικευμένες νοσοκομειακές μονάδες. Επίσης η πλειοψηφία των υποψηφίων δεν έχει επαρκή πρόσβαση στη διεθνή τράπεζα των HSC δωρητών. Επιπροσθέτως η απουσία των HLA συμβατών δωρητών περιορίζει ακόμα περισσότερο τις πιθανές επιλογές. Η χορήγηση ισχυρών και ταυτόχρονα λιγότερο τοξικών αλλά αποτελεσματικών και ασφαλών φαρμάκων έχουν οδηγήσει σε αποδεκτά επίπεδα αποδοχής του μοσχεύματος μειώνοντας τα προβλήματα ιστοσυμβατότητας που δημιουργούνται κυρίως από το σύστημα HLA (human leukocyte antigen). Τα ανθρώπινα λευκοκυτταρικά αντιγόνα ως πρωτεΐνες που εντοπίζονται στην επιφάνεια κάθε κυττάρου βοηθούν στην διάκριση των κυττάρων ως ξένα ή μη από το ανοσοποιητικό σύστημα και άρα στην ενεργοποίηση αμυντικών μηχανισμών ή όχι. Σε γενικές γραμμές θα μπορούσαμε να αναφέρουμε ότι η έκφρασή τους εξαρτάται από γονίδια που εντοπίζονται στο 6ο χρωμόσωμα και διακρίνονται σε Αντιγόνα Ιστοσυμβατότητας Τάξης I (HLA-A, HLA-B και HLA-C) και σε Αντιγόνα Ιστοσυμβατότητας Τάξης II (HLA-DP, HLA-DQ και HLA-DR) (Simpson, 2019).

Η δυσκολία της μεταμόσχευσης αλογόνων αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (HSCT, allogeneic haematopoietic stem cell transplant) που ταιριάζουν στο σύστημα HLA φαίνεται ξεκάθαρα σε αρκετές περιπτώσεις. Η απόρριψη του μοσχεύματος, οι μετεγχειρητικές επιπλοκές και η αποβίωση του ασθενούς (20.8%) είναι περιπτώσεις που σιγματίζουν την πορεία μιας τέτοιας μεθόδου έστω και αν χαρακτηρίζεται σε σημαντικό ποσοστό ως επιτυχημένη εφόσον αρκετοί ασθενείς καταφέρνουν να ζήσουν αξιοπρεπώς αν και πάσχοντες ή απαλλαγμένοι από την ασθένεια της β μεσογειακής αναιμίας (Ullah, 2008).

Πηγή των αυτόλογων αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων CD34+ αποτελεί ο μυελός των οστών – συνήθως από το ισχίο και συγκεκριμένα από τη λαγόνια ακρολοφία με γενική αναισθησία. Όμως δεν έχει καλά αποτελέσματα εφόσον ο ίδιος ο μυελός των οστών πάσχει όσον αφορά την αιμοποιητική του ικανότητα. Άρα η αλλογενής μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων κρίνεται μονόδρομος με την προϋπόθεση να βρεθεί συμβατός δότης.

### **Γονιδιακή θεραπεία**

Στον αντίποδα της ολοένα αύξησης των αναγκών της δια βίου μετάγγισης αίματος των ασθενών συναντάμε τη γονιδιακή θεραπεία. Όπως γίνεται κατανοητό μπορεί να εξασφαλιστεί μόνο σε αναπτυγμένες χώρες τόσο για λόγους ασφαλείας όσο και για οικονομικούς λόγους. Σε αυτή χρησιμοποιούνται γενετικά τροποποιημένα αυτόλογα HSCs και όχι αλλογενή για την μεταμόσχευση. Έτσι αποφεύγεται η πιθανότητα απόρριψης του μοσχεύματος και αποφεύγεται η χρήση των ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων. Ως εκ τούτου η έγχυση των γενετικά τροποποιημένων κυττάρων και η παρακολούθηση των ασθενών μπορεί να πραγματοποιηθεί σε αρκετά νοσοκομειακά κέντρα μεταμόσχευσης (παιδιατρικά και ενηλίκων), γεγονός που διευκολύνεται και με τη συνεχώς αυξανόμενη βελτίωση στο πεδίο της ασφάλειας της γονιδιακής θεραπείας.

Η πηγή των αυτόλογων αιμοποιητικών αρχέγονων κυττάρων CD34+ και των προγεννητικών κυττάρων HSPCs παραμένει ο μυελός των οστών από περιοχές της ισχιακής ακρολοφίας υπό γενική αναισθησία. Όμως τα κύτταρα αυτά, όπως έχει ήδη τονιστεί αρκετές φορές, λόγω της ανεπαρκούς και αναποτελεσματικής ερυθροποίησης βρίσκονται σε χαμηλές και μη ικανοποιητικές συγκεντρώσεις. Γι' αυτό το λόγο θα πρέπει να υποβληθούν σε μια σειρά διαδικασιών που περιλαμβάνει την ενίσχυσή τους με

ποικίλους ενεργοποιητικούς – ενισχυτικούς παράγοντες όπως G-CSF, Mozobil, formerly AMD3100, SDF-1 (Karroni, 2015), (Yannaki, 2013).

### **Φορέας**

Προκειμένου να εισαχθούν τα φυσιολογικά γονίδια στο γενετικό υλικό του ασθενούς θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί ένας φορέας (vector). Ως φορείς επιλέγονται οι ιοί που φέρουν ως φυσική ικανότητα την ιδιότητα να εισχωρούν στο γενετικό υλικό του ξενιστή προκειμένου να πολλαπλασιαστούν και άρα να παραδώσουν το φυσιολογικό γενετικό υλικό με το οποίο έχουν «φορτωθεί» αφού πρώτα τροποποιηθούν με αφαίρεση της μολυσματικής τους ιδιότητας. Η χρήση των ιών για αποκατάσταση ασθενειών ανήκει σε μια κατηγορία θεραπειών, τις αποκαλούμενες ιογενείς θεραπείες (virotherapies). Προς αυτή την κατεύθυνση ουσιαστικά κατευθύνθηκε η επιστημονική κοινότητα από τη στιγμή που κατάφερε να αναλύσει και να κατανοήσει τη βιολογία των οργανισμών αυτών. Έτσι μετά από περίπου 40 χρόνια συσσωρευμένης γνώσης ήρθε η στιγμή να εφαρμοστούν τεχνικές για τη χρησιμοποίηση των ιών ως φορέων γενετικού υλικού για τη θεραπεία αρκετών ασθενειών οι οποίες οφείλονται σε έκφραση ελαττωματικών γονιδίων (Bulcha, 2021).

Ιστορικά θα μπορούσαμε να αναφέρουμε μια μελέτη του 1980 από τον Martin Clime. Προσπάθησε να εισαγάγει το λειτουργικό υγιές γονίδιο της β-σφαιρίνη στα αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού των οστών. Στη πρωτοποριακή αυτή μελέτη του συμμετείχαν δύο περιπτώσεις ασθενών με β-θαλασσαιμία. Αν και αυτή η πρωτοποριακή για την εποχή της θεραπεία δεν στέφθηκε με επιτυχία, αποτέλεσε την αρχή για την εννίο γονιδιακή θεραπεία. Μερικές από τις προκλήσεις που έπρεπε να αντιμετωπιστούν ήταν α) η τελειοποίηση ενός αποτελεσματικού μηχανισμού για την εισαγωγή του υγιούς γονιδίου στα κύτταρα του μυελού *in vitro*, β) η ανάπτυξη μιας μεθόδου η οποία θα πετύχαινε την μεταφορά των γενετικά τροποποιημένων κυττάρων πίσω στην κυκλοφορία του ασθενή, γ) η κατασκευή ενός γονιδιακού φορέα που θα στόχευε συγκεκριμένα κύτταρα αποδέκτες χωρίς να προκαλεί μόλυνση, δ) η παραγωγή σε ικανοποιητική ποσότητα των διορθωμένων κυττάρων ώστε να επέρχεται η «ίαση» και ε) η ολοκλήρωση της θεραπείας ώστε να μην χρειάζεται η τακτική επανάληψή της για να επιφέρει τα επιθυμητά αποτελέσματά. Μετά από μια δεκαετία ερευνών, στις αρχές της

δεκαετίας του '90, θα αρχίσουν οι κλινικές εφαρμογές της γονιδιακής θεραπείας να βρίσκουν δειλά-δειλά το δρόμο της επιτυχίας (Cline, 1985).

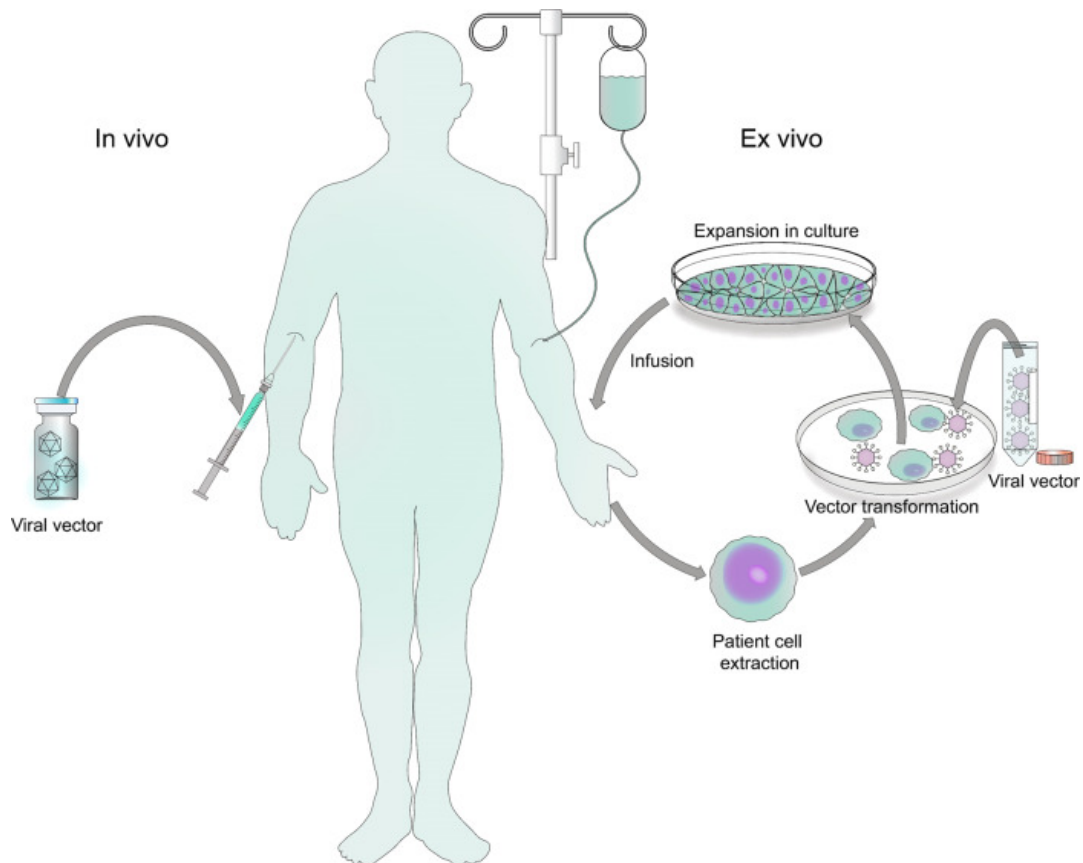
Η γονιδιακή θεραπεία μπορεί να εφαρμοστεί με δύο τρόπους ανάλογα με το αν η τροποποίηση των κυττάρων γίνεται μέσα ή έξω από το σώμα του ασθενούς:

- Με την *in vivo* (λατινική λέξη που αποδίδεται στα ελληνικά «εν ζωή», δηλαδή μέσα στο σώμα) τεχνική. Πρόκειται για άμεση μεταφορά των υγείων γονιδίων στα κύτταρα-στόχους ενός συγκεκριμένου ιστού (στα ηπατικά κύτταρα, τα μυϊκά, του δέρματος, του πνεύμονα, του σπλήνα, του εγκεφάλου και βέβαια του αίματος) μέσα στο σώμα του ανθρώπου με τη χρήση των διάφορων φορέων, χωρίς την προηγούμενη απομόνωση και καλλιέργεια των ελαττωματικών κυττάρων τους τα οποία αποτελούν έκφραση των ελαττωματικών γονιδίων.
- Με την *ex-vivo* (λατινική έκφραση που στα ελληνικά εκφράζεται ως «εκτός ζώντος οργανισμού») τεχνική. Σε αυτή τη μέθοδο λαμβάνονται αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα του ασθενούς. Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε κυτταροκαλλιέργειες. Αφού διορθωθούν με την κατάλληλη γονιδιακή τροποποίηση με το επιθυμητό διορθωμένο γονίδιο, μεταμοσχεύονται στον ασθενή με τη χρήση του κατάλληλου φορέα, προκειμένου να εκφράσουν το επιθυμητό φυσιολογικό γονίδιο. Γενικά θα μπορούσαμε να συνοψίσουμε ότι στην *ex vivo* τεχνική έχουμε την τροποποίηση των προς διόρθωση κυττάρων έξω από το σώμα του ασθενούς.

Η βασική επομένως διαφορά μεταξύ των δύο μεθόδων είναι ότι τα θεραπευτικά γονίδια μεταφέρονται σε κυτταροκαλλιέργειες *in vitro* και επανεισάγονται σε ασθενή σε γονιδιακή θεραπεία *ex vivo*. Γεγονός όχι και τόσο απλό, γιατί θα πρέπει τα κύτταρα να μπορούν να επιβιώσουν σε συνθήκες και χειρισμούς εκτός του φυσικού τους περιβάλλοντος (που είναι ο οργανισμός). Αντίθετα τα γονίδια στην *in vivo* γονιδιακή θεραπεία παραδίδονται απευθείας στους ιστούς – στόχους ή στα κύτταρα του ασθενούς, χωρίς καλλιέργεια *in vitro*, που είναι υπεύθυνα για τη θεραπεία ασθενειών οι οποίες επηρεάζουν πολλαπλά οργανικά συστήματα. Η επιτυχία βέβαια και των δύο μεθόδων εξαρτάται από τον επιτυχή μετασχηματισμό των θεραπευτικών γονιδίων στα κύτταρα - στόχους του ασθενούς (Cox, 2015).

Όπως εύστοχα αποτυπώνεται και στο παρακάτω σχήμα στην *in-vivo* γονιδιακή θεραπεία απαιτείται η άμεση μεταφορά του φορέα που φέρει το φυσιολογικό γονίδιο στον ασθενή. Στην *ex-vivo* γονιδιακή θεραπεία απαιτείται αρχικά η χρησιμοποίηση

αυτόλογων ή ετερόλογων κατάλληλων κυττάρων. Στη μεσογειακή αναιμία χρησιμοποιούνται αυτόλογα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα. Αρχικά τροποποιούνται γενετικά με την εισαγωγή ενός φορέα που φέρει το επιθυμητό φυσιολογικό γονίδιο. Ακολουθεί ο πολλαπλασιασμός τους σε κατάλληλο καλλιεργητικό υλικό και κατόπιν η έγχυσή τους πίσω στον ασθενή.



**Εικόνα 6.** In-vivo και ex-vivo γονιδιακή θεραπεία.

Συνήθως χρησιμοποιούνται δυο τύποι μεταγωγών – φορέων: οι ιογενείς και οι μη-ιογενείς. Στις μέχρι σήμερα μελέτες ως ιογενείς φορείς χρησιμοποιούνται οι ρετροϊοί, οι αδενοϊοί (adenoviruses –Ads) και οι συναφείς ιοί με τους αδενοϊούς (adeno associated viruses–AAVs). Επιπλέον υπάρχουν τέσσερις βασικές μέθοδοι προσέγγισης της γονιδιακής θεραπείας:

- Η αντικατάσταση του γονιδίου (gene replacement), όπου έχουμε την αντικατάσταση ενός ελαττωματικού γονιδίου από το φυσιολογικό-λειτουργικό.

- Η γονιδιακή σίγαση (gene silencing), όπου έχουμε την απενεργοποίηση ενός μεταλλαγμένου γονιδίου του οποίου η έκφραση είναι βλαπτική – τοξική για το ίδιο το κύτταρο.
- Η γονιδιακή προσθήκη (gene addition), όπου έχουμε υπερέκφραση ενός αυτόλογου ή ετερόλογου γονιδίου που έχουμε εισαγάγει στην κυτταρική λειτουργία.
- Η γονιδιακή επεξεργασία (gene editing), όπου έχουμε το μόνιμο χειρισμό (permanent manipulation) ενός γονιδίου στο γονιδίωμα του ασθενούς (Bulcha, 2021).

### **Στρατηγικές χρήσεις του Lentiviral Vector**

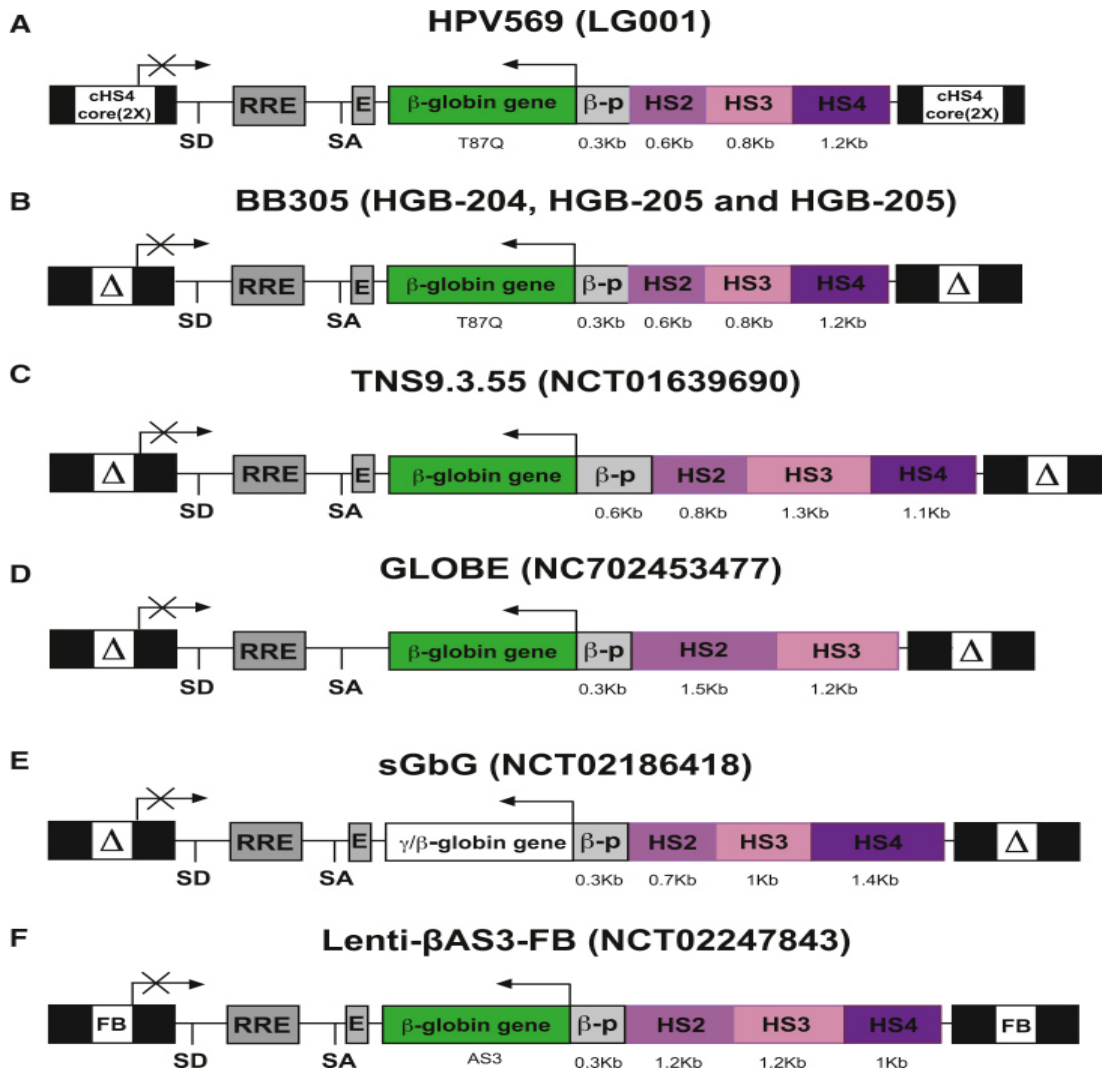
Η μέθοδος της γονιδιακής θεραπείας προϋποθέτει την επιτυχή εισαγωγή του γονιδίου της πλήρους λειτουργικής β-σφαιρίνης στο αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο, δηλαδή στην αποτελεσματική – επιτυχή εισαγωγή της κανονικής – λειτουργικής διαγονιδιακής β σφαιρίνης στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα. Η διόρθωση των β αιμοσφαιρινοπαθειών με αυτή τη μέθοδο αποτελεί το επιστέγασμα μελετών και προσπαθειών τουλάχιστον εικοσαετίας. Σε αυτό το τελικό σημείο ερευνών συνέβαλαν κυρίως δύο παράγοντες:

- η ανάπτυξη του ιού HIV-1 ως μέσο μεταφοράς (lentiviral vector-LVs) (Naldini, 1996).
- η ανακάλυψη της ικανότητας της περιοχής LCRHSs στην ενίσχυση της έκφρασης της β-σφαιρίνης στον μεταγωγέα lentiviral. Αυτή η συγκεκριμένη περιοχή που φέρει τα γονίδια για την έκφραση της β-σφαιρίνης εντοπίζεται επακριβώς στην 50kb 5' και 20kb 3' στο γονίδιο της β-σφαιρίνης (Grosveld, 1987).

Η εισαγωγή των παραγόντων-ενισχυτικών που εμπεριέχονται στην περιοχή LCR HS στον φορέα και η βελτιστοποίηση της συγκέντρωσής του έχουν δείξει ότι η χρήση του LVs ως φορέα των ανθρώπινων γονιδίων τα οποία είναι υπεύθυνα για την έκφραση των β ή γ σφαιρινών υπό τον έλεγχο των εκινητών της β-σφαιρίνης και των LCR στοιχείων μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγή του φαινοτύπου της ανθρώπινης β θαλασσαιμίας και δρεπανοκυτταρικής αναιμίας (Cavazzana, 2017).

Έκτοτε σε πολλά εργαστήρια έχουν γίνει επιτυχή πειράματα στα οποία χρησιμοποιούν το lentiviral (LVs) ως φορέα του ανθρώπινου γονιδίου της α ή β

σφαιρίνης. Αξιοποιούν τις μέχρι σήμερα γνώσεις, δηλαδή τη χρήση του εκκινητή της β-σφαιρίνης και της περιοχής LCR HS, για να θεραπεύσουν την β-θαλασσαιμία και την δρεπανοκυτταρική αναιμία (Puthenveetil, 2004), (Roselli, 2010).



**Εικόνα 7.** Σχηματικά η αναπαράσταση της έκφρασης της β-σφαιρίνης στον φορέα LVs που χρησιμοποιήθηκε στις κατά καιρούς κλινικές δοκιμές.

Όπως χαρακτηριστικά φαίνεται στην παραπάνω εικόνα το τμήμα LTRs διαγράφεται με 400bp στην περιοχή U3 του HIV (ΔLTR). Στο σχήμα απεικονίζονται τα στοιχεία που έχουν ευαισθητοποιηθεί εκ νέου (RRE), τα συναρμολογημένα τμήματα του δωρητή (splicing donor-SD), τα συναρμολογημένα τμήματα του δέκτη (splicing acceptor-

SA), τα ανθρώπινα γονίδια για την έκφραση της β-σφαιρίνης, ο εκκινητής της β-σφαιρίνης (βρ), ο ενισχυτής στο άκρο 3' της β-σφαιρίνης (E) και οι υπέρ ευαισθητοποιημένες περιοχές της Dnase-I (HS2, HS3 και HS4) από την περιοχή LCR της β-σφαιρίνης. Δύο αντίγραφα των τμημάτων cHS4 του πυρήνα και του FB απομονωτήρα έχουν εισαχθεί στην περιοχή της LTRs των HPV569 και Lenti-βAS3-FB του φορέα lentiviral αντίστοιχα. Οι αριθμοί των κλινικών εφαρμογών αναγράφονται στις παρενθέσεις (Cavazzana, 2017).

Παρά τις αδιάψευστες προόδους που έχουν σημειωθεί τα τελευταία χρόνια στις στρατηγικές της γονιδιακής θεραπείας, υπάρχει ακόμα αρκετός χώρος για την εξέλιξη της ειδικά όσον αφορά τη βελτίωση της έκφρασης και της μεταφοράς των τροποποιημένων γονιδιακά αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Ας μην ξεχνάμε ότι οι ασθενείς που πάσχουν από ομόζυγη β θαλασσαιμία και δρεπανοκυτταρική αναιμία παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα έκφρασης «φυσιολογικής» σφαιρίνης.

### **Ο Lentivirus (LVs) ως φορέας στη μέθοδο της γονιδιακής θεραπείας**

Όπως φάνηκε στην παραπάνω σχηματική απεικόνιση της γονιδιακής τροποποίησης ο τελευταίος φορέας αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο «όχημα» μεταφοράς των γενετικά τροποποιημένων πληροφοριών για την θεραπεία γονιδιακών ασθενειών και ιδιαίτερα της β-μεσογειακής αναιμίας. Ο ιός HIV ανήκει στην οικογένεια λεντιϊών ή λεντινοϊών (lentivirus). Lente στα λατινικά σημαίνει αργός λόγω της μακράς διάρκειας της επωαστικής του περιόδου στα κύτταρα του ξενιστή. Η χρήση του ως μεταγωγέα (lentiviral), δηλαδή φορέα των λεντιϊών, αποτελεί αρκετά υποσχόμενη τεχνική όσο αφορά τη μεταφορά των υγιών γονιδίων.

### **Δομή του lentivirus**

Ο lentivirus όπως είναι γνωστό ανήκει στην οικογένεια των ρετροϊών. Έχουν σφαιρικό σχήμα, περιβάλλονται από φάκελο και διαθέτουν μία μονής αλυσίδας RNA(+) γενετικό υλικό διαμέτρου 80-100 nm, που προστατεύεται μέσα σε ένα νουκλεοκαψίδιο. Επίσης διαθέτει αντίστροφη μεταγραφάση (για την αντιγραφή του RNA σε DNA), ιϊκή ιντεγκράση (για ενσωμάτωση στο γενετικό υλικό του ξενιστή) και ιϊκή πρωτεάση (για ωρίμανση). Συνεπώς μπορεί να μεταγράψει το γενετικό του υλικό μόλις εισχωρήσει στο κύτταρο που θα προσβάλλει και να το ενσωματώσει στο γενετικό υλικό του κυττάρου



ξενιστή με τη βοήθεια του ενζύμου ιντεγκράση. Δηλαδή σε γενικές γραμμές, μόλις εισχωρήσει το RNA του ιού μέσα στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή όπου έχει προσβάλλει, μεταγράφεται σε DNA με τη βοήθεια του ενζύμου τρανσκριπτάση (transcriptase) και εν συνεχεία εισερχόμενο στο πυρήνα του ξενιστή ενσωματώνεται στο DNA του με την βοήθεια του ενζύμου ιντεγκράση (integrase). Τότε μπορεί πλέον να εκφράσει τις δομικές, λειτουργικές και βοηθητικές πρωτεΐνες του οι οποίες είναι απαραίτητες για την επιβίωσή του. Οι ρετροϊοί μπορούν να διαχωριστούν σε απλούς και πολύπλοκους (simple or complex viruses) ανάλογα με την οργάνωση του γονιδιώματος τους, π.χ. ο γάμα – ρετροϊός (gamma retrovirus) ανήκει στην κατηγορία των απλών ρετροϊών, ενώ από την άλλη μεριά ο ιός HIV-1 αποτελεί παράδειγμα σύνθετου ρετροϊού με ένα γονιδίωμα 9.7kb. Τα γονίδια των ρετροϊών είναι υπεύθυνα για την έκφραση των δομικών και βοηθητικών πρωτεϊνών του καψιδίου (gag γονίδια, πχ P17, P7, P24), ενζύμων της αντίστοιχης μεταγραφάσης, ιϊκής πρωτεάσης και ιντεγκράσης (pol γονίδια, πχ P66, P11, P32 αντίστοιχα) και των διαμεμβρανικών δομικών γλυκοπρωτεϊνών που εντοπίζονται στον φάκελό του (env γονίδια, πχ gp120, gp41) και καθορίζουν την ταυτότητά του και των ρυθμιστικών πρωτεϊνών tat και rev. Επιπρόσθετα οι Lentiviruses, (όπως είναι ο ιός HIV1), διαθέτουν επιπλέον μια ομάδα βοηθητικών γονιδίων (vif, vpr, vpu, και nef), που ενισχύουν την παθογένεια και μολυσματικότητα του ιού (CoffinJM, 1997), (Frankel, 1998).

### **Παθογένεια του lentivirus**

Η είσοδος του ιού στο κύτταρο του ξενιστή εξαρτάται από τη σύνδεση μεταξύ μια γλυκοπρωτεϊνικής άγκυρας (gp120) που εντοπίζεται στην εξωτερική επιφάνεια του φακέλου του ιού και ενός ειδικού κυτταρικού υποδοχέα του ξενιστή (υποδοχείς κυτταροκινών). Ο ιός HIV προσβάλλει τα CD4 (βοηθητικά T λεμφοκύτταρα) αποδυναμώνοντας έτσι το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή και κάνουντάς τον ευάλωτο σε λοιμώξεις που θα μπορούσε να αντιμετωπίσει υπό φυσιολογικές συνθήκες. Η επιτυχής αυτή σύνδεση οδηγεί στην έναρξη μιας αλυσίδας γεγονότων που οδηγούν στην διείσδυση του ιού μέσα στα κύτταρα, προσθήκη του δικού του γενετικού υλικού και τη χρησιμοποίηση του κυττάρου για την αναπαραγωγή του (McClure, 1988).

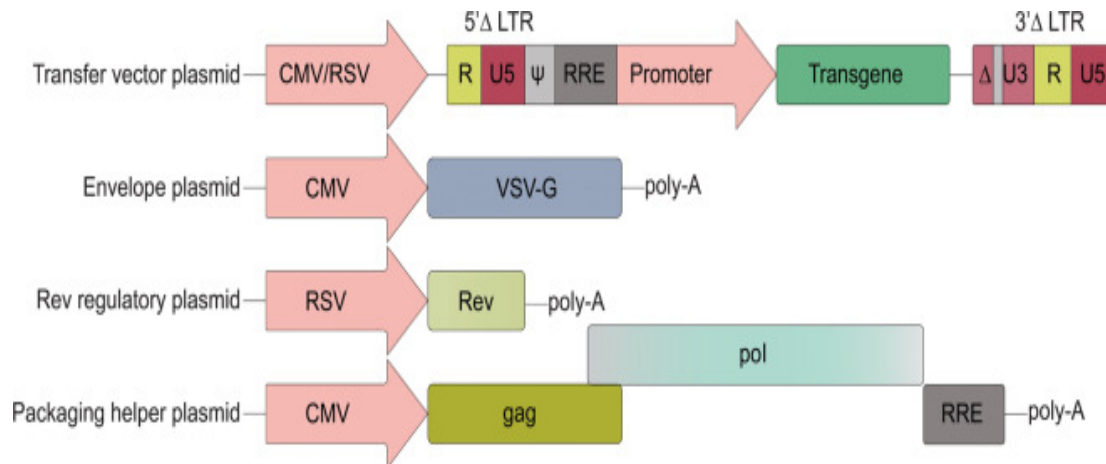
## Χρήση του lentivirus στη γονιδιακή θεραπεία

Το κύριο χαρακτηριστικό του φορέα αυτού σε σχέση με τους άλλους είναι ότι μπορεί να μεταφέρει μεγάλα τροποποιημένα τμήματα γενετικού υλικού. Συγκεκριμένα διαθέτει μια ικανότητα μεταφοράς γενετικού υλικού μεγέθους μέχρι 9kb. (Bulcha, 2021). Αν σε αυτό προσθέσουμε και την μοναδική ικανότητά του να προσβάλλει τα κύτταρα αποφεύγοντας τους αμυντικούς μηχανισμούς του οργανισμού, τότε αυτομάτως καθίσταται ιδανικό όχημα μεταφοράς υλικού (Baekelandt, 2003). Οι λεντιοί χρησιμοποιούνται για την εισαγωγή μεγάλων τμημάτων γενετικού υλικού σε κύτταρα διαιρούμενα (βλαστοκύτταρα, αιμοποιητικά κύτταρα) και μη διαιρούμενα (κύτταρα που έχουν αναπτυχθεί και έχουν εξελιχθεί και προσαρμοσθεί μορφολογικά, λειτουργικά και βιοχημικά όσον αφορά την ειδικότητά τους όπως μυϊκά, νευρικά, επιθηλιακά κύτταρα).

Βέβαια στο σχεδιασμό του έχει γίνει γενετική τροποποίηση ώστε να μην προκαλεί τις ασθένειες για τις οποίες είναι υπεύθυνος. Με βάση τον ΠΟΥ μέχρι σήμερα ο ιός HIV είναι υπεύθυνος για τον θάνατο 36,3 εκατομμύρια ανθρώπων παγκοσμίως (WHO, 2022). Έτσι ο φορέας lentiviral που έχει τα χαρακτηριστικά του HIV1 έχει «εξελιχθεί» γενετικά με τη βοήθεια της γενετικής μηχανικής προκειμένου να αποφευχθούν οι δυνητικοί κίνδυνοι που σχετίζονται από την εισαγωγή του σ' έναν οργανισμό. Έχουμε περάσει δηλαδή από την πρώτη γενιά στην τρίτη γενιά φορέων οι οποίοι φέρουν γενετικές τροποποιήσεις στο αρχικό τους γονιδίωμα. Χαρακτηριστικά στην 1<sup>η</sup> γενιά των φορέων που βασίστηκαν στον ιό HIV 1 διατηρήθηκαν πολλά από τα γονίδια του ιού όπως τα trans γονίδια που είναι υπεύθυνα για την έκφραση δομικών πρωτεϊνών (συμπεριλαμβανομένου του πυρήνα) και βοηθητικών πρωτεϊνών. Ο σχεδιασμός της 2<sup>ης</sup> γενιάς lentiviral φορέων έχει προκύψει χωρίς των vif, vpr, vpu και nef βοηθητικών γονιδίων που φυσιολογικά οδηγούν στην αύξηση της μολυσματικής ικανότητας του ιού. Η ασφάλεια της 3<sup>ης</sup> γενιάς του lentiviral έχει επιπλέον βελτιωθεί με το να αφαιρεθούν τμήματα από την περιοχή 3'-LTR που περιέχουν γονίδια για τα TATA box και μεταγραφικούς παράγοντες γεγονός που τον καθιστά αδρανή (Hanawa, 2002).

Συγκεκριμένα, η 3<sup>η</sup> γενιά lentiviral, όπως πολύ χαρακτηριστικά απεικονίζεται στο ακόλουθο σχήμα, έχει παραχθεί χρησιμοποιώντας τέσσερα πλασμίδια (δηλ. δίκλινα κυκλικά μόρια DNA). Το πρώτο πλασμίδιο έχει κατασκευασθεί με την προσθήκη του γενετικού τμήματος που θέλουμε να μεταφέρουμε ακολουθούμενο στη μια πλευρά του από έναν κατάλληλο ενισχυτή στις άκρες του, το LTRs. Στο φυσιολογικό (άγριο-wild type)

ο HIV1 και οι δύο πλευρές (5' and 3' LTRs) αποτελούνται από τις αλληλουχίες βάσεων U3, που περιέχουν στοιχεία ενισχυτικά και εναρκτήρια, R και U5. Στο κατασκευασμένο γενετικό τμήμα μέρος της U3 αλληλουχίας που εντοπίζεται στο 3'-LTR έχει διαγραφεί και ολόκληρο το U3 τμήμα που εντοπίζεται στο 5'-LTR τμήμα έχει αντικατασταθεί από έναν άλλο ισχυρό ιογενή εκκινητή τον CMV. Το psi (ψ) τμήμα ακολουθείται από το rev τμήμα (RRE). Το γλυκοπρωτεϊνικό περίβλημα του φακέλου του κωδικοποιείται από το VSV-G (vesicular stomatic virus) και εκφράζεται με τη βοήθεια ενός ισχυρού εκκινητή, όπως είναι ο CMV. Η γενετική περιοχή rev έχει διαχωριστεί από την περιοχή αυτή του πλασμιδίου και έχει τοποθετηθεί σε ξεχωριστό πλασμίδιο. Στο τροποποιημένο πλασμίδιο έχουν ενσωματωθεί οι λειτουργικές-ρυθμιστικές gag και pol γενετικές περιοχές και έχουν αφαιρεθεί οι ρυθμιστικές tat γενετικές περιοχές (Bulcha, 2021).



**Εικόνα 8.** Σχηματική απεικόνιση της 3<sup>ης</sup> γενιάς φορέα lentiviral που βασίστηκε στον ιό HIV1.

Ανάλογες τροποποιήσεις έχουν γίνει προκειμένου να βελτιωθεί η ικανότητα μεταφοράς και έκφρασης των γονιδίων με τα οποία έχουν τεχνητά «φορτωθεί». Η ενσωμάτωση μεταγραφικών ρυθμιστικών παραγόντων όπως για παράδειγμα η central polyurine tract (cprpt) και η matrix attachment (MAR) στην περιοχή έκφρασης του γονιδίου cis αυξάνουν την ικανότητα μεταγωγής του ιού (Park, 2001).

Συνοψίζοντας θα μπορούσαμε να αναφέρουμε ότι ο Lentiviral Vector είναι ένα «όχημα μεταφοράς» κατασκευασμένος από το γένος lentiviruses στο οποίο ανήκει και ο HIV-1 με γνώμονα δυο κυρίως χαρακτηριστικά:

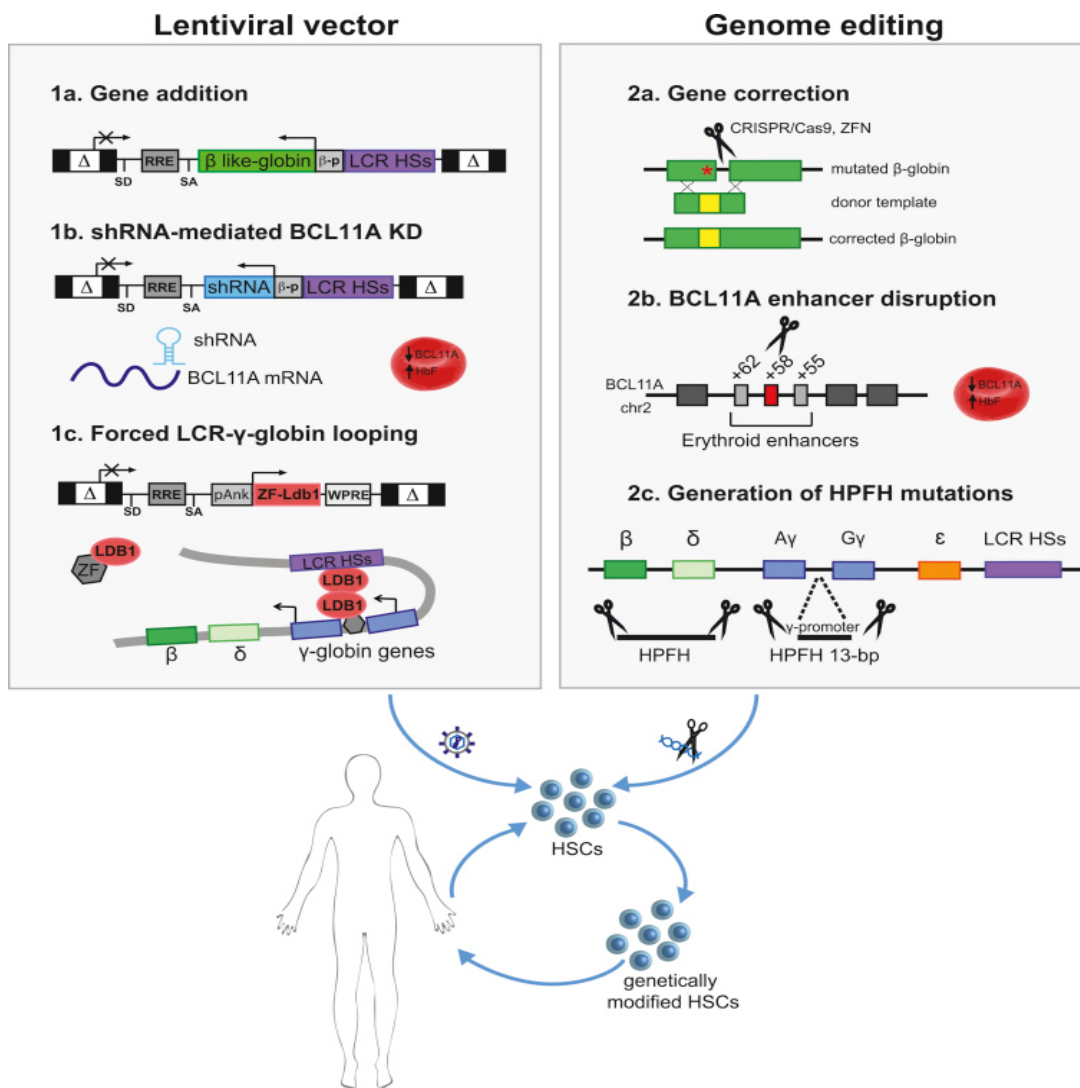
- Τα ουσιώδη γονίδια έχουν διαχωριστεί σε διαφορετικά πλασμίδια.

- Τα 4 βοηθητικά γονίδια που είναι υπεύθυνα για την μολυσματικότητα του (vif, vpr, vrn και net) έχουν διαγραφεί.

Έτσι με όλους τους απαραίτητους γονιδιακούς συνδυασμούς και σχηματισμούς δομήθηκε ο τεχνητός Lentivirus (RCL-replication competent lentivirus).

Αρκετές προσεγγίσεις έχουν χρησιμοποιηθεί στην γονιδιακή επεξεργασία των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων ώστε να επιτευχθεί η διόρθωση του γονιδιακού ελαττώματος που επηρεάζει την έκφραση της β-σφαιρίνης. Αρκετές κλινικές μελέτες που εξελίσσονται και στηρίζονται στην μεταμόσχευση διορθωμένων αυτόλογων αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων που πάσχουν από β-θαλασσαιμία ή δρεπανοκυτταρική αναιμία βασίζονται στη χρήση του ειδικού φορέα lentiviral vector που θα φέρει το «υγιές» γονίδιο για την έκφραση της β-σφαιρίνης.

Συγκεκριμένα, όπως αναπαριστάνεται σχηματικά στην παρακάτω εικόνα, οι υποθετικές ιδανικές θεραπευτικές στρατηγικές στηρίζονται στη χρήση του φορέα lentiviral και/ή στη χρήση των εργαλείων που παρέχει η μέθοδος της γονιδιακής τροποποίησης σκοπεύοντας στην ενεργοποίηση της έκφρασης της ενδογενής HbF. Επιπλέον μερικές άλλες μελέτες στηρίζονται αποκλειστικά στη χρήση της γονιδιακής τροποποίησης ως μέθοδος επιλογής για τη διόρθωση της μετάλλαξης στο SCD γονίδιο. Στο σημείο αυτό θα μπορούσαμε να αναφέρουμε ότι στη μελέτη που έχει διεξοδικά αναπτύξει ο Cavazzana με τους συνεργάτες του η περιοχή BCL11A έχει χαρακτηριστεί ως ο μοριακός στόχος για τη θεραπεία των διαταραχών στις β και γ σφαιρίνες. Στις διαγονιδιακές μελέτες (Knockdown studies) έχει αποδειχθεί ότι η BCL11A είναι υπεύθυνη για τη σίγαση της έκφρασης της HbF στην ερυθροειδή σειρά. Η επανενεργοποίηση της γ-σφαιρίνης συνοδεύεται με την μείωση των επιπέδων της β-σφαιρίνης, προφανώς ως συνέπεια της προτιμητέας αλληλεπίδρασης μεταξύ των LCR και γ-σφαιρινών εκκινήτων. Στα πειραματικά μοντέλα με ποντίκια με SCD η έλλειψη της BCL11A οδηγεί σε πανκυτταρική αύξηση της HbF και αντιστρέφει τη μη αναστρεπτή καταστροφή των οργάνων. Σημαντικό είναι ότι άτομα με ανεπάρκεια BCL11A παρουσίασαν σημαντική έκφραση της HbF και φυσιολογική αιμοποιητική λειτουργία.



**Εικόνα 9.** Σχηματική παράσταση των γονιδιακών θεραπευτικών προσεγγίσεων του γονιδιώματος των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (*hematopoietic stem cells- HSCs*) με τη χρήση *lentiviral* (εικόνες 1α έως 1γ) σε ασθενείς με β θαλασσαιμία και με επεξεργασία του γονιδιώματος (*genome editing*) σε ασθενείς με δρεπανοκυτταρική (*HSCs*) (εικόνες 2α και 2β).

Με βάση την παραπάνω εικόνα στην αριστερή στήλη αναπαριστούνται μέθοδοι στην τροποποίηση του γενετικού υλικού του LVs:

(1α): προσθήκη του «φυσιολογικού» γονιδιώματος, του τμήματος του υπεύθυνου για την έκφραση της β σφαιρίνης, στο γενετικό υλικό του φορέα *lentiviral*.

(1β): shRNA μεσολαβητής για την αφαίρεση του BCL11A γονιδίου (διαγωνιδιακού-knockdown): η επανεργοποίηση της έκφρασης της HbF που πετυχαίνεται στον ασθενή με την εισαγωγή του υπεύθυνου τμήματος του shRNA (για την έκφραση αυτή της HbF) και την ταυτόχρονη αφαίρεση του τμήματος BCL11A (που αντιτίθεται στην έκφραση αυτή).

(1c): εξαναγκασμός της LCR- $\gamma$ - σφαιρίνης να κάνει βρόγχο (looping) στη σωστή θέση: αύξηση της παραγωγής της HbF με τη χρήση της έκφρασης του πρωτεϊνικού παράγοντα του ZF-LDB1 που φέρει ο lentiviral έτσι ώστε να σχηματιστεί βρόγχος και να έρθει σε αντιπαράθεση η περιοχή LCR με την περιοχή των γονιδίων της  $\gamma$ - σφαιρίνης.

Στη δεξιά στήλη αναπαριστώνονται μέθοδοι της γονιδιακής τροποποίησης του γενετικού υλικού:

(2a): γονιδιακή διόρθωση: διόρθωση των μεταλλάξεων της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας και  $\beta$  – θαλασσαιμίας με τη χρήση συστήματος των νουκλεασών CRISPR/Cas9, ZFN. (μοριακή πρόκληση HDR).

(2b): διόρθωση της διαταραχής στην περιοχή BCL11A. Επανενεργοποίηση της έκφρασης της HbF που πετυχαίνεται με την μοριακή τροποποίηση του ειδικού ερυθροειδούς ενισχυτικού BCL11A (που εμποδίζει την έκφραση της HbF) στην περιοχή +58kb (του BCL11A).

(2c): έκφραση των HPFH μεταλλάξεων. Παραγωγή της αιμοσφαιρίνης HbF που πετυχαίνεται είτε με τη διαγραφή 13 ζεύγη βάσεων HPFH στους εκκινητές της  $\gamma$  σφαιρίνη μέσω MMEJ είτε με τη διαγραφή της μετάλλαξης HPFH (περικλείοντας τα γονίδια της  $\beta$  και  $\delta$ -σφαιρίνης) μέσω NHEJ. Αυτές οι μέθοδοι όμως αναμένεται να αποδειχθούν ως προς την ορθότητά τους με διεξοδικότερες μελέτες που πρέπει να γίνουν.

Τελικά τα γονιδιακά προϊόντα που έχουν παραχθεί είτε με τον ένα ή τον άλλο τρόπο εισάγονται στα αρχέγονα αιμοποιητικά, τα τροποποιούν και πλέον ξανά εισάγονται στον ασθενή (Cavazzana, 2017).

### **Ο Lentiviral σε κλινικές δοκιμές στη $\beta$ -μεσογειακή αναιμία**

Η χρήση του lentiviral σε ex-vivo θεραπευτικές προσεγγίσεις έχει βρει εφαρμογή σε αρκετές ασθένειες, όπως είναι και η  $\beta$ -θαλασσαιμία. Όπως θα αναφερθούμε και διεξοδικά στις παρακάτω σελίδες υπάρχουν αρκετές μελέτες (κλινικής φάσης I/II) όπου χρησιμοποιείται ο lentiviral για την μεταφορά στα αυτόλογα κύτταρα CD34 του υπεύθυνου γονιδίου για την έκφραση της φυσιολογικής  $\beta$ -σφαιρίνης σε ασθενείς με  $\beta$ -θαλασσαιμία. Για να θεωρηθεί η μέθοδος αυτή ως επιτυχημένη θα πρέπει να παραχθούν τα φυσιολογικά μόρια της αιμοσφαιρίνης στον οργανισμό του δέκτη σε αρκετή ποσότητα ώστε να ανταποκρίνονται στην λειτουργική τους αποστολή με ασφάλεια δηλαδή χωρίς κίνδυνο εμφάνισης κάποιας μελλοντικής μετάλλαξης.

Στις κλινικές φάσεις I/II των μελετών NCT01745120 και NCT02151526 έγινε χρήση του φορέα lentiviral LentiGlobin BB305 για τη μεταφορά με τη μέθοδο της ex vivo στα αυτόλογα κύτταρα CD34+ του φυσιολογικού γονιδίου βA-T87Q, υπεύθυνου για την έκφραση της ενήλικης αιμοσφαιρίνης HbA (HbA<sup>T87Q</sup>). Ο φορέας LentiGlobin BB305 είναι παρόμοιος με τον φορέα HPV569 που έχει αναπτυχθεί στο εργαστήριο του Leboulch. Στη μελέτη αυτή συμμετείχαν 22 ασθενείς ηλικιακής κατανομής 12 έως 35 ετών β-θαλασσαιμίας που υποβάλλονταν σε τακτικές μεταγγίσεις αίματος. Μετά από πάροδο περίπου 26 μηνών (15 έως 42 μήνες) αφού υποβλήθηκαν στην έγχυση των γενετικά τροποποιημένων CD34+ και οι 13 ασθενείς (εκτός ενός) που είχαν β-θαλασσαιμία (non-β<sup>0</sup>/β<sup>0</sup>) σταμάτησαν να υποβάλλονται σε μεταγγίσεις αίματος. Τα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης κυμάνθηκαν από 8,2gr/dl έως 13,2gr/dl. Στους 9 ασθενείς με ομόζυγη β-θαλασσαιμία (β<sup>0</sup>/β<sup>0</sup>) μειώθηκε κατά 73% η ανάγκη για ετήσια μετάγγιση ερυθρών ενώ 3 από αυτούς απεξαρτοποιήθηκαν (Thompson, 2018).

Στις παραπάνω αναφερόμενες μελέτες επαναχορηγήθηκαν τροποποιημένα κύτταρα με τον LentiGlobin BB305 μεταγωγέα (ex-vivo) τα οποία έφεραν την ονομασία προϊόντος betibeglogene autotemcel (της εταιρείας bluebird bio Inc.) όπου κυκλοφόρησε στη Ευρώπη τον Ιούνιο του 2019. Όσο αφορά σε θέματα ασφάλειας, κατά τη χορήγηση του LentiGlobin BB305 ως μεταγωγέα, δεν αναφέρθηκαν δυσμενείς παρενέργειες ούτε στις μελέτες ούτε και κατά την διάρκεια της θεραπείας, όπως είναι η φλεβική αποφρακτική διαταραχή του σπληνικού που εμφανίζεται στην αυτόλογη HSCT και σχετίζεται με το έκδοχο busulfan. Έτσι η μελλοντική έγκριση για εφαρμογή της παραπάνω μεθόδου τουλάχιστον στην Ευρώπη μπορεί να γίνει σε ασθενείς που πληρούν τα ηλικιακά κριτήρια (μεγαλύτεροι των 12 ετών) και φέρουν γονότυπο non-β<sup>0</sup>/β<sup>0</sup> οι οποίοι είναι επιλέξιμοι για μεταμόσχευση μυελού αλλά βρίσκονται σε αναμονή λόγω μη εύρεσης συμβατού δότη (Musallam, 2021).

Στην κλινική φάση III χρησιμοποιήθηκε μια πιο εκλεπτυσμένη διαδικασία μεταγωγής σε σχέση με αυτή που χρησιμοποιήθηκε στις μελέτες των φάσεων I και II προκειμένου να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα του προϊόντος betibeglogene autotemcel όσον αφορά την επίτευξη του στόχου του που δεν είναι άλλη από την ανεξαρτησία του ασθενούς από τις συχνές μεταγγίσεις αίματος. Συγκεκριμένα θα έπρεπε να επιτευχθεί τιμή Hb μεγαλύτερη ή ίση των 9g/dl (Hb ≥ 9 g/dl) χωρίς την ανάγκη υποβολής του ασθενούς σε μετάγγιση αίματος για μια συνεχή περίοδο μεγαλύτερη ή ίση

του ενός έτους (περίοδος  $\geq 12$  μηνών) μετά τη χορήγηση του προϊόντος. Οι αναφερόμενες παρακάτω μελέτες είναι σε εξέλιξη:

- η μελέτη HGB-207 (Northstar-2, NCT02906202) όπου συμμετέχουν 23 TDT άτομα ηλικίας  $\leq 50$  ετών με γονότυπο (non- $\beta^0/\beta^0$ ) δηλαδή ετερόζυγοι στη  $\beta$ -θαλασσαιμία και
- η μελέτη HGB-212 (Northstar-3, NCT03207009) όπου συμμετέχουν 18 TDT ασθενείς ηλικίας  $\leq 50$  ετών με γονότυπο ( $\beta^0/\beta^0$ ) δηλαδή ομόζυγοι σε  $\beta$ -θαλασσαιμία.

Κάποια προσωρινά δεδομένα των παραπάνω μελετών παρουσιάστηκαν στις 30 Νοεμβρίου του 2020 και αναγράφονται παρακάτω. Αφορούν συνολικά τους 41 ασθενείς που συμμετέχουν, εκ των οποίων οι 12 έφεραν γονότυπο  $\beta^0/\beta^0$  και οι υπόλοιποι 29 έφεραν γονότυπο non- $\beta^0/\beta^0$ .

- Συνολικά παρουσίασαν απεξάρτηση από τις μεταγγίσεις οι 30 από τους 34 (ποσοστό 88.2%). Συγκεκριμένα οι 6 από τους 7 (ποσοστό 85,7%) με γονότυπο  $\beta^0/\beta^0$  και οι 24 από τους 27 (ποσοστό 88,9%) με γονότυπο non- $\beta^0/\beta^0$  δεν χρειάστηκε να υποβληθούν σε μετάγγιση για ένα χρονικό διάστημα περίπου 20,6 μηνών. Η μέση τιμή της αιμοσφαιρίνης κατά τη διάρκεια της παραπάνω περιόδου στην ομάδα κυμαινόταν στο 11,5g/dl (Hb=11,5g/dl).
- Περίπου 2 ασθενείς παρουσίασαν ανεπιθύμητες ενέργειες που πιθανόν να σχετίζονταν στο προϊόν betibeglogene autotemcel, που περιελάμβαναν κοιλιακό πόνο (n=3) και θρομβοπενία (n=3; με ένα σοβαρό περιστατικό).
- Τέλος δεν αναφέρθηκαν θανατηφόρα περιστατικά ή ενδείξεις ογκογένεσης (Bou-Fakhredin, 2022).

Σε αυτή τη μελέτη συμμετείχαν και 27 παιδιατρικοί ασθενείς που παρουσίασαν την ίδια διάρκεια απεξάρτησης από τη διαδικασία της μετάγγισης και συγκεκριμένα:

- 9 από τους 11 μικρούς ασθενείς ηλικίας μικρότερης των 12 ετών και
- στο σύνολό τους και οι 10 ασθενείς (10/10) ηλικίας μεταξύ ( $\geq 12$  έως  $< 18$  ετών)

δεν εμφάνισαν ανεπιθύμητες παρενέργειες (Musallam, 2021).

Επίσης, στις 30 Νοεμβρίου του 2020 (όπως αναφέρονται στα παραπάνω δημοσιευμένα άρθρα των Musallam et all και Bou-Fankhredin et all) ανακοινώθηκαν και τα κάτωθι αποτελέσματα της μελέτης LTF-303 (NCT02633943). Σε αυτήν συμμετείχαν 44



ασθενείς στις I,II και III κλινικές φάσεις όπου δέχθηκαν την γονιδιακή θεραπεία betibeglogene autotemcel και παρακολουθήθηκε η πορεία της θεραπείας τους (follow up) για ένα διάστημα περίπου 45,6 μηνών (από 22,9 έως 76,4 μήνες). Ο απώτερος σκοπός της θεραπείας που ήταν η αποδέσμευση από τις μεταγγίσεις αίματος επιτεύχθηκε αναλυτικά στους:

- 15 από τους 22 ασθενείς (ποσοστό 68,2%) που συμμετείχαν στην φάση I και II, με την τιμή της αιμοσφαιρίνης τους να κυμαίνεται σε μια μέση τιμή: Hb=10,3g/dl.
- 20 από τους 22 ασθενείς (ποσοστό 90,9%) που συμμετείχαν στην φάση III, με την τιμή της αιμοσφαιρίνης τους να κυμαίνεται σε μια μέση τιμή: Hb=11,8g/dl.

Γενικά τα αποτελέσματα αυτά διατηρήθηκαν για μια περίοδο που κυμαίνονταν από 2 με 3 χρόνια, χωρίς βέβαια την ανάγκη μετάγγισης, και οφείλονταν στην γονιδιακή θεραπεία (betibeglogene autotemcel HbAT87Q) που δέχθηκαν οι ασθενείς αυτοί. Παρόλο που αρχικά παρατηρήθηκε αύξηση της LIC (Liver Iron Concentration) στους ασθενείς που υποβλήθηκαν στην θεραπεία αυτή, με την πάροδο του χρόνου μειώθηκε η συγκεκριμένη παρενέργεια και ιδιαίτερα στους ασθενείς που πέτυχαν να αποδεσμευτούν από τις μεταγγίσεις .

Στις 16 Φεβρουαρίου 2021 η ίδια εταιρεία (Bluebird bio) ανακοίνωσε τη παύση των κλινικών δοκιμών για τη χρήση της θεραπείας της betibeglogene autotemcel εξαιτίας της αναφοράς δυο περιστατικών εμφάνισης οξείας μυολεγενοϋς λευχαιμίας (ΟΜΛ) και μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου σε ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία που συμμετείχαν στη μελέτη HGB-206 (bio., 2021). Αργότερα όμως, στις 7 Ιουνίου του ίδιου έτους απεφάνθη ότι τα περιστατικά αυτά δεν σχετιζόνταν με τη χρήση του μεταγωγέα (bio., 2021).

Μερικές επιπλέον μελέτες με τη χρήση άλλων μεθόδων εισαγωγής γονιδίων και μεταγωγέων έχουν χρησιμοποιηθεί σε πειραματικά μοντέλα και έχουν μελετηθεί σε κλινικές εφαρμογές. Συγκεκριμένα στις κλινικές φάσεις I και II της μελέτης TIGET- BTHAL (NCT02453477) που εφαρμόστηκε σε ασθενείς εξαρτώμενους μεταγγίσεων (TDT) με απουσία ( $\beta^0$ ) ή μειωμένη ( $\beta^+$ ) παραγωγή αιμοσφαιρίνης μελετήθηκε η ενδομυελική χορήγηση των τροποποιημένων αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (HSCs) με τη χρήση του lentiviral μεταγωγέα «GLOBE». Τα αποτελέσματα έδειξαν μείωση της συχνότητας των μεταγγίσεων σε τρεις ενήλικες και την πλήρη ανεξάρτηση σε 3 από τα 4 παιδιά στα οποία εφαρμόστηκε (Markt, 2019).

Σε μια άλλη μελέτη (NCT01639690) εφαρμόστηκε η χορήγηση του μεταγωγέα TNS9.3.55 lentiviral στα αυτόλογα CD34+ HSPC σκύτταρα σε τέσσερις εξαρτώμενους μεταγγίσεων αίματος ασθενείς με ομόζυγη και ετερόζυγη β-θαλασσαιμία. Η παρακολούθηση αυτών των ασθενών για 6 έως 8 χρόνια έδειξε μια σταθερή γονιδιακή σύνδεση και ανταπόκριση χωρίς παρενέργειες σε όλους τους συμμετέχοντες. Μάλιστα ένας ασθενής σημείωσε σημαντική μείωση στη διαδικασία των μεταγγίσεων που διήρκησε τουλάχιστον 5 χρόνια (Boulad, 2022).

### **Το σκεύασμα Zynteglo**

Σύμφωνα με την εταιρεία Bluebird Bio, η γονιδιακή θεραπεία ZYNTEGLO (betibeglogene autotemcel) αποτελεί μια υποσχόμενη θεραπεία με την οποία εισάγονται τα λειτουργικά – φυσιολογικά της β-σφαιρίνης γονίδια ( $\beta^{A-T87Q}$ ) στα αυτόλογα αιμοποιητικά αρχέγονα κύτταρα (hematopoietic stem cells – HSCs) του ασθενούς. Άπαξ και πετύχει αυτή η γονιδιακή εισαγωγή, θεωρητικά ο ασθενής είναι σε θέση με την έκφραση του φυσιολογικού γονιδίου να παράγει την αιμοσφαιρίνη HbA<sup>T87Q</sup>, την φυσιολογική δηλαδή αιμοσφαιρίνη του ενήλικα ατόμου HbA (2 $\alpha$ , 2 $\beta$ ) χωρίς να έχει την ανάγκη μετάγγισης αίματος τουλάχιστον για 1 χρόνο και να διατηρήσει την τιμή της αιμοσφαιρίνης σε μια αποδεκτή τιμή που κυμαίνεται τουλάχιστον σε Hb=9 g/dl.

Στις 28 Απριλίου του 2020 ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων (European Medicines Agency – EMA) ανανέωσε την εξουσιοδότηση για τη χρήση της εφαρμογής της γονιδιακής θεραπείας ZYNTEGLO για τις 27 χώρες – μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης καθώς επίσης και για τη Βρετανία, τη Νορβηγία και το Λιχτενστάιν. Από την άλλη ο Αμερικάνικος Οργανισμός Φαρμάκων (U.S. Food and Drug Administration) περιμένει τα δεδομένα των μελετών της κλινικής φάσης III (Northstar-2 (HGB-207) και Northstar-3 (HGB-212) προκειμένου να την αδειοδοτήσει (bio, 2021).

### **Γονιδιακή θεραπεία στη δρεπανοκυτταρική αναιμία**

Η εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας έρχεται να δώσει τη λύση στο πρόβλημα της εύρεσης του κατάλληλου συμβατού δότη. Καταφέρνει δηλαδή είτε να προσθέσει ένα «υγιές» γονίδιο είτε να διορθώσει το μεταλλαγμένο γονίδιο είτε να απενεργοποιήσει – σιγάσει την έκφραση ενός γονιδίου. Η ex vivo γενετική τροποποίηση των αυτόλογων αρχέγονων αιμοποιητικών και προγεννητικών κυττάρων (autologous hematopoietic stem

and progenitor cells – HSPCs) με την κατάλληλη γενετική πληροφορία παρέχει μια μόνιμη θεραπεία χωρίς τον κίνδυνο της απόρριψης του μοσχεύματος λόγω ασυμβατότητας.

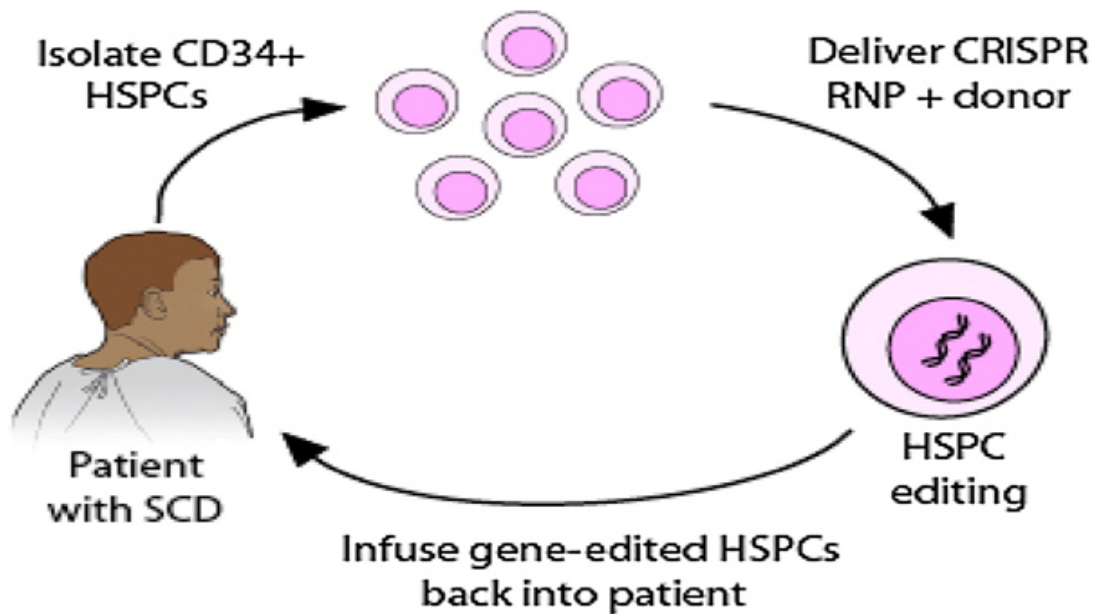
Τις τελευταίες δύο δεκαετίες η χρησιμοποίηση του lentiviral ως μεταφορέα της σωστής υγιούς γονιδιακής πληροφορίας έχει αποδειχθεί ασφαλής και πετυχημένη επιλογή τόσο σε προκλινικές όσο και σε κλινικές μελέτες. Ο πρώτος ασθενής με δρεπανοκυτταρική αναιμία που υποβλήθηκε σε επιτυχημένη θεραπεία με την οποία ο φορέας lentiviral μετέφερε το φυσιολογικό αντι-δρεπανοκυτταρικό γονίδιο HBB στο αυτόλογο αρχέγονο αιμοποιητικό του κύτταρο παρουσίασε υψηλό αριθμό φυσιολογικής β-σφαιρίνης στα ερυθρά του κύτταρα μετά από 15 μήνες, (κλινική μελέτη NCT02151526) (Ribeil, 2017).

Η προτεινόμενη όμως χρήση της μεθόδου της γονιδιακής επεξεργασίας (gene-editing) αποτελεί μια περισσότερο υποσχόμενη με μόνιμα αποτελέσματα γονιδιακή θεραπεία σε ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία. Συγκεκριμένα στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται τροποποιημένες νουκλεάσες ή όπως αλλιώς αποκαλούνται «μοριακά ψαλίδια». Αυτές οι μεγανουκλεάσες είναι: α) οι ενεργοποιητές μεταγραφής νουκλεάσες τελεστές (TAL-effector nucleases – TALENs), β) οι νουκλεάσες με δακτύλιο ψευδαργύρου (zinc finger nucleases – ZFNs) και γ) το σύστημα (CRISPR)/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats systems), δηλαδή περιοχές του DNA που περιέχουν πολλές, σύντομες και άμεσες επαναλήψεις αλληλουχιών βάσεων. Χρησιμοποιούνται στο να σπάσει, να κοπεί δηλαδή η διπλή έλικα του DNA στη συγκεκριμένη περιοχή όπου εντοπίζεται η γονιδιακή βλάβη (μετάλλαξη) και εν συνεχεία να επιτραπεί η διόρθωσή της με τη διαγραφή (απομάκρυνση), την προσθήκη (εισαγωγή) ή την αντικατάσταση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων που φέρουν τη βλάβη χρησιμοποιώντας τους ήδη υπάρχοντες μηχανισμούς που διαθέτει το κύτταρο. Οι νουκλεοτιδικές ομάδες TAL-effector nucleases (TALENs), zinc finger nucleases (ZFNs) φέρουν διακριτές περιοχές σύνδεσης με το DNA και χρησιμοποιούν την ενδονουκλεάση FokI για τη διάσπαση του DNA. Επειδή όμως ο «προγραμματισμός» αυτών των νουκλεοτιδίων είναι πολύπλοκος, χρονοβόρος και απαιτεί σημαντική εξειδίκευση από το επιστημονικό προσωπικό έχουν δώσει τη θέση τους τα τελευταία χρόνια στην ομάδα-σύστημα των νουκλεοτιδίων CRISPR/Cas9 που μπορούν να χαρακτηριστούν ως πιο πολύπλευρα και αποτελεσματικά. Σε γενικές γραμμές θα μπορούσαμε να αναφέρουμε ότι το CRISPR/Cas9 σύστημα χρησιμοποιεί ως οδηγό (guide) μια μονή αλληλουχία RNA

(gRNA) που συνδέεται στη συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος και στο Cas9 ενδονουκλεοτίδιο. Η Cas9 ενδονουκλεάση καθοδηγείται στο συγκεκριμένο τμήμα που είναι ομόλογο μεταξύ του gRNA και της περιοχής του DNA που θέλουμε να επέμβουμε (Park, 2021).

Στο σημείο αυτό θα μπορούσαμε να αναφέρουμε ότι ιστορικά οι περισσότερες μελέτες που χρησιμοποιούν το σύστημα CRISPR/Cas9 προέρχονται από αντίστοιχες μελέτες πάνω στο Gram(+) βακτήριο του πυογόνου στρεπτόκοκκου (*Streptococcus pyogenes*, Spγ/Cas9). Με τις συνεχείς μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί η δυνατότητά του στο να χρησιμοποιείται στη γενετική τροποποίηση του HSPCs έχει βελτιωθεί τόσο σε επίπεδο ασφάλειας όσο και σε επίπεδο ικανότητας. Όταν τα κύτταρα υποβάλλονται σε ηλεκτρική εκκένωση με τη χρήση της ηλεκτροφόρησης (electroporation), η κυτταρική μεμβράνη τους γίνεται διαπερατή από τις ριβονουκλεοπρωτεΐνες (RNP). Με τον τρόπο αυτό πετυχαίνεται η άμεση εισαγωγή τους στον κυτταρικό πυρήνα των HSPCs και άρα στο γονιδίωμα τους για την γενετική διόρθωσή τους. Οι ριβονουκλεοπρωτεΐνες είναι τα απαραίτητα γενετικά στοιχεία για την εισαγωγή του φυσιολογικού γονιδίου (donor template) και την έναρξη και τον τερματισμό της μεταγραφής του στον κυτταρικό πυρήνα. Όλη η μέθοδος βέβαια είναι κατάλληλα σχεδιασμένη έτσι ώστε να αποβλέπει στη μέγιστη θεραπευτική γονιδιακή τροποποίηση των κυττάρων CD34+ HSPCs ταυτόχρονα με την ελάχιστη έως καθόλου τοξική επίδραση σε αυτά (Park, 2021).

Συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω θα καταλήγαμε στην παρακάτω σχηματική απεικόνιση που απέδωσαν οι Park και Bao (2021) όπου αρχικά τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (CD34+ HSPCs) απομονώνονται από τον ασθενή από διάφορες πηγές του ανθρωπίνου σώματος (μυελό των οστών, ομφάλιο λώρο και φυσικά από το περιφερειακό αίμα). Τα απομονωμένα CD34+ κύτταρα παραμένουν σε καλλιεργητικό υλικό για μερικές ημέρες με κυτοκίνες γιατί με αυτό τον τρόπο έχει αποδειχθεί πως αυξάνεται η ικανότητά τους για την γενετική τροποποίηση. Το ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο (RNP-ribonucleoprotein) που αποτελείται από το CRISPR καθοδηγούμενο από το guide RNA (gRNA), το Cas9 και το πρότυπο τμήμα του DNA (φυσιολογικό) εισάγεται παραδείδει στο HSPCs μέσω ηλεκτροφόρησης (via electroporation) για την διόρθωση του γονιδίου. Κατόπιν το γονιδιακά τροποποιημένο HSPCs εγχέεται πίσω στον ασθενή προκειμένου να ολοκληρωθεί η διαδικασία της διόρθωσης.



**Εικόνα 10.** Σχηματικά η τεχνική της γονιδιακής τροποποίησης στη θεραπεία της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας.

Με τη μέθοδο της γονιδιακής τροποποίησης χρησιμοποιώντας το σύστημα CRISPR/Cas9 πετυχαίνουμε τη διόρθωση της μετάλλαξης στο γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή των δρεπανοειδών ερυθρών κυττάρων και παράλληλα την αύξηση της παραγωγής της αιμοσφαιρίνης F (HbF). Συγκεκριμένα σε αυτή τη μέθοδο στηρίζεται η μελέτη CTX001 (κλινική μελέτη NCT03745287) στην οποία χρησιμοποιήθηκαν αυτόλογα CD34<sup>+</sup>HSPCs στα οποία η γονιδιακή περιοχή BCL11A τροποποιήθηκε για να προκαλέσει μεγαλύτερη έκφραση της HbF. Βέβαια η παραπάνω μελέτη πρέπει να ερευνηθεί περισσότερο ως προς την αποτελεσματικότητά της και την ασφάλειά της. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η γονιδιακή τεχνική με τη χρήση του συστήματος της νουκλεάσης CRISPR/Cas9 είναι πιο εύχρηστη σε σχέση με τις άλλες μεθόδους γονιδιακής τροποποίησης που χρησιμοποιούν πιο πολύπλοκους πρωτεϊνικούς μηχανισμούς γιατί η ειδικότητά της ως προς τον στόχο της μπορεί να προγραμματιστεί με τη βοήθεια του ανάλογου οδηγού RNA – guideRNA – που δεσμεύει την πλευρά στο «DNA στόχο» μέσω της σύζευξης των βάσεων Watson-Crick. Χρησιμοποιώντας αυτή τη γονιδιακή τεχνική οδηγούμαστε στην μεταγραφή της γ-σφαιρίνης και στην έκφραση της αιμοσφαιρίνης HbF δημιουργώντας δομές που αδρανοποιούν των ειδικό γονιδιακό ενισχυτή BCL11A.

Σύμφωνα με τα πρώτα στοιχεία της κλινικής μελέτης NCT03745287, που αποδεικνύονται αρκετά ελπιδοφόρα, δύο ασθενείς που παρακολουθήθηκαν μετά από 3 και 12 μήνες μετά την θεραπεία τους παρουσίασαν επίπεδα αιμοσφαιρίνης περίπου στα 10g/dl (Hb=10g/dl) και ποσοστό έκφρασης της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης F (HbF) 46,8% και 42,2% αντίστοιχα. Δύο άλλοι ασθενείς (ένας με δρεπανοκυτταρική αναιμία και ένας άλλος με β-θαλασσαιμία) παρουσίασαν παρατεταμένα υψηλά επίπεδα των γονιδιακών τμημάτων που τροποποιήθηκαν (78%-81%) στα κύτταρα του μυελού των οστών στους 6 και 12 μήνες μετά τη θεραπεία τους που σίγουρα θα πρέπει να ερευνηθεί διεξοδικότερα και να εφαρμοστεί σε περισσότερους ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία, σύμφωνα πάντα με την παραπάνω μελέτη (Doerfler, 2021).

### **Έλληνες επιστήμονες στις κλινικές μελέτες της γονιδιακής θεραπείας**

Σε αυτό το πολλά υποσχόμενο πρόγραμμα της γονιδιακής θεραπείας δεν είναι λίγοι και οι Έλληνες επιστήμονες που συμβάλλουν για την ολοκλήρωσή του. Η ερευνήτρια Ευαγγελία Γιαννάκη συμμετέχει μαζί με άλλους συναδέλφους της από το Νοσοκομείο Γ. Παπανικολάου, (Μονάδα Μεταμόσχευσης Αιμοποιητικών κυττάρων- Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας) στην κλινική μελέτη NCT01206075, όπου ουσιαστικά αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα του ασθενούς συλλέγονται, ύστερα από χορήγηση ειδικού φαρμακευτικού παράγοντα. Ακολουθώντας τα βήματα που ήδη έχουμε περιγράψει στις παραπάνω σελίδες, δηλαδή την ανάπτυξή τους σε κυτταροκαλλιέργειες και την γενετική τροποποίησή τους προκειμένου να γίνει η προσθήκη του λειτουργικού γονιδίου της β-σφαιρίνης τα διορθωμένα πλέον αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα χορηγούνται πίσω στους ασθενείς προκειμένου να παράγουν φυσιολογικά λειτουργικά αιμοσφαίρια ώστε να τους προμηθεύσουν με ικανοποιητική ποσότητα αιμοσφαιρίνης για να ανεξαρτητοποιηθούν από τις μεταγγίσεις (Yannaki, 2013).

Ο πρόεδρος της Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρείας Θάνος Δημόπουλος θεωρεί το παραπάνω προϊόν γονιδιακής θεραπείας, το ZYNTEGLO, ως πολλά υποσχόμενο μέσο για τη ριζική αντιμετώπιση της ασθένειας αυτής όπως την έχουμε αναπτύξει. Καλούμενος να σχολιάσει τα πρακτικά του 24<sup>ου</sup> συνεδρίου της Ευρωπαϊκής Αιματολογικής Εταιρείας που έλαβε μέρος στο Άμστερνταμ στις 13 – 19 Ιουνίου 2019 εξέφρασε την εμπιστοσύνη του στις προόδους της μεθόδου. Σε αυτό παρουσιάστηκαν τα δεδομένα από τη Northstar κλινική μελέτη I/II (NCT01745120) για την ex vivo

γονιδιακή θεραπεία των αυτόλογων αιμοποιητικών κυττάρων CD34+ με τον φορέα BB305 lentiviral vector προκειμένου να εκφραστεί η φυσιολογική β-σφαιρίνη με τη βοήθεια του T87Q υποκατάστατου. Τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (HSCs) CD34+ των ασθενών αφού πρώτα απομονώθηκαν και εμπλουτίστηκαν σε περιβάλλον πλούσιο στους παράγοντες G-CSF και plerixafor τροποποιήθηκαν γενετικά με τη χρήση του BB305 LVV. Κατόπιν τα τροποποιημένα αυτά κύτταρα ξανά εγχύθηκαν στους ασθενείς αφού έλαβαν παράλληλα και κάποιους κυτταροτοξικούς παράγοντες όπως το myeloablative busulfan. Τα αρχικά αποτελέσματα έδειξαν παραγωγή αιμοσφαιρίνης Hb $\geq$ 2g/dl και απαλλαγή από τις μεταγγίσεις των ασθενών περίπου για διάστημα από 18 έως 24 μήνες. Συγκεκριμένα επιτεύχθηκε η παραγωγή αιμοσφαιρίνης από τα ερυθρά κύτταρα των ασθενών με τιμή να ανέρχεται σε Hb $\geq$ 9g/dl για μια περίοδο μεγαλύτερη του ενός έτους. Τα ενθαρρυντικά αυτά δεδομένα των δύο ετών οδήγησαν στην περαιτέρω παρακολούθηση των ασθενών αυτών σε μια μακροχρόνια μελέτη την LFT-303 (MarkC. Walters, 2019).

#### **Γενικά στατιστικά δεδομένα από την εφαρμογή των προτεινόμενων θεραπειών**

Από τα μέχρι τώρα δεδομένα, όπως τα περιγράψαμε σε γενικές γραμμές, η μέχρι σήμερα θεραπευτική επιλογή της βήτα μεσογειακής αναιμίας που προκαλεί και τη σοβαρή αναιμία λόγω της έλλειψης ανεπαρκών φυσιολογικών ερυθροκυττάρων οδηγώντας χωρίς παρέμβαση σε θάνατο μέσα στην πρώτη δεκαετία της ζωής του ατόμου είναι η αλλογενής μεταμόσχευση μυελού των οστών από συμβατό δωρητή προκειμένου να μειωθούν οι πιθανότητες απόρριψης του μοσχεύματος και κατά επέκταση της νοσηρότητας και θνησιμότητας. Η εύρεση συμβατού δότη είναι μια διαδικασία χρονοβόρα καθώς θέτει σε αναμονή τον ασθενή με μόνη εναλλακτική λύση τις συχνές μεταγγίσεις αίματος με ό,τι αυτό συνεπάγεται: αποσιδήρωση με χηλικούς παράγοντες και γενική διατάραξη της καλής κατάστασης της υγείας τους, τόσο της σωματικής όσο και της ψυχικής.

Στόχος της γονιδιακής θεραπείας είναι να παρακάμψει τον σκόπελο που λέγεται ασυμβατότητα με το να μεταφέρει το φυσιολογικό γονίδιο που ελέγχει την έκφραση της β-αλυσίδας και να αντικαταστήσει το πάσχον στο 11<sup>ο</sup> χρωμόσωμα. Μέσα σε μια πάροδο μελέτης 20 ετών, που εξακολουθεί να βρίσκεται σε εξέλιξη για ασφαλή αποτελέσματα, τα διορθωμένα πλέον αυτόλογα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα CD34+ θα παράγουν τη

φυσιολογική ερυθρά σειρά και θα παρέχουν την «ίαση» σε αυτούς που δεν βρίσκουν συμβατούς δότες (Boulad, 2009).

Με βάση τα δεδομένα του Ελληνικού Εθνικού Μητρώου (Greek National Registry) κάθε χρόνο καταγράφονται σημαντικά λιγότερα περιστατικά β-θαλασσαιμίας στην Ελλάδα εξαιτίας του προληπτικού προγράμματος που εφαρμόζεται από το 1974 και βασίζεται στην ενημέρωση και στις προληπτικές εξετάσεις. Έτσι από τις 150 με 200 νέες περιπτώσεις που καταγράφονταν ετησίως (κυρίως β-θαλασσαιμίας αλλά και άλλων αιμοσφαιρινοπαθειών), περιορίστηκαν μόλις στις 5 ετησίως κατά προσέγγιση (Voskaridou, 2012). Μια άλλη έρευνα του Υπουργείου Υγείας και Πρόνοιας που εκπονήθηκε το 1997 στην Ελλάδα καταγράφηκαν 2900 ασθενείς με μεσογειακή αναιμία και κάθε χρόνο προστίθενται 10 νέοι ασθενείς. Αν υπολογίσουμε ότι η μετάγγιση αίματος είναι ένα γεγονός άρρηκτα συνδεδεμένο με την επιβίωση των ατόμων και ότι περίπου μια φορά το μήνα πρέπει να υποβάλλονται σε αυτή τη χρονοβόρα διαδικασία των 3-4 ωρών στο νοσοκομείο, καταλαβαίνουμε ότι πρέπει να είναι διαθέσιμη αρκετή ποσότητα στις τράπεζες αίματος. Αν και είναι σημαντικά περιορισμένος ο αριθμός των γεννήσεων των ατόμων που εξαρτώνται από τις μεταγγίσεις αίματος, στην Ελλάδα μεταξύ των ετών 1997 και 2010 ένα σύνολο ασθενών κυρίως με β-θαλασσαιμία και κατά ένα μικρότερο ποσοστό από άλλες αιμοσφαιρινοπάθειες έγιναν αποδέκτες του 18% του ολικού αποθέματος σε αίμα (Kattamis, 2020).

Στο σημείο αυτό θα ήταν παράλειψη αν δεν αναφέρουμε και την οικονομική επίπτωση που έχει σε κάθε χώρα η εκδήλωση της ασθένειας αυτής και που είναι συνδεδεμένη άρρηκτα με το κονδύλι που δεσμεύεται από τον κρατικό προϋπολογισμό για την αντιμετώπισή της. Ενδεικτικά από τον κρατικό ταμείο του Ηνωμένου Βασιλείου διατέθηκαν για τη διαχείριση της θεραπείας της β-θαλασσαιμίας (ομόζυγης) σε βάθος χρόνου 50 ετών το ποσό των 720.201 Αμερικάνικων δολαρίων (USD) το 2013-2014 για κάθε ασθενή (Weidlich, 2016). Σε μια μελέτη που περιελάμβανε 331 Έλληνες ασθενείς με β-θαλασσαιμία υπολογίστηκε ότι το μέσο κόστος θεραπείας τους που περιλαμβάνει όλες τις θεραπευτικές προσεγγίσεις για τον κάθε ένα ανέρχονταν σε 32.064 ευρώ για την χρονική περίοδο 2009 έως 2011. Το ποσό αυτό τελικά αυξήθηκε από 30.997 ευρώ το 2009 σε 32.564 ευρώ το 2011 (Geitona, 2014). Για τη χώρα του Ιράν έχει υπολογιστεί ότι ο κάθε ασθενής με β-θαλασσαιμία επιβαρύνει τον κρατικό προϋπολογισμό κάθε χρόνο με το ποσό των 8.321 Αμερικάνικων δολαρίων (Esmaeilzadeh, 2016). Τέλος μια μελέτη του



2014 στο Βόρειο Ισραήλ κοστολόγησε το ποσό που πρέπει να ξοδευθεί για την θεραπεία ενός ασθενή με β-θαλασσαιμία. Για 50 χρόνια ανέρχεται σε 1.971.380 Αμερικάνικα δολάρια, δηλαδή η μέση ετήσια κοστολόγηση υπολογίζεται σε 39.427 Αμερικάνικα δολάρια (Koren, 2014).

### **Συμπεράσματα**

Όλα αυτά αναφέρθηκαν για την επισήμανση της αναγκαιότητας της ανάπτυξης της θεραπευτικής προσέγγισης που παρέχει η γονιδιακή θεραπεία στην αντιμετώπιση της μεσογειακής αναιμίας. Μιας αναγκαιότητας που γίνεται ακόμα πιο επιτακτική αναλογιζόμενοι ότι οι μέχρι σήμερα εφαρμοζόμενες μέθοδοι θεραπείας αποτελούν ημίμετρα τόσο λόγω των σημαντικών επιπλοκών που επιφέρουν στην υγεία των ασθενών αυτών όσο και στο ότι δεν αποτελούν πανάκεια. Η αντιμετώπιση της επομένως με την ανάπτυξη της γονιδιακής θεραπείας αποτελεί μονόδρομο και προς αυτή την κατεύθυνση θα πρέπει να αναζητηθεί λύση. Μια οριστική λύση που μπορεί να θεωρηθεί πολύ κοντά στο να αποκτήσει υπόσταση με βάση τις αναφορές που παρουσιάστηκαν στην παρούσα ανασκόπηση και εξελίσσονται σε παγκόσμιο επίπεδο.

## Αναφορές

[Online] <https://investor.bluebirdbio.com/news-releases/news-release-details/bluebird-bio-announces-lifting-fda-clinical-hold-sickle-cell>.

**Ahmed, M. H., Ghatge, M. S., & Safo, M. K. 2020.** Hemoglobin: Structure, Function and Allostery. *Sub-cellular biochemistry*. PMID: 32189307. 7 20, 2020, pp. 1-3.

**Baekelandt, V., Eggermont, K., Michiels, M., Nuttin, B., & Debyser, Z. 2003.** Optimized lentiviral vector production and purification procedure prevents immune response after transduction of mouse brain. *Gene therapy*. PMID: 14528317. 11 2003, p. 1933.

**bio, Bluebird. 2021.** About betibeglogene autotemcel (beti-cel). *Bluebird bio Announces the Lifting of FDA Clinical Hold for Sickle Cell Disease and  $\beta$ -Thalassemia Studies*. [Online] 6 7, 2021. [Cited: 5 9, 2022.] <https://investor.bluebirdbio.com/news-releases/news-release-details/bluebird-bio-announces-lifting-fda-clinical-hold-sickle-cell>.

**bio., Bluebird. 2021.** Bluebird bio Announces. *Bluebird bio Announces the Lifting of FDA Clinical Hold for Sickle Cell Disease and  $\beta$ -Thalassemia Studies*. . [Online] 6 7, 2021. [Cited: 4 9, 2022.] <https://investor.bluebirdbio.com/news-releases/news-release-details/bluebird-bio-announces-lifting-fda-clinical-hold-sickle-cell>.

—. **2021.** Bluebird bio Announces. *Bluebird bio Announces Temporary Suspension on Phase 1/2 and Phase 3 Studies of LentiGlobin Gene Therapy for Sickle Cell Disease (bb1111)*. *Press Release*. [Online] 6 7, 2021. [Cited: 4 9, 2022.] <https://investor.bluebirdbio.com/news-releases/news-release-details/bluebird-bio-announces-temporary-suspension-phase-12-and-phase-3>.

**Borgna-Pignatti, C., Cappellini, M. D., De Stefano, P., Del Vecchio, G. C., Forni, G. L., Gamberini, M. R., Ghilardi, R., Piga, A., Romeo, M. A., Zhao, H., & Cnaan, A. 2006.** Cardiac morbidity and mortality in deferoxamine- or deferiprone-treated patient. *Blood*. PMID: 16373663. 5 1, 2006, p. 3733.

**Bou-Fakhredin, R., Motta, I., & Cappellini, M. D. 2022.** Advancing the care of  $\beta$ -thalassaemia patients with novel therapies. *Blood transfusion*. PMID: 34694225. 1 2022, p. 80.

**Boulad, F., Maggio, A., Wang, X., Moi, P., Acuto, S., Kogel, F., Takpradit, C., Prockop, S., Mansilla-Soto, J., Cabriolu, A., Odak, A., Qu, J., Thummar, K., Du, F., Shen, L., Raso, S., Barone, R., Di Maggio, R., Pitrolo, L., Giambona, A., ... Sadelain, M. 2022.** Lentiviral globin gene therapy with reduced-intensity conditioning in adults with  $\beta$ -thalassemia: a phase 1 trial. *Nature medicine*. PMID: 34980909. 1 3, 2022, p. 63.

**Boulad, F., Rivière, I., & Sadelain, M. 2009.** Gene therapy for homozygous beta-thalassemia. Is it a reality? *Hemoglobin*. PMID: 20001625. 12 13, 2009, p. 188.

**Bulcha, J. T., Wang, Y., Ma, H., Tai, P., & Gao, G. 2021.** Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Signal transduction and targeted therapy*. PMID: 33558455. 2 8, 2021, p. 2.

- . **2021**. Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Signal transduction and targeted therapy*. PMID: 33558455. 2 8, 2021, p. 1.
- . **2021**. Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Signal transduction and targeted therapy*. PMID: 33558455. 2 8, 2021, p. 15.
- . **2021**. Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Signal transduction and targeted therapy*. PMID: 33558455. 2 8, 2021, pp. 15-16.
- Cappellini, M. D., & Motta, I. 2017**. New therapeutic targets in transfusion-dependent and -independent thalassemia. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*. PMID: 29222267. 12 8, 2017, p. 1.
- Cathy, O' Neil. 2017**. *Weapons of Math Destruction: How Big Data Increases Inequality and Threatens Democracy*. Chicago : Crown Random House, 2017.
- Cavazzana, M., Antoniani, C., & Miccio, A. 2017**. Gene Therapy for  $\beta$ -Hemoglobinopathies. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. PMID: 28377044. 5 3, 2017, p. 1148.
- . **2017**. Gene Therapy for  $\beta$ -Hemoglobinopathies. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. PMID: 28377044. 5 3, 2017, pp. 1142-1143.
- . **2017**. Gene Therapy for  $\beta$ -Hemoglobinopathies. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. PMID: 28377044. 5 3, 2017, p. 1147.
- . **2017**. Gene Therapy for  $\beta$ -Hemoglobinopathies. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. PMID: 28377044. 5 3, 2017, pp. 1145-1147.
- Cienciulli, Paolo. 2008**. Treatment of iron overload in thalassemia. *Pediatric endocrinology reviews*. PMID: 19337180. 10 2008, p. 208.
- Clegg, J. B., & Weatherall, D. J. 1999**. Thalassemia and malaria: new insights into an old problem. . *Proceedings of the Association of American Physicians*. PMID: 10417734. 7-8 1999, p. 278.
- Cline, M. J. 1985**. Perspectives for gene therapy: inserting new genetic information into mammalian cells by physical techniques and viral vectors. *Pharmacology & therapeutics*. PMID: 3914646. 1985, pp. 84-88.
- Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE. 1997**. Retroviruses. PMID: 21433340. *Retroviruses*. ISBN-10: 0-87969-571-4. Cold Spring Harbor (NY) : Cold Spring Harbor Laboratory Press., 1997.
- Colah, R., Gorakshakar, A., & Nadkarni, A. 2010**. Global burden, distribution and prevention of  $\beta$ -thalassemias and hemoglobin E disorders. *Expert review of hematology*. PMID: 21082937. 2 2010, p. 103.
- Consortium, International Human Genome Sequencing. 2004**. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. PMID: 15496913. 10 21, 2004, p. 931.

- Cox, D. B., Platt, R. J., & Zhang, F. 2015.** Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nature medicine*. PMID: 25654603. 2 2015, pp. 6-8.
- Deng, J., Guo, M., Li, G., & Xiao, J. 2020.** Gene therapy for cardiovascular diseases in China: basic research. *Gene therapy*. PMID: 32341485. 8 27, 2020, p. 360.
- Doerfler, P. A., Sharma, A., Porter, J. S., Zheng, Y., Tisdale, J. F., & Weiss, M. J. 2021.** Genetic therapies for the first molecular disease. *The Journal of clinical investigation*. PMID: 33855970. 4 15, 2021, pp. 5-7.
- Eaton, W. A., & Hofrichter, J. 1987.** Hemoglobin S gelation and sickle cell disease. *Blood*. PMID: 3311198. 11 1987, p. 1245.
- Esmaeilzadeh, F., Azarkeivan, A., Emamgholipour, S., Akbari Sari, A., Yaseri, M., Ahmadi, B., & Ghaffari, M. 2016.** Economic Burden of Thalassemia Major in Iran, 2015. *Journal of research in health sciences*. PMID: 27840337. 8 2016, p. 111.
- Farashi, S., & Hartevelde, C. L. 2018.** Molecular basis of  $\alpha$ -thalassemia. . *Blood cells, molecules & diseases*. PMID: 29032940. 5 2018, pp. 43-53.
- Flaten, T. P., Aaseth, J., Andersen, O., & Kontoghiorghes, G. J. 2012.** Iron mobilization using chelation and phlebotomy. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements*. PMID: 22565013. 6 2012, p. 127.
- Frankel, A. D., & Young, J. A. 1998.** HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annual review of biochemistry*. PMID: 9759480. 1998, pp. 1-3.
- Galanello, R., & Origa, R. 2010.** Beta-thalassemia. *Orphanet journal of rare diseases*. PMID: 20492708. 5 21, 2010, p. 2.
- Geitona, M., Karagianni, V., Kattamis, A., Voskaridou, E., Drosou, M., Vini, D., & Kalogeropoulou, M. 2014.** The Economic Burden of Treating Thalassemia In Greece. *Value in health : the journal of the International Society for Pharmacoeconomics and Outcomes Research*. PMID: 27201661. 11 17, 2014, p. A526.
- Grosveld, F., van Assendelft, G. B., Greaves, D. R., & Kollias, G. 1987.** Position-independent, high-level expression of the human beta-globin gene in transgenic mice. *Cell*. PMID: 3690667. 12 24, 1987, p. 975.
- Guanglun, Mu Michael, Yang, Hu and Yan, Wang. 2017.** Building resilience of students with disabilities in China: The role of inclusive education teachers. *Teacher and Teaching Education*. October 2017, pp. 125-134.
- Guyton, A. 1990.** *Φυσιολογία του ανθρώπου. 3ος Τόμος*. Αθήνα : Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας, 1990.
- Hanawa, H., Kelly, P. F., Nathwani, A. C., Persons, D. A., Vandergriff, J. A., Hargrove, P., Vanin, E. F., & Nienhuis, A. W. 2002.** Comparison of various envelope proteins for their ability to pseudotype lentiviral vectors and transduce primitive hematopoietic cells from

human blood. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. PMID: 11863413. 3 2002, p. 244.

**Hassall, M. M., Barnard, A. R., & MacLaren, R. E. 2017.** Gene Therapy for Color Blindness. *The Yale journal of biology and medicine*. PMID: 29259520. 12 19, 2017, p. 543.

**Hassell, Kathryn L. 2010.** Population estimates of sickle cell disease in the U.S. *American journal of preventive medicine*. PMID: 20331952. 4 2010, p. 512.

**Hedrick, P W. 2011.** Population genetics of malaria resistance in humans. *Heredity*. PMID: 21427751. 10 2011, p. 283.

**Ingram, V M. 1957.** Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. *Nature*. PMID: 13464827. 8 17, 1957, p. 326.

**Karponi, G., Psatha, N., Lederer, C. W., Adair, J. E., Zervou, F., Zogas, N., Kleanthous, M., Tsatalas, C., Anagnostopoulos, A., Sadelain, M., Rivière, I., Stamatoyannopoulos, G., & Yannaki, E. 2015.** Plerixafor+G-CSF-mobilized CD34+ cells represent an optimal graft source for thalassemia gene therapy. *Blood*. PMID: 26089395. 7 30, 2015, p. 616.

**Kattamis, A., Forni, G. L., Aydinok, Y., & Viprakasit, V. 2020.** Changing patterns in the epidemiology of  $\beta$ -thalassemia. *European journal of haematology*. PMID: 32886826. 12 2020, p. 698.

**Kirschner, J., Butoianu, N., Goemans, N., Haberlova, J., Kostera-Pruszczyk, A., Mercuri, E., van der Pol, W. L., Quijano-Roy, S., Sejersen, T., Tizzano, E. F., Ziegler, A., Servais, L., & Muntoni, F. 2020.** European ad-hoc consensus statement on gene replacement therapy for spinal muscular atrophy. *European journal of paediatric neurology : EJPN : official journal of the European Paediatric Neurology Society*. PMID: 32763124. 9 28, 2020, p. 38.

**Kolnagou, A., Kontoghiorghe, C. N., & Kontoghiorghes, G. J. 2018.** New targeted therapies and diagnostic methods for iron overload diseases. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*. PMID: 28930516. 1 1, 2018, p. 1.

**Kolnagou, Annita, Kontoghiorghe, Christina N and Kontoghiorghes, George J. 2014.** Transition of Thalassemia and Friedreich ataxia from fatal to chronic diseases. *World journal of methodology*. PMID: 25541601. 12 26, 2014, p. 198.

**Koren, A., Profeta, L., Zalman, L., Palmor, H., Levin, C., Zamir, R. B., Shalev, S., & Blondheim, O. 2014.** Prevention of  $\beta$  Thalassemia in Northern Israel - a Cost-Benefit Analysis. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*. PMID: 24678389. 2 17, 2014, p. 1.

**Kwiatkowski, Dominic P. 2005.** How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria. *American journal of human genetics*. PMID: 16001361. 8 2005, p. 171.

**Mark C. Walters, Janet L. Kwiatkowski, John E. J. Rasko, Suradej Hongeng, Gary J. Schiller, Usanarat Anurathapan et al. 2019.** EHA. *European Hematology Association*,

*Open Access Library*. [Online] 6 14, 2019. [Cited: 4 13, 2022.]  
<https://library.ehaweb.org/eha/2019/24th/267342/mark.c.walters.clinical.outcomes.of.le ntoglobin.gene.therapy.for.html>.

**Markt, S., Scaramuzza, S., Cicalese, M. P., Giglio, F., Galimberti, S., Lidonnici, M. R., Calbi, V., Assanelli, A., Bernardo, M. E., Rossi, C., Calabria, A., Milani, R., Gattillo, S., Benedicenti, F., Spinuzzi, G., Aprile, A., Bergami, A., Casiraghi, M. 2019.** Intrabone hematopoietic stem cell gene therapy for adult and pediatric patients affected by transfusion-dependent  $\beta$ -thalassemia. *Nature medicine*. PMID: 30664781. 2 2019, p. 234.

**Maule, G., Arosio, D., & Cereseto, A. 2020.** Gene Therapy for Cystic Fibrosis: Progress and Challenges of Genome Editing. *International journal of molecular sciences*. PMID: 32486152. 5 30, 2020, p. 1.

**McClure, M. O., Marsh, M., & Weiss, R. A. 1988.** Human immunodeficiency virus infection of CD4-bearing cells occurs by a pH-independent mechanism. *The EMBO journal*. PMID: 3259178. 2 1988, pp. 515-516.

**Modell, B., Khan, M., Darlison, M., Westwood, M. A., Ingram, D., & Pennell, D. J. 2008.** Improved survival of thalassaemia major in the UK and relation to T2\* cardiovascular magnetic resonance. *Journal of cardiovascular magnetic resonance : official jour*. PMID: 18817553. 9 25, 2008, p. 1.

**Morrissey, Janet. 2018.** The New York Times. *How to Write a Good College Application Essay*. [Online] August 2, 2018.  
<https://www.nytimes.com/2018/08/02/education/learning/writing-college-application-essay.html?rref=collection%2Fsectioncollection%2Feducation&action=click&contentCollection=education&region=rank&module=package&version=highlights&contentPlacement=2&pgtype=s>.

**Musallam, K. M., Bou-Fakhredin, R., Cappellini, M. D., & Taher, A. T. 2021.** 2021 update on clinical trials in  $\beta$ -thalassemia. *American journal of hematology*. PMID: 34347889. 11 1, 2021, pp. 1519-1520.

—. 2021. 2021 update on clinical trials in  $\beta$ -thalassemia. . *American journal of hematology*. PMID: 34347889. 11 1, 2021, p. 1520.

**Nakagami, Hironori. 2021.** Development of COVID-19 vaccines utilizing gene therapy technology. *International immunology*. PMID: 33772572. 10 25, 2021, p. 521.

**Naldini, L., Blömer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., Verma, I. M., & Trono, D. 1996.** In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*. PMID: 8602510. 4 12, 1996, p. 263.

**Nathwani, Amit C. 2019.** Gene therapy for hemophilia. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program, 2019*. PMID: 31808868. 12 6, 2019, p. 1.

**Odame, Isaac. 2014.** Perspective: we need a global solution. *Nature*. PMID: 25390135. 11 13, 2014, p. 10.

- Origa, R. 2021.** Beta-Thalassemia. *GeneReviews*®. University of Washington, Seattle. PMID: 20301599. 24, 2021, p. 1.
- Park, F., & Kay, M. A. 2001.** Modified HIV-1 based lentiviral vectors have an effect on viral transduction efficiency and gene expression in vitro and in vivo. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. PMID: 11545606. 9 2001, p. 164.
- Park, S. H., & Bao, G. 2021.** CRISPR/Cas9 gene editing for curing sickle cell disease. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis*. PMID: 33455878. 2 2021, pp. 2-4.
- . 2021. CRISPR/Cas9 gene editing for curing sickle cell disease. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis*. PMID: 33455878. 2 2021, p. 4.
- Platt, O. S., Brambilla, D. J., Rosse, W. F., Milner, P. F., Castro, O., Steinberg, M. H., & Klug, P. P. 1994.** Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *The New England journal of medicine*. PMID: 7993409. 6 9, 1994, p. 1639.
- Platt, O. S., Thorington, B. D., Brambilla, D. J., Milner, P. F., Rosse, W. F., Vichinsky, E., & Kinney, T. R. 1991.** Pain in sickle cell disease. Rates and risk factors. *The New England journal of medicine*. PMID: 1710777. 7 4, 1991, p. 11.
- Puthenveetil, G., Scholes, J., Carbonell, D., Qureshi, N., Xia, P., Zeng, L., Li, S., Yu, Y., Hiti, A. L., Yee, J. K., & Malik, P. 2004.** Successful correction of the human beta-thalassemia major phenotype using a lentiviral vector. *Blood*. PMID: 15292064. 12 1, 2004, p. 3445.
- Ribeil, J. A., Hacein-Bey-Abina, S., Payen, E., Magnani, A., Semeraro, M., Magrin, E., Caccavelli, L., Neven, B., Bourget, P., El Nemer, W., Bartolucci, P., Weber, L., Puy, H., Meritet, J. F., Grevent, D., Beuzard, Y., Chrétien, S., Lefebvre, T., Ross, R. 2017.** Gene Therapy in a Patient with Sickle Cell Disease. *The New England journal of medicine*. PMID: 28249145. 3 2, 2017, p. 848.
- Roselli, E. A., Mezzadra, R., Frittoli, M. C., Maruggi, G., Biral, E., Mavilio, F., Mastropietro, F., Amato, A., Tonon, G., Refaldi, C., Cappellini, M. D., Andreani, M., Lucarelli, G., Roncarolo, M. G., Markt, S., & Ferrari, G. 2010.** Correction of beta-thalassemia major by gene transfer in haematopoietic progenitors of pediatric patients. *EMBO molecular medicine*. PMID: 20665635. 8 2010, p. 315.
- Simpson, E., & Dazzi, F. 2019.** Bone Marrow Transplantation 1957-2019. *Frontiers in immunology*. PMID: 31231381. 6 5, 2019, p. 1.
- Sudhakar, V., & Richardson, R. M. 2019.** Gene Therapy for Neurodegenerative Diseases. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. PMID: 30542906. 1 16, 2019, p. 166.

- Sun, W., Shi, Q., Zhang, H., Yang, K., Ke, Y., Wang, Y., & Qiao, L. 2019.** Advances in the techniques and methodologies of cancer gene therapy. *Discovery medicine*. PMID: 30721651. 1 27, 2019, p. 45.
- Thein, Swee Lay. 2018.** Molecular basis of  $\beta$  thalassemia and potential therapeutic targets. *Blood cells, molecules & diseases*. PMID: 28651846. 5 2018, pp. 1-12.
- Thompson, A. A., Walters, M. C., Kwiatkowski, J., Rasko, J., Ribeil, J. A., Hongeng, S., Magrin, E., Schiller, G. J., Payen, E., Semeraro, M., Moshous, D., Lefrere, F., Puy, H., Bourget, P., Magnani, A., Caccavelli, L., Diana, J. S., Suarez, F., Monpoux, 2018.** Gene Therapy in Patients with Transfusion-Dependent  $\beta$ -Thalassemia. *The New England journal of medicine*. PMID: 29669226. 4 9, 2018, p. 1479.
- Ullah, K., Khan, B., Raza, S., Ahmed, P., Satti, T. M., Butt, T., Tariq, W. Z., & Kamal, M. K. 2008.** Bone marrow transplant cure for beta-thalassaemia major: initial experience from a developing country. *Annals of hematology*. PMID: 18458905. 8 2008, p. 1.
- UNHCR. 2018.** United Nations High Commissioner for Refugees. *Global trends: forced displacement in 2017*. [Online] 2018. [Cited: 3 20, 2022.] <https://www.unhcr.org/globaltrends2017/?m sclid=90a0c0b1a86c11ecaeb3732cf12b4d35>.
- Voskaridou, E., Ladis, V., Kattamis, A., Hassapopoulou, E., Economou, M., Kourakli, A., 2012.** A national registry of haemoglobinopathies in Greece: deducted demographics, trends in mortality and affected births. *Annals of hematology*. PMID: 22526366. 9, 4 19, 2012, p. 1452.
- Weatherall, David J. 2008.** Genetic variation and susceptibility to infection: the red cell and malaria. *British journal of haematology*. PMID: 18410566. 5 2008, pp. 276-283.
- Weathrerall, David J. 2010.** The inherited diseases of hemoglobin are an emerging global health burden. *Blood*. PMID: 20233970. 6 3, 2010, p. 4331.
- Weidlich, D., Kefalas, P., & Guest, J. F. 2016.** Healthcare costs and outcomes of managing  $\beta$ -thalassemia major over 50 years in the United Kingdom. *Transfusion*. PMID: 27041389. 5 2016, p. 1038.
- WHO. 2022.** HIV/AIDS. *The global health organization*. [Online] 2022. [Cited: 4 2, 2022.] <https://www.who.int/data/gho/data/themes/hiv-aids>.
- . **2021.** World Health Organization. *Malaria Fact sheet No94*. [Online] 12 6, 2021. [Cited: 3 22, 2022.] <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/malaria>.
- Yannaki, E., Karponi, G., Zervou, F., Constantinou, V., Bouinta, A., Tachynopoulou, V., Kotta, K., Jonlin, E., Papayannopoulou, T., Anagnostopoulos, A., & Stamatoyannopoulos, G. 2013.** Hematopoietic stem cell mobilization for gene therapy: superior mobilization by the combination of granulocyte-colony stimulating factor plus plerixafor in patients with  $\beta$ -thalassemia major. *Human gene therapy*. PMID: 24001178. 10 2013, pp. 853-855.



—. **2013**. Hematopoietic stem cell mobilization for gene therapy: superior mobilization by the combination of granulocyte-colony stimulating factor plus plerixafor in patients with  $\beta$ -thalassemia major. *Human gene therapy*. PMID: 24001178. 10 2013, p. 852.

**Zurlo, M. G., De Stefano, P., Borgna-Pignatti, C., Di Palma, A., Piga, A., Melevendi, C., Di Gregorio, F., Burattini, M. G., & Terzoli, S. 1989**. Survival and causes of death in thalassaemia major. *Lancet (London, England)*. PMID: 2567801. 7 1, 1989, p. 27.

**ΕΟΔΥ. 2020**. Παγκόσμια Ημέρα Αιμοδοτών. *Δελτίο Τύπου Εθνικού Οργανισμού Υγείας*. [Online] 6 14, 2020. [Cited: 5 22, 2021.] [https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2020/06/%CE%94%CE%95%CE%9B%CE%A4%CE%99%CE%9F-%CE%A4%CE%A5%CE%A0%CE%9F%CE%A5-%CE%95%CE%9F%CE%94%CE%A5\\_14-06-2020\\_%CE%A0%CE%B1%CE%B3%CE%BA%CF%8C%CF%83%CE%BC%CE%B9%CE%B1-%CE%97%CE%BC%CE%AD%CF%81%CE%B1-%CE%91%CE%B9%CE%B](https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2020/06/%CE%94%CE%95%CE%9B%CE%A4%CE%99%CE%9F-%CE%A4%CE%A5%CE%A0%CE%9F%CE%A5-%CE%95%CE%9F%CE%94%CE%A5_14-06-2020_%CE%A0%CE%B1%CE%B3%CE%BA%CF%8C%CF%83%CE%BC%CE%B9%CE%B1-%CE%97%CE%BC%CE%AD%CF%81%CE%B1-%CE%91%CE%B9%CE%B).

**Λουκόπουλος, Δ. 2015**. ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΕΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΤΗΣ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ. [bookauth.] Δ., Μαριάννα, Π. Λουκόπουλος. *Μαθήματα αιματολογίας [Προπτυχιακό εγχειρίδιο]*. Αθήνα : Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις. κεφ 4. <http://hdl.handle.net/11419/3091>, 2015, p. 69.

**Λουκόπουλος, Δ. 2015**. ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΕΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΤΗΣ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ. [bookauth.] Δ., Μαριάννα, Π. Λουκόπουλος. *Μαθήματα αιματολογίας, κεφ. 4* . Αθήνα : Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις. κεφ 4. <http://hdl.handle.net/11419/3091>., 2015, p. 71.

**Λουκόπουλος, Δημήτρης. 2015**. *Κληρονομικές παθήσεις της αιμοσφαιρίνης, θαλασσαιμία δρεπανοκυτταρική αναιμία, παραλλαγές αιμοσφαιρίνης*. Αθήνα : Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις. κεφ 4. <http://hdl.handle.net/11419/3091>, σελ. 67, 2015.

**Μπαμπινιώτης, Γεώργιος. 2002**. *Λεξικό της Νέας ελληνικής Γλώσσας (2 έκδοση)*. ISBN 9789608619012 (σελ. 1041). Αθήνα : Κέντρο Λεξικολογίας, 2002.

## Πηγές Εικόνων

**Εικόνα 1.** [Genes and bases on chromosomes - Αρχείο:Genes and base pairs on chromosomes.svg - Βικιπαίδεια \(wikipedia.org\)](#)

**Εικόνα2.** [vector-science-medical-icon-blood-260nw-1475525873.jpg\(260x280\)\(shutterstock.com\)](#)

**Εικόνα 3.** Farashi, S., & Hartevelde, C. L. (2018). Molecular basis of  $\alpha$ -thalassemia. *Blood cells, molecules & diseases*, σελ. 44. PMID: 29032940

**Εικόνα 4.** Μεσογειακή Αναιμία – Ελληνικός Σύλλογος Θαλασσαιμίας (estha.gr)

**Εικόνα 5.** Cavazzana, M., Antoniani, C., & Miccio, A. (2017). Gene Therapy for  $\beta$ -Hemoglobinopathies. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, σελ. 1143. PMID: 28377044.

**Εικόνα 6.** Bulcha, J. T., Wang, Y., Ma, H., Tai, P., & Gao, G. (2021). Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Signal transduction and targeted therapy*. σελ. 2. PMID: 33558455.

**Εικόνα 7.** Cavazzana, M., Antoniani, C., & Miccio, A. (2017). Gene Therapy for  $\beta$ -Hemoglobinopathies. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, σελ. 1148. PMID: 28377044.

**Εικόνα 8.** Bulcha, J. T., Wang, Y., Ma, H., Tai, P., & Gao, G. (2021). Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Signal transduction and targeted therapy*. σελ. 16. PMID: 33558455.

**Εικόνα 9.** Cavazzana, M., Antoniani, C., & Miccio, A. (2017). Gene Therapy for  $\beta$ -Hemoglobinopathies. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, σελ. 1146. PMID: 28377044.

**Εικόνα 10.** Park, S. H., & Bao, G. (2021). CRISPR/Cas9 gene editing for curing sickle cell disease. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis*. PMID: 33455878