



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

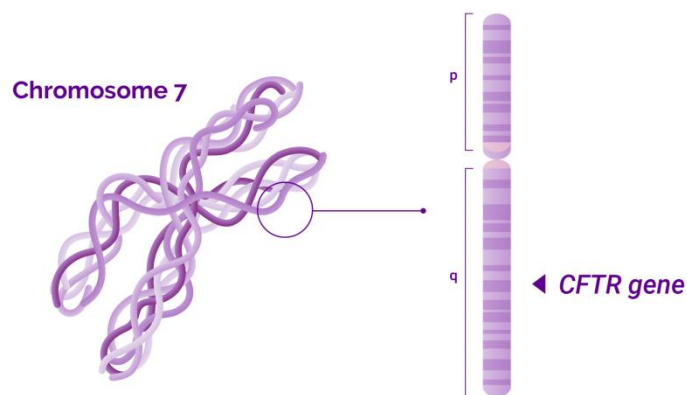


ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

## Κυστική ίνωση, μετάλλαξη CFTR, θεραπευτική αντιμετώπιση και νεότερα δεδομένα

POST GRADUATE THESIS

### Cystic fibrosis, CFTR mutation, treatment and latest data



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/NAME OF STUDENT

**Δομνίκη Ιωάννα Ευτυχίδου**

Domniki Ioanna Eftychidou

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

**Πέτρος Καρκαλούσος**

Petros Karkalousos

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2022



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



POST GRADUATE THESIS

## **Cystic fibrosis, CFTR mutation, treatment and latest data**

Domniki Ioanna Eftychidou  
dml20006

FIRST SUPERVISOR  
Petros Karkalousos

SECOND SUPERVISOR  
Maria Trapali

THIRD SUPERVISOR  
Anastasios Kriebardis

AIGALEO 2022

## Επιτροπή εξέτασης

Ημερομηνία εξέτασης: 08/07/2022

### Ονόματα εξεταστών

1<sup>ος</sup> Εξεταστής Πέτρος  
Καρκαλούσος

2<sup>ος</sup> Εξεταστής Μαρία  
Τράπαλη

## **Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας**

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Δομνίκη Ιωάννα Ευτυχίδου του Αβραάμ, με αριθμό μητρώου dml20006 φοιτήτρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Βοϊατρικές μέθοδοι και Τεχνολογία στη Διάγνωση του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

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

Η Δηλούσα

Δομνίκη Ιωάννα Ευτυχίδου



## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους επιβλέποντες καθηγητές μου, κ. Πέτρο Καρκαλούσο και κ. Μαρία Τράπαλη για τη βοήθεια και τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσαν για εμένα για την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας.

Επίσης οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου, που με βοήθησε να υλοποιήσω αυτό το μεταπτυχιακό.



## Περίληψη

Η κυστική ίνωση είναι μια γενετική ασθένεια που κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο και στο δυτικό κόσμο η διάγνυσή της επιτυγχάνεται με screening test στα νεογνά. Έχουν περάσει περισσότερα από 30 χρόνια αφότου ανακαλύφθηκε το γονίδιο CFTR και έχουν επιτευχθεί πολυάριθμα ορόσημα στην πειραματική και κλινική έρευνα για την κυστική ίνωση κατά τη διάρκεια της περιόδου αυτής. Η κατανόηση της κυτταρικής και μοριακής βάσης της νόσου έχει ανοίξει το δρόμο για την ανάπτυξη θεραπευτικών στρατηγικών στοχεύοντας στις υποκείμενες δυσλειτουργίες που προκαλούνται από διάφορες μεταλλάξεις του γονιδίου.

Η χρήση ικών και μη ικών φορέων, τα αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια, τα βλαστοκύτταρα αλλά και η πρώτη κλινική δοκιμή γονιδιακής θεραπείας για την κυστική ίνωση που έδειξε σημαντικό όφελος για τη λειτουργία των πνευμόνων, προσφέρει ελπίδα στους ασθενείς για μια αποτελεσματική θεραπεία η οποία θα είναι κλινικά διαθέσιμη κάποια στιγμή στο κοντινό μέλλον. Επιπλέον η γονιδιακή θεραπεία έχει ενισχυθεί περαιτέρω και από την καθιέρωση νέων τεχνολογιών επεξεργασίας γονιδίων όπως είναι το CRISPR/Cas9, το οποίο μέσω κλινικών δοκιμών έχει συμπεριληφθεί στην κατηγορία των θεραπευτικών μεθόδων. Η γονιδιακή θεραπεία είναι σε θέση να αποκαταστήσει τις δυσλειτουργίες της πρωτεΐνης CFTR, αλλά αν και η απλότητα της ιδέας αυτής που είναι η αντικατάσταση του παθολογικού γονιδίου με το αντίστοιχο υγιές φαίνεται εύκολη, παρ' όλα αυτά παρουσιάζει τεχνικά εμπόδια που παραμένουν ακόμη άλυτα.

Το ερευνητικό πεδίο παραμένει αρκετά δραστήριο, προσφέροντας ελπίδα για περαιτέρω νέες, καινοτόμες θεραπείες που θα είναι διαθέσιμες στο εγγύς μέλλον με ακόμα μεγαλύτερες δυνατότητες. Τα ενθαρρυντικά νέα όμως είναι πως η κυστική ίνωση έχει μεταμορφωθεί από μία ανίατη ασθένεια σε μια ασθένεια που πλέον πλησιάζει στο να είναι ιάσιμη.



## **Abstract**

Cystic fibrosis is a genetic disease that is inherited in an autosomal recessive manner and in the western world its diagnosis is achieved by screening test in newborns. It has been more than 30 years since the CFTR gene was discovered and numerous milestones have been reached in experimental and clinical research on cystic fibrosis during this period. Understanding the cellular and molecular basis of the disease has paved the way for the development of therapeutic strategies targeting the underlying dysfunctions caused by various gene mutations.

The use of viral and non-viral vectors, antisense oligonucleotides, stem cells and the first clinical trial of gene therapy for cystic fibrosis that showed significant benefit for lung function, offers patients hope for an effective treatment that will be clinically available at some point in the near future. In addition, gene therapy has been further enhanced by the introduction of new gene processing technologies such as CRISPR / Cas9, which through clinical trials has been included in the category of therapeutic methods. Gene therapy is able to repair the dysfunctions of the CFTR protein, but while the simplicity of the idea of replacing the abnormal gene with the corresponding healthy one seems easy, it still presents technical obstacles that remain unresolved.

The research field remains quite active, offering hope for further new, innovative treatments that will be available in the near future with even greater potential. The encouraging news, however, is that cystic fibrosis has transformed from an incurable disease to a curable disease.

## Περιεχόμενα

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας.....	iv
Ευχαριστίες .....	vi
Περίληψη .....	viii
<b>Abstract</b> .....	ix
<b>Πρόλογος</b> .....	1
<b>Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή στην κυστική ίνωση</b> .....	3
1.1 Ορισμός .....	3
1.2 Ιστορική αναδρομή .....	3
1.3 Κληρονομικότητα .....	4
1.4 Παθογένεια.....	5
1.4.1 Πνεύμονες .....	6
1.4.2 Πάγκρεας.....	8
1.4.3 Ήπαρ .....	9
1.5 Διάγνωση .....	10
1.6 Επιδημιολογία .....	12
1.7 Προσδόκιμο ζωής.....	13
1.8 Διατροφή και υγεία .....	14
<b>Κεφάλαιο 2: CFTR</b> .....	16
2.1 Γονίδιο και πρωτεΐνη CFTR.....	16
2.2 Επίδραση σε άλλους διαύλους .....	17
2.3 Φωσφορυλίωση .....	19
2.4 Ομαδοποίηση μεταλλάξεων .....	22
<b>Κεφάλαιο 3: Θεραπευτική αντιμετώπιση</b> .....	26
3.1 Φυσικοθεραπεία .....	26
3.2 Μεταμόσχευση.....	27
3.3 Αντιβιοτικά και αντιφλεγμονώδη .....	29
3.4 Φαρμακομόρια και αναφορά σε κλινικές μελέτες .....	32
3.4.1 Κόστος θεραπείας .....	38
3.4.2 Επίδρασεις των διαμορφωτών στο μικροβίωμα .....	39
<b>Κεφάλαιο 4: Νεότερα δεδομένα στη θεραπεία της κυστικής ίνωσης</b> .....	41
4.1 Ιικοί και μη ιικοί φορείς .....	41
4.2 Αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια (ASO) .....	44

4.3 Gene editing .....	46
4.3.1 CRISPR/Cas9.....	47
4.3.2 Βλαστοκύτταρα .....	48
4.3.3 Επιγενετική .....	50
<b>Συμπεράσματα .....</b>	<b>54</b>
<b>Αναφορές.....</b>	<b>56</b>
<b>Πηγές Εικόνων .....</b>	<b>60</b>

## Πρόλογος

Η κυστική ίνωση είναι μία κοινή αυτοσωμική υπολειπόμενη γενετική διαταραχή που περιορίζει σημαντικά τη ζωή του ασθενούς. Είναι μια ασθένεια που εμφανίζεται σε μεγάλο ποσοστό στην Ευρώπη, στη Βόρειο Αμερική και στην Αυστραλία. Η ασθένεια αυτή προκαλείται από τη μετάλλαξη του γονιδίου CFTR, ένα γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ρυθμιστή διαμεμβρανικής αγωγιμότητας, η οποία ρυθμίζει τη μεταφορά ιόντων χλωρίου εντός και εκτός του κυττάρου και τον καθαρισμό του βλεννογόνου των αεραγωγών από τη βλέννα που παράγεται.

Η κυστική ίνωση επηρεάζει διάφορα όργανα του ανθρώπινου οργανισμού όπως τους πνεύμονες, το πάγκρεας, το συκώτι, τους ιδρωτοποιούς αδένες και το αναπαραγωγικό σύστημα (Elborn, 2016).

Υπάρχουν πάνω από 2000 γνωστές μεταλλάξεις στο εν λόγω γονίδιο, παρ' όλα αυτά λιγότερες από 150 είναι γνωστό ότι προκαλούν αυτήν την ασθένεια. Αν και επηρεάζει ένα πλήθος οργάνων, το πιο σημαντικό είναι οι πνεύμονες. Λόγω της δυσλειτουργίας της πρωτεΐνης CFTR τα ιόντα χλωρίου δε μπορούν να μεταφερθούν στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων με αποτέλεσμα τη συσσώρευση παχιάς βλέννας στους αεραγωγούς και την ευκολότερη τάση για βακτηριακές λοιμώξεις (Ratjen, et al., 2015).

Κάποτε, η κυστική ίνωση θεωρούνταν θανατηφόρα στην παιδική ηλικία, πλέον όμως οι περισσότεροι ασθενείς φθάνουν μέχρι την ενηλικίωση. Η συχνότητα εμφάνισης είναι 1/3500 παιδιά που γεννιούνται. Σε πολλές χώρες έχουν καθιερωθεί screening tests για τα νεογέννητα έτσι ώστε να προλαβαίνουν και να αντιμετωπίζουν την ασθένεια εγκαίρως. Το πιο διαδεδομένο τεστ που γίνεται στα νεογνά είναι αυτό του ιδρώτα, στο οποίο η διάγνωση θεωρείται θετική εάν η συγκέντρωση ιόντων χλωρίου είναι πάνω από 60mmol/L (De Boeck, 2020).

Με την εξέλιξη της επιστήμης έχει βελτιωθεί σημαντικά η ποιότητα ζωής των ασθενών με κυστική ίνωση χάρη στην έγκαιρη διάγνωση και τη θεραπευτική αντιμετώπιση των συμπτωμάτων με φάρμακα, ρυθμιστές της δυσλειτουργικής CFTR πρωτεΐνης. Αυτά τα φάρμακα έχουν την ικανότητα να αποκαθιστούν τη βλάβη και έτσι να εκφράζεται σωστά η πρωτεΐνη (Pacheco, 2020).

Η πιο κοινή μετάλλαξη του γονιδίου CFTR είναι η F508del για την οποία έχει γίνει συστηματική μελέτη και πλέον οι ερευνητές έχουν καταφέρει να αντιμετωπίσουν επι-

τυχώς τη δυσλειτουργία των πνευμόνων με την παραγωγή των φαρμάκων ivacaftor, elxacaftor και tezacaftor, τα οποία έχουν πάρει έγκριση από τον FDA για την χορήγησή τους σε ασθενείς άνω των 12 ετών με τη συγκεκριμένη μετάλλαξη στο γονίδιό τους (Hoy, 2019).

Για πάνω από 7 δεκαετίες οι θεραπείες για την κυστική ίνωση στόχευαν αποκλειστικά στην ανακούφιση των συμπτωμάτων και όχι στην προέλευση του προβλήματος που οφειλόταν στο μεταλλαγμένο γονίδιο. Με τη βοήθεια της γονιδιακής θεραπείας και της τεχνικής CRISPR, γίνεται το επόμενο βήμα στην αντιμετώπιση της κυστικής ίνωσης. Προς το παρόν έχουν γίνει επιτυχημένες προσπάθειες της τεχνικής αυτής σε ανθρώπινα βλαστοκύτταρα και το μέλλον προβλέπεται ελπιδοφόρο, καθώς έτσι ανοίγει ο δρόμος για τη θεραπεία διαφόρων γενετικών διαταραχών αλλά και την πρόληψή τους (Maule, et al., 2020).

# Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή στην κυστική ίνωση

## 1.1 Ορισμός

Η κυστική ίνωση είναι μια αυτοσωμική υπολειπόμενη γενετική διαταραχή που οφείλεται σε μεταλλάξεις στο γονίδιο ρυθμιστή της διαμεμβρανικής αγωγιμότητας της κυστικής ίνωσης, το γονίδιο CFTR. Μέχρι τώρα έχουν ανακαλυφθεί περίπου 2500 μεταλλάξεις του γονιδίου αυτού, όμως λιγότερες από 150 είναι γνωστό ότι προκαλούν την ασθένεια αυτή. Ο φαινότυπος της κυστικής ίνωσης χαρακτηρίζεται κυρίως από παθήσεις των πνευμόνων, δυσλειτουργία του παγκρέατος που έχει ως αποτέλεσμα γαστρεντερική δυσπορρόφηση, στομαχικές διαταραχές, μειωμένη ανάπτυξη και μια σειρά από άλλες δυσλειτουργίες όπως ιγμορίτιδα και διαβήτη.

Η κύρια λειτουργία της πρωτεΐνης CFTR ως κανάλι μεταφοράς ιόντων χλωρίου μεταξύ της μεμβράνης των επιθηλιακών κυττάρων προς όλο το σώμα, έχει και άλλες λειτουργίες όπως έκκριση διττανθρακικών και αναστολή της μεταφοράς νατρίου. Οι μεταλλάξεις του CFTR ταξινομούνται σε διάφορες τάξεις οι οποίες καθορίζουν το μέγεθος των δυσλειτουργιών. Αυτές που δεν εκφράζουν το γονίδιο στην επιφάνεια των κυττάρων ή χάνουν τη λειτουργικότητα του γονιδίου είναι οι πιο σημαντικές και συνδέονται με σοβαρές παθήσεις των πνευμόνων και παγκρεατική δυσλειτουργία (Bell, et al., 2015).

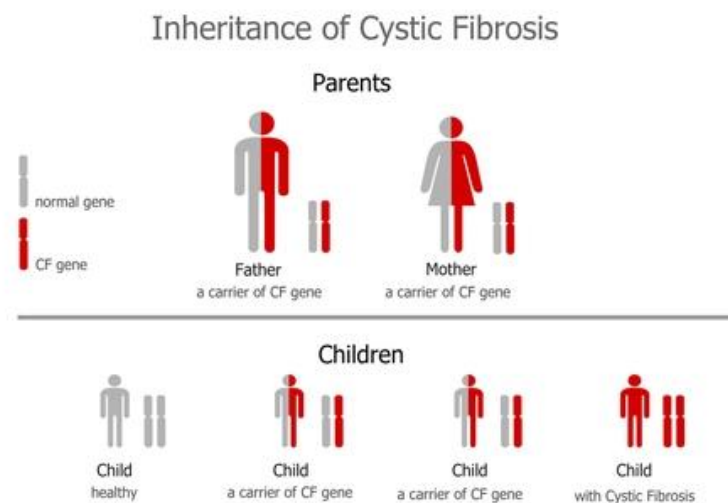
## 1.2 Ιστορική αναδρομή

Η πρώτη αναφορά που μάλλον συνδέεται με την κυστική ίνωση είχε γίνει το 1595 όπου οι άνθρωποι τότε παρατήρησαν ότι το δέρμα κάποιων νεογνών ήταν ιδιαίτερα αλμυρό όταν τα φιλούσαν και οι «σοφοί γέροντες» εκείνης της εποχής χαρακτήριζαν τα παιδιά αυτά μαγεμένα και ότι σύντομα θα έπρεπε να πεθάνουν. Από τον 17<sup>ο</sup> αιώνα υπήρχαν περιγραφές για πρόωρους θανάτους σε παιδιά τα οποία είχαν υψηλή συγκέντρωση άλατος στον ιδρώτα τους, όμως η ασθένεια της κυστικής ίνωσης περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1938 από την Dorothy H. Andersen (Bergeron & Cantin, n.d.). Το 1938 σε μελέτη της παρατήρησε την ασθένεια αυτή στο πάγκρεας σε 49 ασθενείς και η διαταραχή αυτή συνδέθηκε με την λοίμωξη των πνευμόνων και την απώλεια άλατος από τον ιδρώτα κατά τη διάρκεια ενός καύσωνα στη Νέα Υόρκη (Elborn, 2016). Δέκα χρόνια αργότερα, το 1948, ο Paul di Sant'Agnese περιέγραψε για πρώτη φορά την παθολογική μεταφορά ιόντων χλωρίου και παρατήρησε διαταραχές στη σύσταση του ιδρώτα μετά από το κύμα

καύσωνα στη Νέα Υόρκη που προκάλεσε θερμοπληξία σε πολλούς ασθενείς της Andersen. Έκτοτε η διερεύνηση της παθοφυσιολογίας της κυστικής ίνωσης έχει κάνει μεγάλη πρόοδο, ιδίως με την ανακάλυψη του γονιδίου CFTR από τους Lap-Chess Tsui, John R. Riordan και Francis Collins το 1989 στο Τορόντο. Μετά από πολλές δεκαετίες ερευνών είναι πλέον γνωστό ότι η απουσία ή η μη φυσιολογική λειτουργία του γονιδίου CFTR έχει ως αποτέλεσμα την έλλειψη ή τη δημιουργία μιας μη λειτουργικής πρωτεΐνης, η οποία προκαλεί βλάβες σε διάφορα όργανα όπως οι πνεύμονες, το πάγκρεας, το γαστρεντερικό σύστημα, το συκώτι και το αναπαραγωγικό σύστημα (Bergeron & Cantin, n.d.).

### 1.3 Κληρονομικότητα

Η κυστική ίνωση κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο με ποσοστό φορέων 4% στο γενικό πληθυσμό. Επειδή οι φορείς είναι συνήθως φαινοτυπικά υγιείς, αυτός ο υψηλός επιπολασμός υποδηλώνει ένα δυνητικό πλεονέκτημα επιβίωσης που παρέχεται με το να είναι κάποιος ετερόζυγος.



Εικόνα 1: Κληρονομικότητα κυστικής ίνωσης.

Συνήθως ένα άτομο που πάσχει από την ασθένεια αυτή κληρονομεί ένα μεταλλαγμένο γονίδιο από κάθε γονέα. Έτσι αδέρφια πρώτου βαθμού έχουν δύο τρίτα πιθανότητα να είναι φορείς, ενώ του δευτέρου και τρίτου βαθμού συγγενείς έχουν 50% και 25% πιθανότητα να είναι φορείς αντίστοιχα. Οι γονείς φορείς έχουν 25% πιθανότητα να

γεννήσουν παιδιά ετερόζυγα για την κυστική ίνωση εάν ο άλλος γονέας δε φέρει κάποιο μεταλλαγμένο γονίδιο. Η μονογονεϊκή δισωμία (κληρονόμηση και των δύο αντιγράφων ενός χρωμοσώματος από τον έναν γονέα) είναι σπάνια και πρέπει να ανιχνευθεί διαγνωστικά εάν το παιδί έχει καθυστέρηση στην ανάπτυξη (Lommatzsch & Aris, 2009).

#### 1.4 Παθογένεια

Ο ρυθμιστής διαμεμβρανικής αγωγιμότητας CFTR είναι ελαττωματικός στην κυστική ίνωση. Η πρωτεΐνη που παράγεται είναι ένας διάυλος ο οποίος επικάθεται στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων και μεταφέρει ιόντα χλωρίου και άλλα μόρια όπως τα διτανθρακικά. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την CFTR πρωτεΐνη εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 7. Διάφορες μεταλλάξεις του γονιδίου αυτού οδηγούν στην ασθένεια της κυστικής ίνωσης. Από την ανακάλυψη του γονιδίου μέχρι και σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 2.500 μεταλλάξεις (Anon., n.d.).

Ύστερα από πολλές μελέτες άρχισε σιγά σιγά να γίνεται κατανοητό πως η κυστική ίνωση είναι μια διαταραχή που προκαλείται από τη συσσώρευση μιας ασυνήθιστης παχιάς και κολλώδους βλέννας η οποία αποφράσσει τους πόρους των αδένων των προσβαλλόμενων οργάνων, του παγκρέατος, των πνευμόνων, του γαστρεντερικού και αναπαραγωγικού συστήματος. Αυτή η παχιά βλέννα συνδέθηκε με διάφορες επιπλοκές όπως παγκρεατική ανεπάρκεια, πέτρες στη χολή, ειλεό, υπογονιμότητα, ιγμορίτιδα και βρογχεκτασίες. Παρ' όλα αυτά οι ερευνητές δεν μπορούσαν να εξηγήσουν το λόγο που οι ασθενείς εμφάνιζαν μεγάλες συγκεντρώσεις άλατος στον ιδρώτα τους και αυτό ήταν το έναυσμα για να ερευνηθούν και να κατανοήσουν σε βάθος την παθοφυσιολογία της κυστικής ίνωσης.

Η πρώτη απόπειρα εξήγησης για την παθολογική μεταφορά ιόντων στους αεραγωγούς έγινε από τους Knowles et al, οι οποίοι διαπίστωσαν ότι η ηλεκτραρνητική διαφορά στο ρινικό επιθήλιο των ασθενών με κυστική ίνωση είναι σημαντικά μεγαλύτερη απ' ότι στα φυσιολογικά άτομα. Αυτή η αρνητική διαφορά δυναμικού στους αεραγωγούς οφειλόταν στην αυξημένη απορρόφηση νατρίου από τα υγρά των αεραγωγών στον αυλό, έχοντας σαν αποτέλεσμα την αφυδάτωση η οποία δημιουργούσε αυτή την παχύρρευστη βλέννα. Αργότερα βέβαια αποδείχτηκε ότι η αυξημένη αρνητική διαφορά δυναμικού οφειλόταν στην αδιαπερατότητα των ιόντων χλωρίου και όχι στην αυξημένη απορρόφηση νατρίου. Πλέον είναι γνωστό ότι η πρωτεΐνη CFTR επηρεάζει και άλλους διαύλο-



υς ιόντων όπως τους επιθηλιακούς διαύλους νατρίου, στους οποίους επιδρά με ανασταλτικό αποτέλεσμα, δημιουργώντας έτσι μειωμένα επίπεδα απορρόφησης νατρίου.

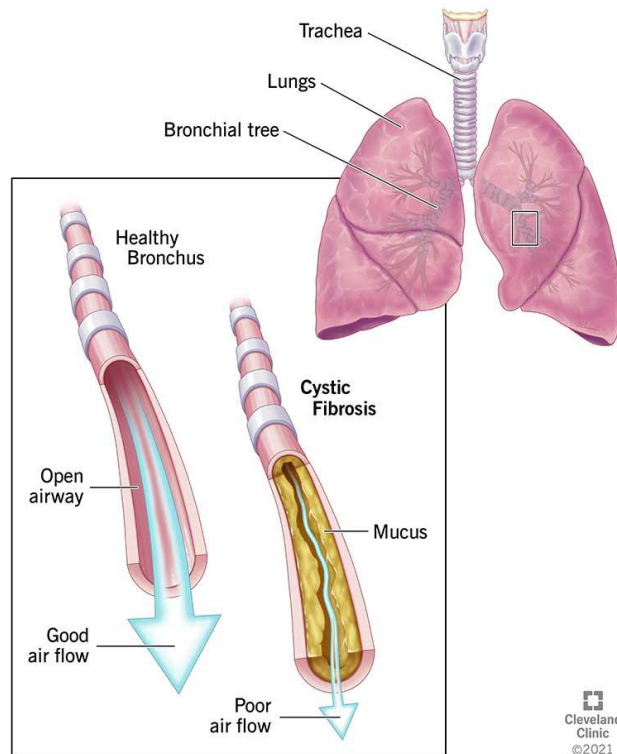
Η αδιαπερατότητα των ιόντων χλωρίου ήταν ο λόγος της μειωμένης επαναρρόφησης χλωριούχου νατρίου στους ιδρωτοποιούς αδένες και αυξημένης συγκέντρωσης αλάτων στον ιδρώτα των ασθενών με κυστική ίνωση (Bergeron & Cantin, n.d.).

Δημιουργείται ένας φαύλος κύκλος συσσώρευσης βλέννας στους αεραγωγούς, που οδηγεί σε χρόνια φλεγμονή ενώ οι επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις προκαλούν βλάβη των επιθηλίων, καταστροφή του ιστού και προοδευτική δυσλειτουργία των πνευμόνων, με τελικό αποτέλεσμα την αναπνευστική ανεπάρκεια (Pacheco, 2020).

Η πρωτεΐνη CFTR παίζει καθοριστικό ρόλο σε διάφορα όργανα όπως ο υποθάλαμος, τα νεφρά και τα οστά όπου μια δυσλειτουργία της πρωτεΐνης αυτής μπορεί να επιφέρει καθυστέρηση στην ανάπτυξη, καθυστέρηση της έναρξης της εφηβείας, διαταραχές στην πυκνότητα των οστών και ευαισθησία ως προς τη δημιουργία πέτρας στα νεφρά, παθήσεις που μέχρι πρόσφατα θεωρούνταν δευτερεύουσες σε σύγκριση με την αναπνευστική δυσλειτουργία και τις γαστρεντερικές διαταραχές που προκαλεί η κυστική ίνωση (Castellani & Assael, 2016).

#### 1.4.1 Πνεύμονες

Η ασθένεια αυτή προκαλείται από μετάλλαξη στον ρυθμιστή διαμεμβρανικής αγωγιμότητας του γονιδίου της κυστικής ίνωσης που ονομάζεται CFTR. Η πρωτεΐνη CFTR που παράγεται από αυτό το γονίδιο ρυθμίζει την κίνηση των ιόντων χλωρίου και νατρίου κατά μήκος της μεμβράνης των επιθηλιακών κυττάρων. Όταν συμβεί μια μετάλλαξη σε ένα ή σε δύο αντίγραφα του γονιδίου, η μεταφορά των ιόντων δε γίνεται σωστά και έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας παχιάς βλέννας, οδηγώντας σε αναπνευστική ανεπάρκεια και διάφορες άλλες δυσλειτουργίες. Ο συνδυασμός μη αποδοτικού καθαρισμού της βλέννας από τους αεραγωγούς και η δυσλειτουργική μεταφορά ιόντων έχει ως αποτέλεσμα να επιτρέπει τον αποικισμό βακτηρίων στο αναπνευστικό σύστημα, όπως *Pseudomonas*, *Haemophilus influenzae*, και *Staphylococcus aureus*. Αυτά τα παθογόνα προκαλούν σοβαρές λοιμώξεις του αναπνευστικού, με κατάληξη τη χρόνια λοίμωξη και φλεγμονή που οδηγεί σε σταδιακή καταστροφή των πνευμόνων (Brown, et al., 2017).



Εικόνα 2: Υγιής και παθολογικός βρόγχος

Ο αποτελεσματικός καθαρισμός του βλεννογόνου των αεραγωγών είναι ουσι-  
αστικός για την υγεία του αναπνευστικού συστήματος. Ο βλεννογόνος των αεραγωγών  
αποτελείται από ψευδοπολύστιβο κροσσωτό επιθήλιο, όπου τα επιφανειακά κύτταρα  
του εμφανίζουν πολυάριθμους κροσσούς (Whitsett, 2018) . Δύο είναι οι κύριες λειτουρ-  
γίες της βλέννας των αεραγωγών, να απομακρύνει τα παθογόνα μέσω του κροσσωτού  
επιθηλίου στην επιφάνεια του βλεννογόνου και να παρέχει έναν προστατευτικό φραγμό  
στους τοξικούς ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες (Cantin, et al., 2015). Η ορθή λειτο-  
υργία του βλεννογόνου εξαρτάται από τη σωστή ενυδάτωση του υγρού της επιφάνειας  
των αεραγωγών. Ο καθαρισμός του βλεννογόνου μπορεί να επηρεαστεί από ανωμαλίες  
στην κίνηση των κροσσών ή από αλλαγές στη σύνθεση της βλέννας. Στα υγιή άτομα τα  
επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού εκκρίνουν ή απορροφούν ιόντα και νερό, διατη-  
ρώντας έτσι σωστά ενυδατωμένη την επιφάνεια του βλεννογόνου. Όσο υψηλότερη είναι  
η οσμωτική πίεση στους κροσσούς στα υγιή άτομα τόσο καλύτερα εξασφαλίζεται η ε-  
παρκής ενυδάτωση, παρέχοντας έτσι ικανοποιητική λίπανση για την εύρυθμη κινητικό-  
τητα του κροσσωτού επιθηλίου και την μεταφορά της υπερκείμενης βλέννας. Ένα καλά

ενυδατωμένο στρώμα βλέννας μπορεί να μεταφερθεί γρήγορα από τους άνω αεραγωγούς προς την τραχεία.

Η μη φυσιολογική συγκέντρωση βλέννας στους πνεύμονες των ασθενών με κυστική ίνωση αποτελεί την αρχική δυσλειτουργία του αναπνευστικού επιθηλίου που είναι υπεύθυνο για την ανταλλαγή ιόντων και νερού. Στην κυστική ίνωση, το επιθήλιο των αεραγωγών παρέχει μειωμένη απορρόφηση υγρών με αποτέλεσμα την μειωμένη έκκριση χλωριούχων και διττανθρακικών ιόντων που ελέγχονται από την δυσλειτουργική πρωτεΐνη CFTR. Αυτή η μη φυσιολογική απορρόφηση υγρών από το επιθήλιο αυξάνει την οσμωτική πίεση στο στρώμα της βλέννας, οδηγώντας σε αυξημένη συγκέντρωση βλέννας, διαταραγμένη μεταφορά αυτής και προσκόλλησή της στην επιφάνεια των αεραγωγών, λόγω αφυδάτωσης.

Αύξηση της έκκρισης της βλεννίνης (ένα βασικό συστατικό της βλέννας του αεραγωγού) παρατηρείται από τον σχηματισμό της ενδοβρογχικής βλεννώδους πλάκας, η οποία οδηγεί σε χρόνια φλεγμονή των πνευμόνων. Η παρεμπόδιση της εισαγωγής αέρα στους πνεύμονες και οι συχνές βακτηριακές λοιμώξεις είναι κοινό χαρακτηριστικό της κυστικής ίνωσης. Η ενδοβρογχική λοίμωξη πυροδοτεί αναποτελεσματική φλεγμονώδη αντίδραση που χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα του ενζύμου ουδετερόφιλης ελαστάσης που συμβάλλει στη συγκέντρωση παχιάς και κολλώδους βλέννας σε μεγάλες ποσότητες. Ένας φαύλος κύκλος από λοιμώξεις και φλεγμονές πυροδοτείται, οδηγώντας σε σταδιακή καταστροφή των πνευμόνων με αποτέλεσμα την ανάπτυξη βρογχεκτασιών. Αυτά τα χαρακτηριστικά ανιχνεύονται στο 30% των παιδιών με κυστική ίνωση από την ηλικία των τριών μηνών και φτάνουν στο 60% στην ηλικία των τριών ετών (Turcios, 2019).

#### 1.4.2 Πάγκρεας

Αν και η κυστική ίνωση αρχικά θεωρούνταν ασθένεια των πνευμόνων, αργότερα αναγνωρίστηκε ως αιτία μη φυσιολογικής ανάπτυξης των παιδιών. Ενώ αρχικά συνέδεσαν την κυστική ίνωση με την κουλιοκάκη, η Dorothy Andersen ήταν αυτή που πρώτη την ξεχώρισε το 1938 από μια αυτοψία σε πάγκρεας όπου και διαπίστωσε μια θανατηφόρου μορφής δυσαπορρόφηση και ένα μη φυσιολογικό πάγκρεας. Η παγκρεατική ανεπάρκεια είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα της κυστικής ίνωσης και διαχωρίζεται σε δύο μορφές, την παγκρεατική ανεπάρκεια (ΠΑ) και την παγκρεατική επάρκεια (ΠΕ), ανάλογα εάν ο ασθε-

νής έχει αρκετή παγκρεατική λειτουργία έτσι ώστε να αναπτυχθεί φυσιολογικά και να παραμείνει υγιής χωρίς τη χορήγηση θεραπείας με συμπληρώματα παγκρεατικών ενζύμων. Περίπου το 85% των ασθενών με κυστική ίνωση πάσχει από ανεπάρκεια παγκρέατος. Η παγκρεατική ανεπάρκεια συνδέεται στενά με δύο σοβαρές μεταλλάξεις του γονιδίου CFTR και οφείλεται στην καταστροφή των εξωκρινών ιστών του παγκρέατος. Γενικά οι ασθενείς με κυστική ίνωση οι οποίοι χαρακτηρίζονται με παγκρεατική επάρκεια τείνουν να έχουν πιο ήπια πνευμονική δυσλειτουργία και μεγαλύτερο προσδόκιμο ζωής σε σχέση με αυτούς που έχουν ανεπαρκή λειτουργία του παγκρέατος. Είναι πλέον γνωστό ότι ακόμα και οι ασθενείς με φυσιολογική λειτουργία του παγκρέατος μπορεί κάποια στιγμή στη ζωή τους να έχουν ανεπάρκεια εάν πάσχουν από τις σοβαρές μεταλλάξεις του γονιδίου CFTR, χωρίς να εμφανίσουν κάποια αρχικά συμπτώματα που σηματοδοτούν την κατάσταση αυτή.

Κάποια από τα πιο συχνά συμπτώματα της παγκρεατικής ανεπάρκειας είναι η απώλεια βάρους, αέρια, μετεωρισμός, δυσπεψία, κόπρανα λιπαρά με έντονη μυρωδιά.

Περίπου 20% των εφήβων και 50% των ενηλίκων με παγκρεατική ανεπάρκεια αναπτύσσουν διαβήτη που οφείλεται στην κυστική ίνωση, μια ξεχωριστή μορφή διαβήτη με κοινά χαρακτηριστικά τόσο του διαβήτη τύπου I όσο και του διαβήτη τύπου II (Singh & Schwarzenberg, 2017).

Ασθενείς με συνδυασμό κυστικής ίνωσης και διαβήτη που σχετίζεται με την κυστική ίνωση έχουν πολύ μεγαλύτερες πιθανότητες πρόωρου θανάτου από ότι οι υπόλοιποι ασθενείς (Ode, et al., 2019).

#### 1.4.3 Ήπαρ

Άλλο ένα όργανο που επηρεάζει η ελαττωματική πρωτεΐνη CFTR είναι το ήπαρ, ταξινομώντας τους θανάτους, από κυστική ίνωση που προσβάλλει το ήπαρ, τρίτους κατά σειρά. Διάφορες δυσλειτουργίες που προκύπτουν είναι τα αυξημένα ηπατικά ένζυμα, ηπατική στεάτωση, νεογνική χολόσταση, χολική κίρρωση και χολαγγειοπάθεια.

Το 2007 το Αμερικανικό ίδρυμα κυστικής ίνωσης ταξινόμησε την κυστική ίνωση που προσβάλλει το ήπαρ σε τρεις κατηγορίες: προκλινική ασθένεια, κυστική ίνωση του ήπατος χωρίς κίρρωση και πυλαία υπέρταση και κυστική ίνωση του ήπατος με κίρρωση και πυλαία υπέρταση, με τις δύο τελευταίες να έχουν υψηλό ποσοστό θνησιμότητας.

Η κίρρωση του ήπατος οφείλεται σε διάφορους παράγοντες που είναι αποτέλεσμα των μεταλλάξεων του γονιδίου CFTR. Η δυσλειτουργία αυτή του γονιδίου οδηγεί στη δημιουργία παχύρρευστης χολής και τη μείωση της ροής της, με αποτέλεσμα την απόφραξη των χοληφόρων, βλάβη των ηπατοκυττάρων, φλεγμονή και ίνωση (Kamal, et al., 2018).

### 1.5 Διάγνωση

Η αρχική διάγνωση της κυστικής ίνωσης στα παιδιά πραγματοποιείται από το screening test των νεογνών που έχει καθιερωθεί εδώ και χρόνια σε διάφορες χώρες. Αν το τεστ βγει θετικό, ένα επιπλέον τεστ πραγματοποιείται για να επιβεβαιώσει την αρχική διάγνωση, το τεστ του ιδρώτα. Αν επιβεβαιωθεί η κυστική ίνωση, πραγματοποιείται ραδιογραφία θώρακος για την αξιολόγηση της εξέλιξης της νόσου. Οι ραδιογραφίες είναι ένα συχνά χρησιμοποιούμενο διαγνωστικό εργαλείο για την αξιολόγηση ασθενών με συμπτώματα που αντιστοιχούν στην κυστική ίνωση, οι οποίοι διαγιγνώσκονται για πρώτη φορά.

Υπάρχουν δύο αλγόριθμοι που χρησιμοποιούνται για το screening test των νεογνών, το ανοσοαντιδραστικό θρυψινογόνο IRT/DNA και IRT/IRT1/DNA, τα οποία πραγματοποιούνται με μερικές κηλίδες αίματος από τη φτέρνα των νεογνών. Ο αλγόριθμος IRT/DNA ανιχνεύει τις μεταλλάξεις του CFTR σε ασθενείς με ένα ή δύο μεταλλαγμένα γονίδια, όμως δεν προσδιορίζει εάν ο ασθενής έχει μόνο στο ένα ή και στα δύο αντίγραφα τη μετάλλαξη. Τα άτομα με μόνο ένα μεταλλαγμένο γονίδιο θεωρούνται φορείς της κυστικής ίνωσης, ενώ αυτοί που έχουν δύο μεταλλαγμένα γονίδια θεωρούνται ότι πάσχουν από την ασθένεια αυτή.

Ο δεύτερος και νεότερος αλγόριθμος, IRT/IRT1/DNA, είναι κλινικά πιο σημαντικός. Όταν ο ασθενής έχει σκορ IRT μεγαλύτερο από 60 ng/mL και τότε το τεστ πρέπει να επαναληφθεί εντός δύο εβδομάδων. Αν και τη δεύτερη φορά το σκορ του τεστ είναι παρόμοιο, τότε εξετάζεται το DNA για μεταλλάξεις του CFTR γονιδίου. Ο δεύτερος αυτός αλγόριθμος έχει ευαισθησία μεγαλύτερη από 99,5%.

Η γονοτύπηση συχνά πραγματοποιείται όταν οι ασθενείς έχουν αυξημένο IRT σκορ ή θετικό τεστ ιδρώτα. Στην αρχική γονοτύπηση αναλύονται 100 μεταλλάξεις, αν δεν ανιχνευθεί καμία ή ανιχνευθεί μόνο ένα παθολογικό αντίγραφο πραγματοποιείται πλή-

ρης ανάλυση του γονιδίου για να καθοριστεί ο ακριβής τύπος της μετάλλαξης που υπάρχει.

Το τεστ ιδρώτα πραγματοποιείται σε ασθενείς που έχουν συμπτώματα τα οποία εγείρουν την υποψία ότι πάσχουν από κυστική ίνωση. Αυτό το τεστ θεωρείται το καλύτερο τεστ για την αρχική διάγνωση της ασθένειας. Ύστερα από την εξέταση των νεογμών με τα screening test IRT/DNA ή IRT/IRT1/DNA, ασθενείς με δύο διαδοχικά αυξημένα σκορ IRT ή ασθενείς που έχουν επιβεβαιωθεί ότι έχουν την μετάλλαξη του γονιδίου πρέπει να πραγματοποιήσουν και το τεστ ιδρώτα. Με αυτό το τεστ γίνεται ποσοτικός προσδιορισμός του χλωρίου στον ιδρώτα μέσω της διαδερμικής χορήγησης πιλοκαρπίνης με ιοντοφόρηση. Συγκέντρωση χλωρίου μεγαλύτερη από 60 nmol/L θέτει τη διάγνωση για κυστική ίνωση. Αυτό το τεστ επαναλαμβάνεται άλλη μια φορά για να επιβεβαιώσει την αρχική διάγνωση.

Όλοι οι ασθενείς που διαγιγνώσκονται με κυστική ίνωση πρέπει να παρακολουθούνται διαρκώς για την υπόλοιπη ζωή τους. Οι ραδιογραφίες θώρακος αποτελούν το βασικότερο διαγνωστικό εργαλείο για την παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου. Είναι επίσης πολύ σημαντικές καθώς με αυτές γίνεται διάγνωση των χρόνιων φλεγμονών και δεν επιβαρύνουν με την ίδια ακτινοβολία τον οργανισμό, όπως οι κλασικές ακτινογραφίες θώρακος, γεγονός πολύ σημαντικό κυρίως για τη χρήση τους στα παιδιά.

Σε ασθενείς με αρχικά συμπτώματα της ασθένειας, οι ραδιογραφίες θώρακος μπορούν να υποδείξουν υπερφούσκωμα πνευμόνων, μικρή περιβρογχική πάχυνση και βρογχεκτασίες. Καθώς η ασθένεια εξελίσσεται, τα παραπάνω συμπτώματα γίνονται πιο ευδιάκριτα στις ραδιογραφίες. Τεστ για την αξιολόγηση της λειτουργίας των πνευμόνων και ανάλυση των αερίων του αρτηριακού αίματος χρησιμοποιούνται επίσης για τη διάγνωση της κυστικής ίνωσης (Brown, et al., 2017).

Για τη διάγνωση της κυστικής ίνωσης, πέρα από το τεστ ιδρώτα που είναι το πρωταρχικό τεστ, χρησιμοποιούνται τυποποιημένα kit που μπορούν να ανιχνεύσουν τις πιο συχνές μεταλλάξεις. Κάποια από αυτά είναι το CF30c2 Kit που ανιχνεύει 29 παραλλαγές και έχει ευαισθησία 80%, το CF-EU2v1 που ανιχνεύει 51 παραλλαγές και έχει 90% ευαισθησία.

Μια άλλη μέθοδος ανίχνευσης είναι το τεστ NPD το οποίο μετράει τη δραστηριότητα μεταξύ του CFTR και του επιθηλιακού καναλιού νατρίου στη ρινική κοιλότητα. Απαιτεί να μην υπάρχει φλεγμονή στην περιοχή, πολύποδες ή οποιαδήποτε άλλη μορφή μό-

λυνσης. Σημαντική είναι και η συνεργασία του ασθενούς, ο οποίος πρέπει να παραμείνει ακινητοποιημένος για μισή ώρα. Η παρουσία υψηλής συγκέντρωσης νατρίου και η μειωμένη συγκέντρωση χλωρίου είναι κλασσικό παράδειγμα της νόσου (Bienvenu & Nguyen-Khoa, 2020).

## 1.6 Επιδημιολογία

Υπάρχουν περίπου 70.000 ασθενείς παγκοσμίως και περίπου 1.000 νέοι ασθενείς προστίθενται κάθε χρόνο (Rafeeq & Sayed Murad, 2017). Η κυστική ίνωση εμφανίζεται σε 1 ανά 3.000 γεννήσεις σε πληθυσμούς της Βορείου Ευρώπης, με την Ιρλανδία να κατέχει την πρώτη θέση με 1/1.400 γεννήσεις. Η επιδημιολογία διαφέρει ανάλογα με την γεωγραφική περιοχή και την εθνικότητα. Για παράδειγμα 1/10.000 Λατινοαμερικάνους, 1/20.000 Αφροαμερικάνους και ακόμα μικρότερο ποσοστό στους κατοίκους με καταγωγή από Ασία θα διαγνωσθεί με κυστική ίνωση. Βέβαια υπάρχουν ακόμα ελλειπή δεδομένα για χώρες της Ασίας, της Μέσης Ανατολής και της Αφρικής. Κάποιοι άλλοι πληθυσμοί της ανατολικής Ευρώπης, όπως η Αλβανία, παρουσιάζουν αναλογία της κυστικής ίνωσης 1/555 γεννήσεις, κάτι που αιτιολογείται λόγω της έντονης μετανάστευσης σε περιοχές της Βορείου Ιταλίας.

Τα τελευταία στατιστικά στις ΗΠΑ δείχνουν ότι η επιβίωση από την ασθένεια αυτή το διάστημα 2000-2010 αυξήθηκε κατά 1,8% ανά χρόνο και ότι με αυτόν το ρυθμό όσα παιδιά γεννιούνται πλέον θα μπορούν να φτάσουν μέσο όρο επιβίωσης τα 56 έτη.

Το 2010 το 50% των ασθενών με κυστική ίνωση στις ΗΠΑ διαγνώστηκε με screening test κατά την εμβρυική ηλικία σε αντίθεση με το 2000 όπου μόλις 8% είχε διαγνωσθεί. Πολλές χώρες πλέον αναφέρουν ότι πάνω από το 50% των ατόμων που πάσχουν είναι άνω των 18 ετών, γεγονός που αποδεικνύει πως όχι μόνο η μέση διάρκεια επιβίωσης έχει αυξηθεί αλλά και ότι εμφανίζονται ήπιες φαινοτυπικές μεταλλαγές. Ασθενείς άνω των 40 ετών που διαγνώστηκαν μετά τα 15 τους έτη φαίνεται ότι έχουν μια πιο ήπια μετάλλαξη της κυστικής ίνωσης που τους επέτρεψε να έχουν μεγαλύτερο προσδόκιμο ζωής. Ο ρυθμός επιβίωσης συνεχώς και αυξάνεται ακόμα και σε ασθενείς με σοβαρές παθήσεις των πνευμόνων με το ποσοστό να ανέρχεται από 1,2 σε 5,3 χρόνια κατά την περίοδο 1991-2002 (Bell, et al., 2015).

Στην Ελλάδα εκτιμάται ότι περίπου 1 στα 2.000 - 2.500 παιδιά γεννιούνται με κυστική ίνωση και συνολικά 50 - 60 παιδιά το χρόνο (1 παιδί ανά εβδομάδα περίπου). Το

4 - 5% του γενικού πληθυσμού, δηλαδή 1 στα 20 έως 25 άτομα θεωρείται ότι είναι φορέας του παθολογικού γονιδίου (περίπου 500.000 Έλληνες είναι φορείς). Στην χώρα μας εκτιμάται ότι υπάρχουν πάνω από 800 ασθενείς ενώ η συχνότερη γονιδιακή μετάλλαξη που παρατηρείται στον ελλαδικό χώρο είναι η χαρακτηριζόμενη ως f508del ή ΔF508, η οποία θεωρείται από τις βαρύτερες σε συμπτωματολογία μετάλλαξη (Anon., n.d.).

### 1.7 Προσδόκιμο ζωής

Η επιστημονική πρόοδος που έχει συντελεστεί τα τελευταία χρόνια στη θεραπεία της νόσου (η βελτίωση του καθαρισμού της βλέννας των αεραγωγών και ο έλεγχος των λοιμώξεων των πνευμόνων) άλλαξε τον χαρακτηρισμό της κυστικής ίνωσης από νεανική ασθένεια, σε ασθένεια ενηλίκων πλέον. Ο αριθμός των ενηλίκων με κυστική ίνωση θα συνεχίσει να αυξάνεται τα προσεχή χρόνια, χωρίς όμως να εμφανίζεται θνησιμότητα σε ανήλικα άτομα. Τα τελευταία 5 χρόνια στις χώρες με ανεπτυγμένο υγειονομικό σύστημα παρατηρήθηκαν πιο πολλοί ενήλικοι παρά ανήλικοι με την ασθένεια. Στις ανεπτυγμένες Ευρωπαϊκές χώρες, ο αριθμός των ενηλίκων με κυστική ίνωση προβλέπεται να έχει αυξηθεί κατά 70% μέχρι το 2025. Βέβαια σε διάφορες χώρες της Ευρώπης οι οποίες δεν έχουν εξελιγμένο σύστημα υγείας, ο μέσος όρος επιβίωσης ανέρχεται σε δύο δεκαετίες. Η ουσιαστική βελτίωση του προσδόκιμου ζωής οφείλεται στις σημαντικές εξελίξεις στη θεραπεία, ως επί το πλείστον στα εξειδικευμένα κέντρα κυστικής ίνωσης που έχουν δημιουργηθεί, με επακόλουθο η ασθένεια να αντιμετωπίζεται πιο αποτελεσματικά ως προς τη βελτίωση του καθαρισμού των αεραγωγών από την παχύρρευστη βλέννα.

Το 1950 το προσδόκιμο ζωής των ασθενών ήταν λιγότερο από ένας χρόνος, με σοβαρότερη αιτία θανάτου τον ειλεό και τον υποσιτισμό λόγω παγκρεατικής δυσλειτουργίας. Τις τελευταίες έξι δεκαετίες το προσδόκιμο ζωής των ασθενών έχει αυξηθεί προοδευτικά, φτάνοντας και τα 40 χρόνια ζωής στις ανεπτυγμένες χώρες. Η αύξηση του προσδόκιμου ζωής επιτεύχθηκε όταν οι ερευνητές ανακάλυψαν το πόσο σημαντικά είναι κατά πρώτον ο καθαρισμός των αναπνευστικών οδών από την παχύρρευστη βλέννα (καθώς η αναπνευστική ανεπάρκεια που δημιουργείται λόγω της δυσλειτουργίας των πνευμόνων είναι η πιο κοινή αιτία θνησιμότητας σε άτομα που δεν προλαβαίνουν να κάνουν μεταμόσχευση πνευμόνων), καθώς επίσης η θεραπεία των λοιμώξεων του αναπνευστικού και η ενίσχυση του οργανισμού λόγω των διατροφικών ελλείψεων που δημιουργούνταν από την παγκρεατική δυσλειτουργία. Η πιο πρόσφατη κατανόηση της παθολογικής



μεταφοράς ιόντων μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων των αεραγωγών που είχε σαν αποτέλεσμα την ελαττωμένη απομάκρυνση της βλέννας από τους πνεύμονες και ως αντίκτυπο την λοίμωξή τους, βοήθησε στην ανάπτυξη αποτελεσματικών βλεννολυτικών παραγόντων και αντιβιοτικών και την ενίσχυση της εξειδικευμένης φροντίδας που χρειάζονται οι ασθενείς με κυστική ίνωση (Elborn, 2016).

Μέχρι το 1990 οι ασθενείς επιβίωναν κατά μέσο όρο μέχρι τα 31 έτη και σε μια πρόσφατη μελέτη του 2017 το όριο έφτασε μέχρι τα 44 έτη.

Σύμφωνα με το μητρώο ασθενών με κυστική ίνωση το 51% των ενηλίκων εργάζεται με πλήρη ή μερική απασχόληση, το 42% έχει παντρευτεί ή συζεί και το 31% έχει αποφοιτήσει από το πανεπιστήμιο (Team, 2019).

## 1.8 Διατροφή και υγεία

Τα άτομα με κυστική ίνωση εμφανίζουν αργή επιδείνωση της πνευμονικής λειτουργίας σε συνδυασμό με πολυάριθμες επιπλοκές οι οποίες συνεχίζονται καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους. Αυτή η χρόνια φάση σημαίνει ότι οι ασθενείς υποβάλλονται καθημερινά σε εντατικό θεραπευτικό πρόγραμμα για τη βελτίωση των συμπτωμάτων τους.

Οι καθημερινές θεραπείες, η αδυναμία πρόβλεψης για την τελική φάση της νόσου και για τον καθορισμό του χρονικού διαστήματος όπου οι θεραπείες πλέον δε θα είναι αποδοτικές καθιστούν τον ασθενή ψυχολογικά ευάλωτο. Γι' αυτό το λόγο έχουν δημιουργεί ομάδες παρηγορητικής φροντίδας που βοηθούν την ποιότητα ζωής των ασθενών και των οικογενειών τους για την αντιμετώπιση τέτοιων ανίατων ασθενειών. Οι ερευνητές συνιστούν να απευθύνονται οι γονείς των ασθενών στις ομάδες αυτές στα αρχικά στάδια της νόσου, καθώς ο σχεδιασμός της φροντίδας που πρέπει να ακολουθήσουν οι ασθενείς είναι ιδιαίτερα σημαντικός (Sandsa, et al., 2011).

Εξαιτίας της παθογένειας της ασθένειας τα παιδιά και οι ενήλικες με κυστική ίνωση είναι απαραίτητο να ακολουθούν συγκεκριμένο πρόγραμμα διατροφής, το οποίο περιλαμβάνει επιπλέον θερμιδική κατανάλωση σε σύγκριση με άτομα που δεν πάσχουν. Χρειάζονται μια δίαιτα με υψηλή περιεκτικότητα σε θερμίδες και λιπαρά με συμπληρώματα λιποδιαλυτών βιταμινών και συμπληρωματική θεραπεία με παγκρεατικά ένζυμα (Ratchford, et al., 2018). Τα συμπληρώματα με παγκρεατικά ένζυμα πρέπει να χορηγούνται στους ασθενείς με παγκρεατική ανεπάρκεια είτε για κλινικούς λόγους είτε λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης ελασάσης στα κόπρανα. Συστήνεται στα νεογνά να θηλάζουν

για όσο περισσότερο χρονικό διάστημα είναι εφικτό καθώς αυτό βελτιώνει την εξέλιξη της νόσου και μπορεί να προσφέρει μακροχρόνια οφέλη (O'Sullivan & Freedman, 2009). Οι Ευρωπαϊκές κατευθυντήριες οδηγίες προτείνουν κατανάλωση ενέργειας 120 - 150% περισσότερο από το ημερήσιο φυσιολογικό και η χορήγηση λιποδιαλυτών συμπληρωμάτων και βιταμινών θεωρείται υποχρεωτικά απαραίτητη (Ratchford, et al., 2018).

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι τόσο η αερόβια άσκηση όσο και η άσκηση ενδυνάμωσης έχουν θετική επίδραση στους ασθενείς με κυστική ίνωση. Δραστηριότητες που περιλαμβάνουν ασκήσεις ευλυγισίας και ισορροπίας ωφελούν ευεργετικά τόσο το σώμα όσο και το πνεύμα των ασθενών. Η συνιστώμενη συχνότητα άθλησης είναι τρεις με πέντε φορές τη βδομάδα, μέσης έντασης και διάρκειας περίπου μισής ώρας (del-Valle, et al., 2020).

Η άσκηση βελτιώνει τη λειτουργία των πνευμόνων, την ισορροπία των ηλεκτρολυτών, αυξάνει το προσδόκιμο ζωής και έχει ιδιαίτερα σημαντικά οφέλη και στη ρύθμιση του σακχαρώδη διαβήτη, όπου μειώνει τις μεταγευματικές αυξήσεις της γλυκόζης του αίματος και γενικά τη συνολική γλυκόζη του αίματος (Ode, et al., 2019).

Το σύνολο λοιπόν της ισορροπημένης διατροφής, της συχνής γυμναστικής και των ομάδων παρηγορητικής φροντίδας αποτελούν απαραίτητα εφόδια στη ζωή των ασθενών για την καλύτερη αντιμετώπιση τόσο των συμπτωμάτων τους όσο και τη διατήρηση της ψυχολογικής τους κατάστασης σταθερή.

## Κεφάλαιο 2: CFTR

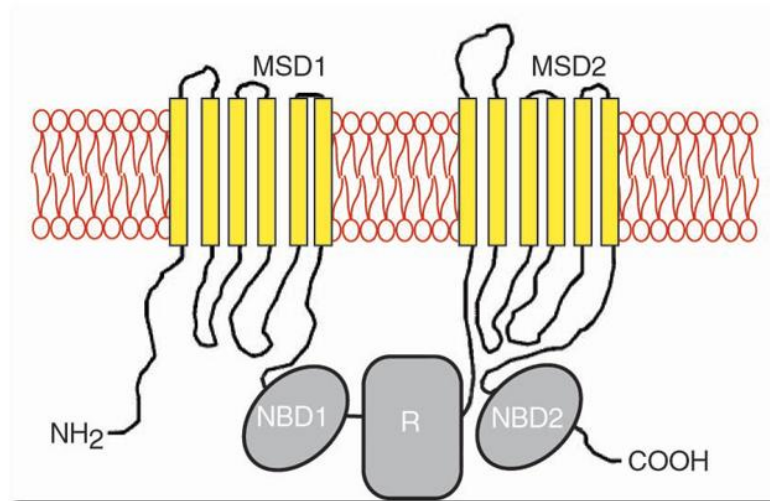
### 2.1 Γονίδιο και πρωτεΐνη CFTR

Ο εντοπισμός του γονιδίου CFTR ήταν μία από τις πιο σημαντικές ανακαλύψεις για την έρευνα της κυστικής ίνωσης και γενικότερα για την επιστημονική κοινότητα. Το 1989, στο Τορόντο, έπειτα από εκτεταμένες έρευνες και αναλύσεις, ο Lap-Chee Tsui και η ομάδα του ανακάλυψαν μια συγκεκριμένη θέση στο χρωμόσωμα 7 (περιοχή q31) που ευθυνόταν για την κυστική ίνωση. Επειδή το προϊόν του γονιδίου αυτού παρέμενε άγνωστο μέχρι τότε, η διερεύνησή του έπρεπε να διεξαχθεί χωρίς τη χρήση χημικού δείκτη. Οι ερευνητές ακολούθησαν διαφορετική προσέγγιση με τη χρήση μιας νέας τεχνικής, που ονομάζεται κλωνοποίηση θέσης, στην οποία χρησιμοποίησαν ανιχνευτές πολυμορφισμού μήκους περιοριστικού θραύσματος γνωστό ως RFLP για τον εντοπισμό της ακριβούς θέσης του γονιδίου της κυστικής ίνωσης. Με την ανεύρεση του γονιδίου έγινε ανάλυση 280kb συνεχούς DNA το οποίο απομονώθηκε από το συγκεκριμένο χρωμόσωμα.

Η πιο κοινή μετάλλαξη, η οποία ανιχνεύεται στα δύο τρίτα των ατόμων με κυστική ίνωση, ανακαλύφθηκε την ίδια περίοδο και χαρακτηρίστηκε ως διαγραφή τριών ζευγών βάσεων, που είχε ως συνεπακόλουθο να μην υπάρχει το αμινοξύ φαινυλαλανίνη στη θέση 508 της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Η μετάλλαξη έγινε γνωστή με την ονομασία F508del. Ο Riordan και οι συνεργάτες του χαρακτήρισαν το γονίδιο της κυστικής ίνωσης ως ένα πολυπεπτίδιο αποτελούμενο από 1.480 αμινοξέα με μοριακό βάρος 168.138 daltons και το ονόμασαν CFTR.

Η πρωτεΐνη που προκύπτει από το γονίδιο CFTR είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που εντοπίζεται στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων όπου και ρυθμίζει τη μεταφορά ιόντων και υγρών. Η πρωτεΐνη αυτή είναι μέλος της ομάδας της τριφωσφορικής αδενοσίνης που ανήκει στην υπεροικογένεια των μεταφορέων κασέτας σύνδεσης ATP (ABC). Περιλαμβάνει δύο διαμεμβρανικές περιοχές (TMDs) και η καθεμία αποτελείται από έξι υποομάδες, οι οποίες σχηματίζουν έναν πόρο που λειτουργεί ως διάυλος συγκεκριμένων ιόντων. Αυτό το χαρακτηριστικό έδωσε και την ονομασία στην πρωτεΐνη ως «διάυλος ιόντων ή διάυλος CFTR». Ένα άλλο χαρακτηριστικό της πρωτεΐνης είναι η παρουσία μιας κυτταροπλασματικής ρυθμιστικής περιοχής που ονομάζεται περιοχή R και δύο κυτταροπλασματικών περιοχών σύνδεσης νουκλεοτιδίων, NBD1 και NBD2. Η περιοχή R αποτελείται από θέσεις φωσφορυλίωσης, οι οποίες εάν φωσφορυλιωθούν από την πρωτεϊνική

κινάση A μπορούν να ενεργοποιήσουν το διάυλο ιόντων. Έπειτα από την φωσφορυλίωση της περιοχής R, ακολουθεί η αλληλεπίδραση των περιοχών σύνδεσης των νουκλεοτιδίων με τα TMDs και έτσι προκύπτει η υδρόλυση του ATP με επακόλουθο την τροποποίηση του σχηματισμένου διαύλου από ανοιχτή (ενεργή) θέση σε κλειστή (ανενεργή). Κατά συνέπεια, το επίπεδο δραστηριότητας και η πιθανότητα ανοίγματος του διαύλου εξαρτώνται από την φωσφορυλίωση της περιοχής R αλλά και από την υδρόλυση του ATP.



Εικόνα 3: Δομή πρωτεΐνης CFTR

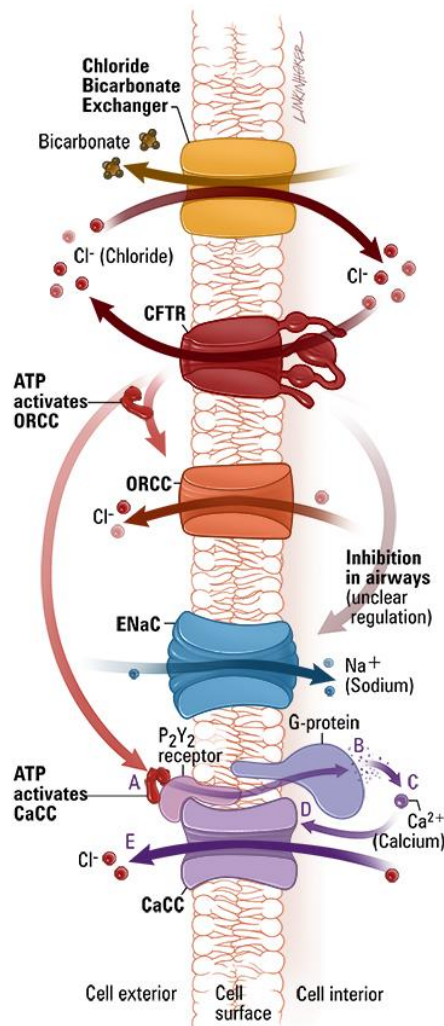
Η κύρια λειτουργία της πρωτεΐνης είναι να ρυθμίζει τη μεταφορά των ιόντων χλωρίου κατά μήκος των επιφανειών των κυτταρικών μεμβρανών. Όταν ο διάυλος βρίσκεται σε ενεργή κατάσταση πραγματοποιείται μεταφορά ιόντων χλωρίου κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης των επιθηλιακών κυττάρων. Επίσης γίνεται μεταφορά και διττανθρακικών ιόντων κατά μήκος του διαύλου και η μεταφορά αυτή παίζει σημαντικό ρόλο τόσο στο pH της επιφάνειας των επιθηλιακών κυττάρων όσο και στη βλέννα που υπάρχει στην τριγύρω περιοχή. Από διάφορες μελέτες έχει παρατηρηθεί ότι η CFTR πρωτεΐνη ρυθμίζει τη λειτουργία και σε άλλους γειτονικούς διαύλους ιόντων (Bergeron & Cantin, n.d.).

## 2.2 Επίδραση σε άλλους διαύλους

Όταν η πρωτεΐνη διάυλος CFTR είναι ελαττωματική επηρεάζονται και άλλοι γειτονικοί διαύλοι όπως ο διάυλος χλωρίου (ORCC), ο επιθηλιακός διάυλος νατρίου (ENaC), ο διάυλος καλίου ROMK1 και ο διάυλος ανταλλαγής διττανθρακικών/χλωρίου. Επιπλέον είναι

δυνατόν να επηρεαστούν και άλλοι διάλυλοι χλωρίου που υπάρχουν στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων, οι οποίοι έχουν προταθεί ως θεραπευτικός στόχος για την ενίσχυση της μεταφοράς ιόντων χλωρίου.

Ο διάλυλος ORCC εντοπίζεται στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων. Όταν λειτουργεί φυσιολογικά η πρωτεΐνη CFTR διευκολύνεται η μεταφορά της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), ένα μόριο που μεταφέρει ενέργεια στο εξωτερικό του κυττάρου, ενεργοποιώντας έτσι τον διάλυλο ORCC. Βέβαια παραμένει άγνωστο προς το παρόν εάν ο ίδιος ο διάλυλος CFTR ή κάποιος παρεμφερής διάλυλος συμμετέχει στη μεταφορά ATP. Παρ' όλα αυτά εάν προκληθεί κάποια μετάλλαξη στη πρωτεΐνη τότε δεν είναι σε θέση να εκτελέσει σωστά τη διαδικασία μεταφοράς ATP.



Εικόνα 4: Επίδραση ελαττωματικού CFTR και σε άλλους διαλύτες

Ο διάυλος νατρίου γνωστός και ως ENaC που βρίσκεται στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων αποτελείται από τέσσερις υποομάδες, δύο άλφα, μία βήτα, μία γάμμα και κάθε υποομάδα αποτελείται από δύο διαμεμβρανικές έλικες. Η δράση της πρωτεΐνης CFTR επηρεάζει το διάυλο ENaC όταν συνεκφράζεται στο ίδιο κύτταρο από το μονοπάτι cAMP με αποτέλεσμα τη μείωση τη λειτουργικότητας των πνευμόνων, χωρίς όμως να έχει προσδιοριστεί ακόμα ο ακριβής μηχανισμός της επίδρασης αυτής.

Ο μηχανισμός δράσης του διαύλου ανταλλαγής διαττανθρακικών/χλωρίου είναι να μεταφέρει ένα διττανθρακικό μόριο έξω από το κύτταρο για κάθε ιόν χλωρίου που μεταφέρει μέσα στο κύτταρο. Τα ιόντα χλωρίου περνούν δια μέσω του διαύλου CFTR, επομένως εάν ο διάυλος αυτός δε λειτουργεί σωστά αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση τη λειτουργικότητας και του διαύλου ανταλλαγής διαττανθρακικών/χλωρίου.

Άλλος ένας διάυλος που επηρεάζεται από τη λειτουργία του CFTR είναι αυτός του ασβεστίου γνωστός και ως CaCC, ο οποίος ρυθμίζεται από τον P2Y2 υποδοχέα που ενεργοποιείται από το ATP. Οπότε μια οποιαδήποτε μείωση του ATP που προκύπτει από μετάλλαξη του CFTR και άρα δυσλειτουργία του, επηρεάζει άμεσα και το διάυλο CaCC (Anon., 2022).

### 2.3 Φωσφορυλίωση

Για την ενεργοποίηση της CFTR πρωτεΐνης είναι απαραίτητη η φωσφορυλίωσή της από την πρωτεϊνική κινάση A (PKA) σε διάφορες περιοχές στην ρυθμιστική της περιοχή R. Για την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης A πρέπει πρώτα να φωσφορυλιωθεί η πρωτεϊνική κινάση C. Η ολοκλήρωση της ενεργοποίησης της πρωτεΐνης επιτυγχάνεται με τη σύνδεση ATP στις περιοχές σύνδεσης νουκλεοτιδίων.

Η ενεργοποίηση της φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης επιτυγχάνεται με τη σύνδεση ATP στις περιοχές σύνδεσης νουκλεοτιδίων (NBDs). Στο εσωτερικό των κυττάρων η συγκέντρωση ATP (περίπου 2 mM) είναι αρκετά αυξημένη έτσι ώστε να διασφαλίσει ότι η πρωτεΐνη θα παραμείνει ενεργοποιημένη.

Η φωσφορυλιωμένη CFTR πρωτεΐνη αποτελεί ένα διάυλο ο οποίος όταν ανοίγει διατηρείται σε αυτή την κατάσταση για μερικές εκατοντάδες χιλιοστά του δευτερολέπτου. Η διάρκεια και η συχνότητα ανοίγματος του διαύλου εξαρτάται αποκλειστικά και μόνο από την συγκέντρωση ATP στο εσωτερικό του κυττάρου. Σε αντίθεση με άλλους διαύλους ιόντων, ο συγκεκριμένος επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από το δυναμικό της

κυτταρικής μεμβράνης. Η αποπόλωση του δυναμικού της μεμβράνης μειώνει ελαφρώς τόσο τη διάρκεια όσο και τα διαστήματα που παραμένει ανοιχτός ο διάυλος, ενώ η υπερπόλωση προκαλεί αντίθετα αποτελέσματα. Μεταξύ του φυσιολογικού εύρους των δυναμικών της μεμβράνης των επιθηλιακών κυττάρων οι αλλαγές στην κινητική του διαύλου και της πιθανότητας να ανοίγει είναι πολύ μικρές.

Η φωσφορυλίωση της CFTR πρωτεΐνης στο εσωτερικό των κυττάρων επιτυγχάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του κυτταροπλασματικού cAMP, το οποίο με τη σειρά του ενεργοποιεί την ενδογενή πρωτεϊνική κινάση A. Στο επιθήλιο η παραγωγή του cAMP πυροδοτείται από την ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης από μια G πρωτεΐνη που συνδέεται με το μονοπάτι των ορμονών, όπως είναι η γλυκαγόνη, η επινεφρίνη ή ο β-αδρενεργικός αγωνιστής όπως είναι η ισοπροτερενόλη, η ακετυλοχολίνη, το αγγειοδραστικό εντερικό πεπτίδιο ή η αδενοσίνη. Ωστόσο όταν ληφθεί η απαραίτητη ενδοκυτταρική συγκέντρωση cAMP από την ορμονική διέγερση, μπορεί να είναι αρκετά πιο κάτω από τα απαραίτητα επίπεδα για την επίτευξη της μέγιστης ενεργοποίησης της CFTR πρωτεΐνης. Σε πειράματα *ex vivo* η μέγιστη ενεργοποίηση της πρωτεΐνης επιτυγχάνεται με την φαρμακολογική ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης με φορσκολίνη ή με τη χρήση διαπερατών αναλόγων cAMP, όπως είναι το CPT-cAMP ή το 8-Br-cAMP. Σε αντίθετη περίπτωση όταν το ενδοκυτταρικό μέρος της πρωτεΐνης είναι προσβάσιμο, όπως είναι κατά τη διάρκεια της τεχνικής καθήλωσης κηλίδας (patch clamp), η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης μπορεί να επιτευχθεί από την άμεση εφαρμογή της καταλυτικής υποομάδας πρωτεϊνικής κινάσης A.

Η ρυθμιστική περιοχή της CFTR πρωτεΐνης αποτελείται από περίπου 200 υπολείμματα, με 20 πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης (12 σερίνες και 8 θρεονίνες). Επίσης οι δύο υποτιθέμενες φωσφορυλιωμένες σερίνες, στις θέσεις 660 και 670, που βρίσκονται στη NBD1 (υπολείμματα 638-670) θεωρήθηκαν υποψήφια για την ρύθμιση της λειτουργίας της CFTR πρωτεΐνης. Η διαγραφή της ρυθμιστικής περιοχής R, από τα αμινοξέα 708 ως 835, οδήγησε σε δραστηριότητα ανεξάρτητη από την πρωτεϊνική κινάση A, υποδεικνύοντας ότι αυτή η περιοχή περιέχει υπολείμματα απαραίτητα για την ενεργοποίηση της εξαρτώμενης πρωτεϊνικής κινάσης A. Σε μια πλήρως φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη έχουν εντοπιστεί οκτώ φωσφοσερίνες (θέσεις υπολειμμάτων 660, 700, 712, 737, 753, 768, 795 και 813) αλλά και μερική φωσφορυλίωση (περίπου 60%) μιας σερίνης στη θέση 670.

Νεότερα μοντέλα πρότειναν ότι η μη φωσφορυλιωμένη ρυθμιστική περιοχή R χρησιμεύει ως ανασταλτικό σωματίδιο που αποφράσσει το διάυλο. Ωστόσο σε αντίθεση με τις προβλέψεις, οι προσπάθειες προσθήκης ενός μη φωσφορυλιωμένου πεπτιδίου στην πρωτεΐνη στην οποία έχει διαγραφεί η ρυθμιστική περιοχή και η σερίνη στη θέση 660 έχει αντικατασταθεί από αλανίνη δεν ανέστειλε τη δραστηριότητά της, ενώ η προσθήκη ενός φωσφορυλιωμένου πεπτιδίου διέγειρε τη δραστηριότητα αυξάνοντας το ρυθμό ανοίγματος του διαύλου. Αυτό το γεγονός οδήγησε στην ιδέα ότι η φωσφορυλίωση της ρυθμιστικής περιοχής ευνοεί τη δραστηριότητα του διαύλου. Στην πραγματικότητα όμως ο μέγιστος ρυθμός ανοίγματος του διαύλου ήταν ο ίδιος όπως και στους διαύλους γονιδίων άγριου τύπου και αυτό οδήγησε στο διαχωρισμό τους από αυτούς στους οποίους υπήρχε απώλεια της ρυθμιστικής τους περιοχής. Έτσι κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η φωσφορυλιωμένη ρυθμιστική περιοχή R δε διεγείρει το άνοιγμα του διαύλου CFTR, σε αντίθεση όμως, η αποφωσφορυλιωμένη ρυθμιστική περιοχή R το αναστέλλει.

Υπάρχει μια πληθώρα αναφερόμενων πειραμάτων στα οποία αντικαθιστούν πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης στη ρυθμιστική περιοχή R, αλλά ο ρόλος κάθε φωσφοσερίνης στη διαμόρφωση της δραστηριότητας της CFTR πρωτεΐνης είναι αρκετά περίπλοκος. Όταν η σερίνη στη θέση 660, 737, 795 και 813 αντικατασταθεί από αλανίνη, η πρωτεΐνη μπορεί να φωσφορυλιωθεί από την πρωτεϊνική κινάση A και να δημιουργηθεί ένας λειτουργικός διάυλος. Η αντικατάσταση της σερίνης στη θέση 660 και 670 από αλανίνη στη ρυθμιστική περιοχή σύνδεσης νουκλεοτιδίων (NBD1) έχει φανεί ότι δεν επηρεάζει τη λειτουργία του διαύλου. Η αντικατάσταση της σερίνης στη θέση 700, 795 και 813 έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τη πιθανότητα ανοίγματος του διαύλου, ενώ μεταλλάξεις στις θέσεις 737 και 768 έχει αποδειχθεί ότι αυξάνουν την πιθανότητα ανοίγματος του διαύλου. Γενικότερα, όταν η σερίνη στη ρυθμιστική περιοχή R αντικατασταθεί με αλανίνη το αποτέλεσμα επίδρασης στον διάυλο ποικίλλει. Όταν η σερίνη στη θέση 737, 795 και 813 καθώς και σε όλες τις άλλες παρόμοιες θέσεις φωσφορυλίωσης που επιδέχονται αντικαταστάσεις, υποστεί μετάλλαξη (σερίνη 686, 700, 712, 768 και θρεονίνη 788) η δραστηριότητα του διαύλου μειώνεται.

Μια μετάλλαξη στο αρνητικό τμήμα της ρυθμιστικής περιοχής R (αμινοξέα 817-838) στο οποίο βρισκόταν η θέση φωσφορυλίωσης η οποία και αφαιρέθηκε, φάνηκε ότι εξάλειψε πλήρως την εξάρτηση της δραστηριότητας του διαύλου από την πρωτεϊνική κινάση A. Αυτή η παρατήρηση απέδειξε ότι αυτή η περιοχή είναι ζωτικής σημασίας για



τη ρύθμιση της δραστηριότητας του διαύλου και ίσως αποτελεί τη δομική σύνδεση μεταξύ της φωσφορυλίωσης της ρυθμιστικής περιοχής R και τη ρύθμιση της λειτουργικότητας του διαύλου (Moran, 2016).

#### 2.4 Ομαδοποίηση μεταλλάξεων

Μέχρι σήμερα έχουν ανακαλυφθεί πάνω από 2.000 μεταλλάξεις του CFTR γονιδίου, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι όλες αυτές προκαλούν κυστική ίνωση. Οι παραλλαγές αυτές διακρίνονται σε αυτές που προκαλούν τη νόσο, αυτές που προκαλούν ένα πλήθος από κλινικά συμπτώματα, αυτές που δε προκαλούν την ασθένεια και παραλλαγές του γονιδίου μικρής κλινικής σημασίας. Επειδή κάθε μετάλλαξη του γονιδίου έχει και διαφορετική κλινική σημασία, δημιουργείται έτσι η ανάγκη ενός συστήματος κατηγοριοποίησης των παραλλαγών αυτών με βάση την επίδρασή τους στη λειτουργία της CFTR πρωτεΐνης. Οι πρώτοι που πρότειναν ένα τέτοιο σύστημα ήταν ο Lap-Chee Tsui και οι συνεργάτες του, το οποίο σύστημα αργότερα τροποποιήθηκε από τον Welsh και τον Smith και αποτελούνταν από 6 ομάδες. Τα τελευταία χρόνια οι De Boeck και Amaral τροποποίησαν το σύστημα αυτό δημιουργώντας άλλη μία ομάδα ( 7 σύνολο) (Bergeron & Cantin, n.d.).

Οι μεταλλάξεις της ομάδας 1 είναι αποτέλεσμα ολόκληρης ή μερικής έλλειψης παραγωγής λειτουργικής πρωτεΐνης CFTR. Τέτοιου είδους μεταλλάξεις προκαλούνται από αντικατάσταση νουκλεοτιδίου με κάποιο κωδικόνιο λήξης (UAA, UAG ή UGA), εισαγωγή ή διαγραφή νουκλεοτιδίου, ολόκληρη ή μερική διαγραφή του CFTR γονιδίου ή αλλαγή στη σειρά των κωδικονίων. Οι μεταλλάξεις που οδηγούν στη δημιουργία κωδικονίων λήξης μπορούν να οδηγήσουν στην καταστροφή του mRNA, το οποίο υπό φυσιολογικές συνθήκες έχει μηχανισμούς επιδιόρθωσης λαθών κατά τη μεταγραφή του γονιδίου του. Τέτοιες μεταλλάξεις είναι οι p.Gly542, p.Arg553, p.Trp1282 με εξαίρεση την Arg1162, κατά την οποία παράγεται φυσιολογικό mRNA.

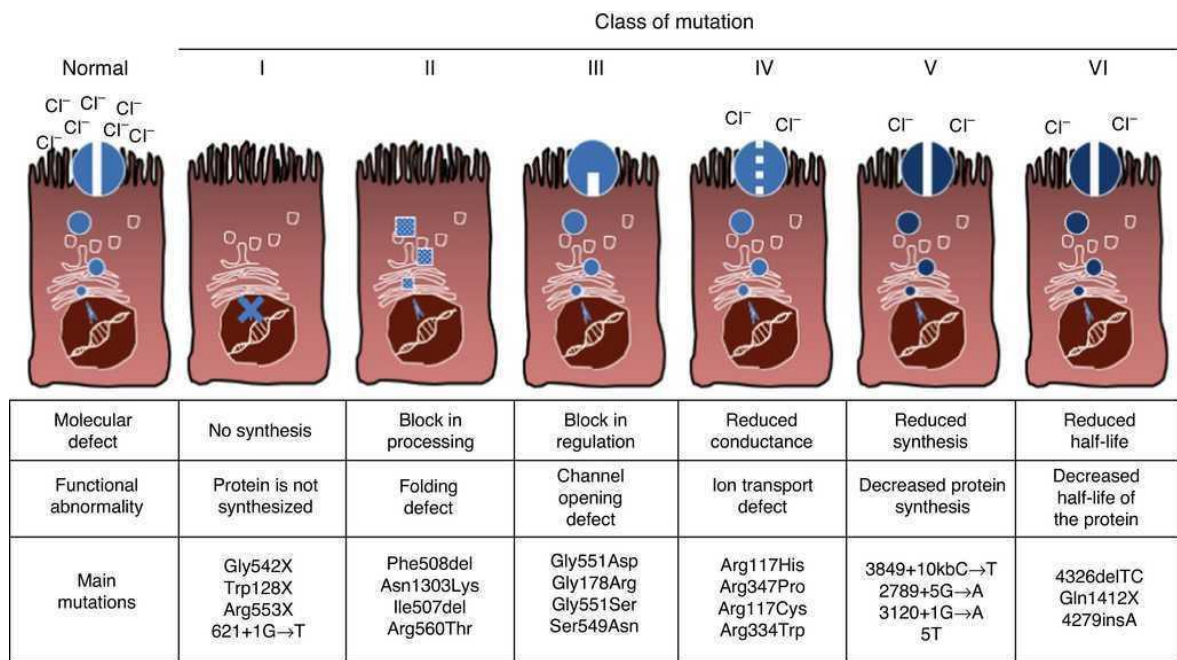
Οι μεταλλάξεις της ομάδας 2 συνδέονται με ελαττωματική αναδίπλωση της πρωτεΐνης και μπορούν να εντοπιστούν σε οποιοδήποτε τμήμα της CFTR πρωτεΐνης. Η προβληματική αυτή πρωτεΐνη παραμένει στο ενδοπλασματικό δίκτυο και έπειτα μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα όπου και αποικοδομείται από το μονοπάτι ουβικιτίνης/πρωτεασώματος. Η ωρίμανση της πρωτεΐνης καθ' όλη τη πορεία της μέσα στο κύτταρο μπορεί να προσδιοριστεί με την τεχνική Western blot, καθώς ο γλυκοζυλιωμένος πυρήνας της πρωτεΐνης κινείται με μικρότερο μοριακό βάρος απ' ότι η πλήρη γλυκοζυ-

λιωμένη πρωτεΐνη. Ανάλογα με τη μετάλλαξη μπορεί να υπάρχει είτε μερική μείωση της ώριμης CFTR πρωτεΐνης είτε ολόκληρη η απουσία της. Η πιο συχνή μετάλλαξη αυτής της ομάδας είναι η p.Phe508del η οποία έχει μελετηθεί εκτεταμένα. Έχει αποδειχθεί ότι η συγκεκριμένη μετάλλαξη οδηγεί σε ενεργειακή και κινητική αστάθεια της περιοχής σύνδεσης νουκλεοτιδίων 1 (NBD1) της πρωτεΐνης λόγω ελαττωματικής αναδίπλωσης. Απαιτείται λοιπόν διόρθωση τόσο της ενεργειακής αστάθειας της περιοχής σύνδεσης νουκλεοτιδίων όσο και της αστάθειας διεπαφής για την αποκατάσταση της μετάλλαξης p.Phe508del. Αρχικά θεωρήθηκε ότι οι μεταλλάξεις που ανήκουν σε αυτή την ομάδα όπως η p.Phe508del και η p.Arg1066Cys προκαλούν σοβαρής μορφής κυστική ίνωση, όμως αργότερα αποδείχθηκε ότι κάποιες μεταλλάξεις της ομάδας αυτής όπως η p.Leu206Trp εμφανίζουν ποικίλους φαινοτύπους και ηπιότερης μορφής νόσο.

Οι μεταλλάξεις της ομάδας 3 συνήθως εντοπίζονται στην περιοχή σύνδεσης νουκλεοτιδίων με ATP και χαρακτηρίζονται με την ονομασία «μεταλλάξεις διαύλου». Χαρακτηρίζονται ως missense μεταλλάξεις (μεταλλάξεις αστοχίας) και παράγουν μια πρωτεΐνη λειτουργική έτσι ώστε να φτάσει μέχρι την κυτταρική μεμβράνη, η οποία όμως εμφανίζει αντίσταση στην ενεργοποίησή της από την πρωτεϊνική κινάση A. Κάποιες τέτοιες μεταλλάξεις είναι η p.Gly551Asp, p.Arg560Thr και p.Gly970Arg. Αξίζει να σημειωθεί ότι αυτού του είδους η μετάλλαξη εντοπίζεται στον τρίτο κυτταροπλασματικό βρόγχο της πρωτεΐνης και παρ' όλο που είναι γνωστή η θέση της στην οποία έχουμε αντικατάσταση νουκλεοτιδίου, αυτό το γεγονός δεν επαρκεί για την πρόβλεψη των δομικών και λειτουργικών ανωμαλιών που προκύπτουν.

Οι μεταλλάξεις της ομάδας 4 εντοπίζονται εντός των περιοχών που εκτείνονται στη μεμβράνη και εμπλέκονται στη σύσταση του διαύλου. Οι μεταλλάξεις missense που εντοπίζονται σε αυτήν την περιοχή παράγουν μια πρωτεΐνη η οποία κατορθώνει να φτάσει στην κυτταρική μεμβράνη και να διατηρήσει τη δραστηριότητα του διαύλου με μειωμένη όμως αγωγιμότητα ιόντων χλωρίου και ικανότητα ανοίγματος του διαύλου. Οι μεταλλάξεις αυτής της ομάδας όπως η p.Arg117His χαρακτηρίζονται από πιο ήπια συμπτώματα της νόσου. Πρόσφατα προτάθηκε μια υποκατηγορία της ομάδας 4, η ομάδα 4β, της οποίας οι μεταλλάξεις επηρεάζουν συγκεκριμένα την αγωγιμότητα των διττανθρακικών ιόντων, χωρίς όμως να μειώνουν την αγωγιμότητα των ιόντων χλωρίου. Κάποιες από τις μεταλλάξεις της υποκατηγορίας αυτής είναι η p.Arg75Gln και p.Ile148Thr. Αν και η

p.Ile148Thr έχει μελετηθεί ότι δεν είναι επιβλαβής, αντιθέτως η p.Arg75Gln εμφανίζει πιο σοβαρά συμπτώματα της νόσου στους ασθενείς.



Arch Bronconeumol. 2014;50:146-50

Εικόνα 4: Ομάδες μεταλλάξεων

Η ομάδα 5 περιλαμβάνει μεταλλάξεις οι οποίες μειώνουν τη συνολική ποσότητα της CFTR πρωτεΐνης επηρεάζοντας το μάτισμα του πρόδρομου mRNA. Αυτές οι μεταλλάξεις μπορούν να προκαλέσουν πλήρη ή μερική παράλειψη ενός εξωνίου. Όταν συμβεί μερική παράλειψη ενός εξωνίου τότε το mRNA διατηρείται αλλά σε μικρότερη ποσότητα. Όταν η παράλειψη του εξωνίου βρίσκεται εντός του πλαισίου ανάγνωσης από τη μεταγραφή θα προκύψει μία ατελής και μη λειτουργική πρωτεΐνη. Αντίθετα όταν η παράλειψη του εξωνίου βρίσκεται εκτός του πλαισίου ανάγνωσης ένα κωδικόνιο λήξης θα δημιουργηθεί και η μεταγραφή θα υποβαθμιστεί από το μονοπάτι NMD, το οποίο αναγνωρίζει τα ελαττωματικά mRNA και τα εξαλείφει. Συνήθως οι μεταλλάξεις που επηρεάζουν το μάτισμα βρίσκονται μέσα στα ιντρόνια κοντά στις τοποθεσίες ματίσματος, όπου αλλάζουν το βασικό σήμα ματίσματος που εμπλέκεται στην σωστή αναγνώριση του εξωνίου (θέση δέκτη, θέση δότη, σημείο διακλάδωσης ή οδός πολυπυριμιδίνης). Ακόμη ένας αυξημένος αριθμός των μεταλλάξεων ανιχνεύεται εντός των εξωνίων. Αυτές οι αντικαταστάσεις νοκλεοτιδίων μέσα στα εξωνία μπορούν να προκαλέσουν αποκοπή του εξωνίου είτε διαταράσσοντας την αλληλουχία αναγνώρισης ματίσματος είτε δημιουργώντας αλληλουχίες

σίγασης ματίσματος. Η πιο γνωστή και συχνά μελετημένη είναι η παράλειψη του εξωνίου 10 (παλαιότερα γνωστό ως εξώνιο 9). Η παρουσία ή απουσία αυτού του εξωνίου συνδέεται με έναν πολυμορφισμό εντός της οδού πολυπυριμιδίνης που εντοπίζεται στην αντίθετη θέση του αποδέκτη ματίσματος (Fanen, et al., 2014).

Οι μεταλλάξεις της ομάδας 6 παράγουν μια λειτουργική αλλά ασταθή πρωτεΐνη στη κυτταρική μεμβράνη. Αυτές οι ανωμαλίες, οι οποίες χαρακτηρίζονται ως nonsense (χωρίς νόημα) ή ως μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης, δεν επηρεάζουν την βιογένεση της πρωτεΐνης αλλά συχνά προκαλούν περικοπή μεγέθους 70 με 100 ζεύγη βάσεων του C άκρου της. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αποικοδόμηση της ώριμης γλυκοζυλιωμένης πρωτεΐνης η οποία πραγματοποιείται πέντε με έξι φορές πιο γρήγορα απ' ό,τι στη φυσιολογική. Ως εκ τούτου, τέτοιου είδους μεταλλάξεις χαρακτηρίζονται με πιο σοβαρά συμπτώματα της νόσου (Lommatzsch & Aris, 2009).

Οι De Boeck και Amaral διαχώρισαν τις μεταλλάξεις της ομάδας 1 σε αυτές που οφείλονται σε πρόωρο κωδικόνιο λήξης και σε μια καινούργια ομάδα, την ομάδα 7, στην οποία υπάρχει απουσία του μεταγραφόμενου mRNA. Οι μεταλλάξεις της ομάδας 7 έχουν το ίδιο αποτέλεσμα με αυτές της ομάδας 1, δηλαδή απουσία της CFTR πρωτεΐνης στις οποίες όμως η μετάλλαξη δε μπορεί να διορθωθεί με κάποια θεραπεία. Αυτή η κατηγοριοποίηση ήταν σημαντική για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων. Οι μεταλλάξεις αυτές αν και αποτελούν την τελευταία ομάδα σχετίζονται με σοβαρές μορφές της κυστικής ίνωσης παρόμοιες με αυτές των ομάδων 1, 2 και 3 σε αντίθεση με τις ομάδες 4, 5, 6 οι οποίες συνδέονται με ηπιότερους φαινοτύπους (Marson, et al., 2016).

Κατά μέσο όρο ασθενείς με τουλάχιστον μια μετάλλαξη της ομάδας 4 ή 5 εμφανίζουν μεταγενέστερη έναρξη της νόσου με χαμηλότερες τιμές χλωρίου στο τεστ ιδρώτα, πιο αργή επιδείνωση της πνευμονικής λειτουργίας, λιγότερες λοιμώξεις από *Pseudomonas aeruginosa* και μικρότερες πιθανότητες εμφάνισης διαβήτη που συνδέεται με κυστική ίνωση (De Boeck, 2020).

## Κεφάλαιο 3: Θεραπευτική αντιμετώπιση

Όπως είναι λογικό η μέγιστη προσοχή και οι περισσότεροι πόροι είναι τώρα επικεντρωμένοι στην επιδιόρθωση της ελαττωματικής πρωτεΐνης CFTR σε μοριακό επίπεδο, με τη χρήση των διαμορφωτών (ενισχυτές και επιδιορθωτές). Δεν πρέπει όμως να ξεχνάμε και τις αρχικές θεραπείες που εφαρμόζονται εδώ και χρόνια όπως είναι η χρήση αντιβιοτικών, η φυσικοθεραπεία και η μεταμόσχευση πνευμόνων (ως τελευταία επιλογή θεραπείας). Ωστόσο θα πρέπει να τονίσουμε ότι καμία από αυτές τις θεραπείες δεν είναι πλήρως αποτελεσματική, εάν χρησιμοποιηθεί μεμονωμένα. Ακόμη και η πιο γνωστή και ευρέως διαδεδομένη, το Kalydeco, χρησιμοποιείται ταυτόχρονα μαζί με άλλες τυπικές θεραπείες που υπάρχουν εδώ και χρόνια, για τη βελτίωση των συμπτωμάτων των ασθενών (De Boeck & Amaral, 2016).

Η πρόκληση που αντιμετωπίζουν οι κλινικοί γιατροί είναι να υπάρχει ισορροπία μεταξύ των θεραπειών που απαιτούνται για τη διατήρηση της βέλτιστης κατάστασης της υγείας των ασθενών με κυστική ίνωση και της επιβάρυνσης που προκαλούν οι εφαρμογές άλλων θεραπειών (Rand, et al., 2012).

### 3.1 Φυσικοθεραπεία

Η φυσικοθεραπεία παίζει σημαντικό ρόλο στη διαχείριση της κυστικής ίνωσης. Αν και ο καθαρισμός των αεραγωγών ήταν κύρια θεραπεία για τη νόσο τα τελευταία 60 χρόνια, μόλις πρόσφατα οι ερευνητές κατανόησαν τις αρχές στις οποίες βασίζονται οι τεχνικές της φυσικοθεραπείας, οι οποίες και έχουν βελτιωθεί αρκετά. Ο καθαρισμός των αεραγωγών αποσκοπεί στην αφαίρεση των βλαβερών εκκρίσεων και κατά συνέπεια τη βελτίωση του αερισμού και της μηχανικής των πνευμόνων και τη μείωση της παθογένειας από μια επικείμενη λοίμωξη. Είναι σημαντικό να διευκρινιστεί ότι με τον όρο τεχνικές καθαρισμού των αεραγωγών (ACTs) αναφερόμαστε στη φυσικοθεραπεία θώρακος (CPT) η οποία αποτελείται από ορθοστατική παροχέτευση και κρούση στο στήθος (PD&P). Με την εισαγωγή νέων τεχνικών όπως οι τεχνικές ενεργού κύκλου αναπνοής (ACBT), η αυτογενής παροχέτευση, η θετική εκπνευστική πίεση (PEP), η ταλαντευόμενη PEP και η τάλαντωση του θωρακικού τοιχώματος υψηλής συχνότητας (HFCWO) για τη θεραπεία των ασθενών με κυστική ένωση, χρησιμοποιήθηκε ο όρος τεχνικές καθαρισμού των αεραγωγών ή φυσικοθεραπείες θώρακος για την ομαδοποίηση των τεχνικών αυτών.

Από διάφορες κλινικές μελέτες που διεξήχθησαν, οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι καμία τεχνική καθαρισμού των πνευμόνων δεν έχει αποδειχθεί καλύτερη από κάποια άλλη. Επίσης, οι τεχνικές ενεργού κύκλου αναπνοής, η αυτογενής παροχέτευση, η θετική εκπνευστική πίεση και η ταλαντευόμενη θετική εκπνευστική πίεση θεωρούνται το ίδιο αποτελεσματικές για τη διατήρηση της υγείας των ασθενών. Επιπλέον, η ταλάντωση του θωρακικού τοιχώματος υψηλής συχνότητας μπορεί να έχει αρνητική επίδραση στην ευημερία των ασθενών καθώς η μέτρηση της γίνεται από την πνευμονική λειτουργία και τον αριθμό παροξύνσεων των ασθενών. Τέλος, οι ασθενείς έδειξαν την προτίμησή τους λιγότερο στην τεχνική της ορθοστατικής παροχέτευσης και κρούσης στο στήθος, απ' ότι στις υπόλοιπες τεχνικές (McIlwaine, et al., 2014).

### 3.2 Μεταμόσχευση

Η μεταμόσχευση πνευμόνων είναι η τελευταία θεραπευτική επιλογή για ασθενείς με τελικού σταδίου πνευμονική νόσο. Με τη μεταμόσχευση επεκτείνεται το προσδόκιμο ζωής των ασθενών και βελτιώνεται η ποιότητα ζωής τους. Η διαδικασία επιλογής των κατάλληλων ασθενών, κυρίως των παιδιών, αποτελεί αντικείμενο έντονης συζήτησης. Στην Ευρώπη δεν είναι συνηθισμένο για τα παιδιά με κυστική ίνωση να υπόκεινται σε μεταμόσχευση πνευμόνων εκτός και αν το προβλεπόμενο προσδόκιμο ζωής τους υπολογίζεται σε λιγότερο από δύο χρόνια, παρ' όλη τη μέγιστη ιατρική περίθαλψη που μπορεί να τους δοθεί. Αυτή η προσέγγιση βελτιώνει την αναλογία ρίσκο-όφελος. Η πενταετής επιβίωση μετά τη μεταμόσχευση για τα παιδιά είναι λιγότερη από 50%, με ελαφρώς καλύτερα αποτελέσματα στους ενήλικους (50% των μεταμοσχευμένων παρουσιάζουν εξαετή επιβίωση). Για τους ενήλικους η επιλογή της μεταμόσχευσης συνήθως προτείνεται όταν το FEV1 τους είναι λιγότερο από το 30% του προβλεπόμενου. Παρ' όλα αυτά η ηλικία, το φύλο, η λοίμωξη των πνευμόνων και ο αποικισμός τους από παθογόνα, καθώς επίσης και το ποσοστό απόκλισης του FEV1 επηρεάζουν την απόφαση για μεταμόσχευση. Η παρουσία ή απουσία διαφόρων παθογόνων όπως του βακτηρίου *B.ceracia* μπορεί να επηρεάσει το αποτέλεσμα και θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά την αξιολόγηση των υποψήφιων ασθενών για μεταμόσχευση. Η χρήση μη επεμβατικού μηχανικού αερισμού κατά τη διάρκεια της νύχτας μπορεί να βελτιώσει τα συμπτώματα του θώρακα που σχετίζονται με τον υποαερισμό κατά τη διάρκεια του ύπνου και την ποιότητα ζωής των ασ-

θενών με υπερκαπνία κατά τη διάρκεια της ημέρας, οι οποίοι βρίσκονται στη λίστα αναμονής για μεταμόσχευση πνευμόνων (O'Sullivan & Freedman, 2009).

Για ασθενείς κάτω των 18 ετών το Ίδρυμα Κυστικής Ίνωσης συνιστά παραπομπή για μεταμόσχευση πνευμόνων το αργότερο όταν ο FEV1 είναι κάτω από 50% και προβλέπεται ραγδαία επιδείνωση του ή όταν ο FEV1 είναι κάτω από 40% και προβλέπεται με δείκτες ότι επιδεινώνεται η κατάσταση ή όταν ο FEV1 είναι κάτω από 30% με βάση την πρόγνωση. Για ασθενείς μικρότερους και έως και 18 ετών το Ίδρυμα Κυστικής Ίνωσης συνιστά παραπομπή για μεταμόσχευση πνευμόνων το αργότερο όταν ο FEV1 είναι κάτω από 50% και προβλέπεται ραγδαία επιδείνωση του ή όταν ο FEV1 είναι κάτω από 50% και προβλέπεται με δείκτες ότι επιδεινώνεται η κατάσταση ή όταν ο FEV1 είναι κάτω από 40% με βάση την πρόγνωση.

Για τους ασθενείς με FEV1 κάτω από 40% προτείνεται ένα ετήσιο τεστ περιπάτου διάρκειας έξι λεπτών και εκτίμηση της ανάγκης για συμπληρωματικό οξυγόνο και λήψη αερίων αίματος για να διερευνηθεί αν απαιτείται η παραπομπή τους για μεταμόσχευση. Για τους ασθενείς άνω των 18 ετών και με FEV1 μικρότερο από 40% συνιστάται ηχοκαρδιογράφημα για τον έλεγχο πνευμονικής υπέρτασης.

Το Ίδρυμα Κυστικής Ίνωσης προτείνει μεταμόσχευση πνευμόνων, ανεξάρτητα από το ποσοστό του FEV1 όταν υπάρχουν δείκτες που υποδεικνύουν ραγδαία επιδείνωση όπως αν στο τεστ περιπάτου έξι λεπτών έχουν διανύσει οι ασθενείς απόσταση μικρότερη από 400 μέτρα ή αν έχουν υποξαιμία ή αν έχουν υπερκαρβία ή αν εμφανίζουν πνευμονική υπέρταση.

Για ενήλικους ασθενείς με δείκτη μάζας σώματος κάτω από 18 και FEV1 κάτω από 40%, στους οποίους πραγματοποιείται θεραπεία για τη βελτίωση της διατροφικής τους κατάστασης, επίσης συνιστάται μεταμόσχευση πνευμόνων. Επιπλέον, για ασθενείς με FEV1 κάτω από 40% και με πάνω από δύο επεισόδια παρόξυνσεων ετησίως τα οποία απαιτούν ενδοφλέβια αντιβιοτικά ή με ένα επεισόδιο παρόξυνσης που απαιτεί αερισμό θετικής πίεσης ανεξάρτητα από το FEV1 τους, συνιστάται η μεταμόσχευση. Ασθενείς με FEV1 κάτω από 40% και εκτεταμένη αιμόπτυση που απαιτούν εισαγωγή στη ΜΕΘ ή εμβολισμό βρογχικής αρτηρίας χρειάζονται επίσης μεταμόσχευση. Τέλος, ασθενείς με μικρό ανάστημα (κάτω από 162 cm) και γυναίκες, κυρίως οι νεότερες, είναι πιθανό να χρειαστούν μεταμόσχευση πνευμόνων παρ' όλο που προς το παρόν παρουσιάζουν φυσιολογικούς δείκτες (Turcios, 2019).

### 3.3 Αντιβιοτικά και αντιφλεγμονώδη

Η θεραπεία των πνευμόνων στην κυστική ίνωση είναι βασικός πυλώνας για τη διαχείριση της κλινικής πορείας της νόσου. Η διαδικασία καθαρισμού των αεραγωγών είναι το πρώτο πράγμα που μαθαίνεται στους γονείς των νεογνών που διαγιγνώσκονται με κυστική ίνωση, καθώς αυτή η διαδικασία θα πρέπει να γίνεται συστηματικά για το υπόλοιπο της ζωής τους. Παρ' όλα αυτά η χρήση και άλλων θεραπειών είναι απαραίτητη για τους ασθενείς, όπως η χορήγηση διαφόρων αντιβιοτικών.

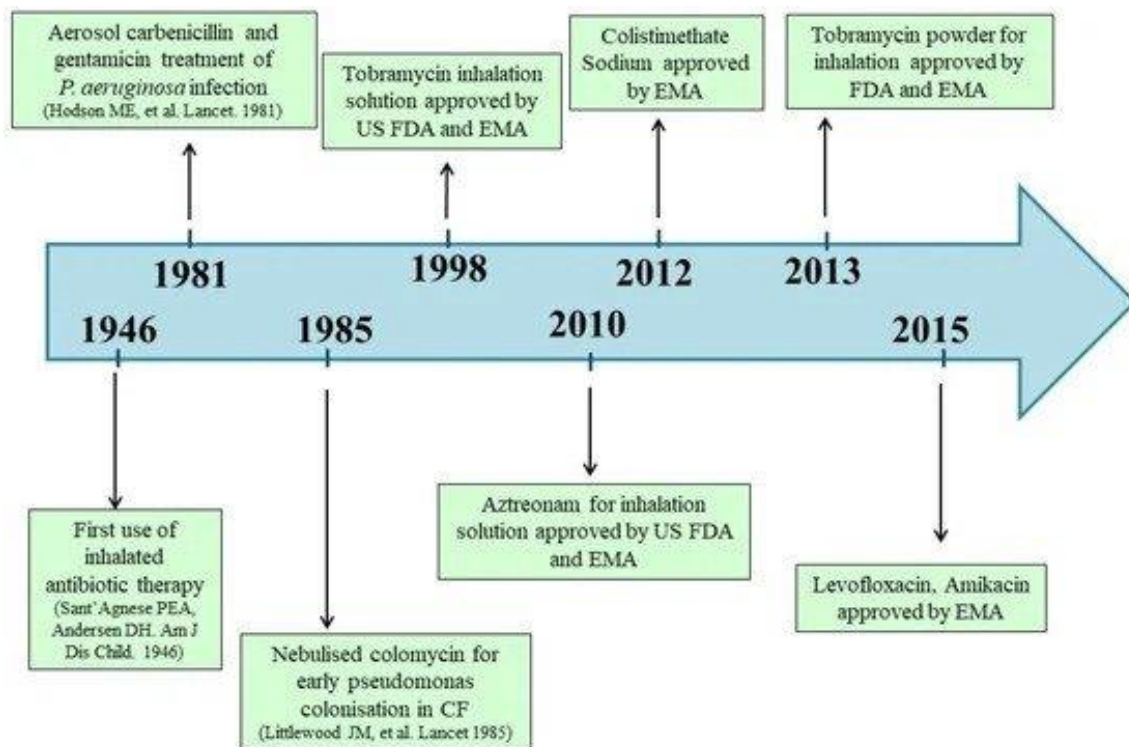
Η χορήγηση αντιβιοτικών από το στόμα χρησιμοποιείται προληπτικά σε μερικές χώρες για την αποφυγή λοίμωξης από τον *Staphylococcus aureus*, παρ' όλες τις ανησυχίες περί αυξημένου ρίσκου λοίμωξης από *Pseudomonas aeruginosa*. Μερικές μελέτες έχουν δείξει ότι η προληπτική χρήση αντιβιοτικών οδηγεί σε λιγότερες νοσηλείες στα νοσοκομεία, αλλά αυτό το γεγονός δεν επαρκεί από μόνο του για να δικαιολογήσει τη χρήση αυτή. Στα παιδιά οι συχνές λοιμώξεις θεραπεύονται με τη χρήση αντιβιοτικών που στοχεύουν κατά του *Staphylococcus aureus* και *Haemophilus Influenzae*. Κατά την παρουσία της πρώτης κιάλας αποικίας από *Pseudomonas aeruginosa* ή άλλου Gram αρνητικού μικροοργανισμού, οι περισσότεροι ιατροί συνταγογραφούν αντιβιοτικά με στόχο την ολοκληρωτική εκρίζωση του παθογόνου. Μια αρχική αγωγή καθιερώθηκε με τη χορήγηση εκ του στόματος σιπροφλοξασίνης και εισπνεόμενης κολιστίνης για τρεις μήνες. Μετέπειτα έρευνες πρότειναν την χορήγηση εισπνεόμενης τομπραμικίνης για ένα μήνα, η οποία απέδειξε ελαφρώς καλύτερα αποτελέσματα εκριζώνοντας την *Pseudomonas aeruginosa* στο 70-80% των περιστατικών. Και οι δύο θεραπείες φάνηκε να έχουν παρόμοια αποτελεσματικότητα, τόσο η χορήγηση σιπροφλοξασίνης και κολιστίνης όσο και η χορήγηση εισπνεόμενης τομπραμικίνης. Έτσι και οι δύο αγωγές συνιστώνται εξίσου για την αποτελεσματική θεραπεία από τους παθογόνους, με κυριότερη και πιο σημαντική την αντιμετώπιση της λοίμωξης από *Pseudomonas aeruginosa*.

Οι ασθενείς με κυστική ίνωση έχουν υποτροπιάζουσες παροξύνσεις. Πνευμονική παρόξυνση χαρακτηρίζεται ένα επεισόδιο κατά το οποίο υπάρχει αυξημένη συμπτωματολογία σε μια χρόνια κατάσταση, όπως βήχας και παραγωγή πτυέλων σε ασυνήθιστα αυξημένη συχνότητα και ποσότητα αντίστοιχα. Άλλα συμπτώματα αποτελούν η δύσπνοια, η κόπωση, η μειωμένη αντοχή κατά τη διάρκεια άσκησης και συστηματικά συμπτώματα που σχετίζονται με την οξεία φλεγμονώδη φάση της νόσου. Παρατηρείται επίσης μικρή αύξηση του βακτηριακού φορτίου και μείωση του όγκου της αναγκαστικής εκπνο-



ής που πραγματοποιείται σε ένα δευτερόλεπτο (FEV1) και άλλες μετρήσεις της πνευμονικής λειτουργίας όπως, αυξημένη CRP και αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων, και αύξηση των φλεγμονώδη βιοδεικτών όπως η ουδετερόφιλη ελαστάση των πτυέλων.

Μια ευρεία γκάμα θεραπειών βρέθηκε ότι μειώνουν τη συχνότητα των πνευμονικών παροξύνσεων. Κατά τη διάρκεια μιας κλινικής μελέτης η χορήγηση της δραστικής ουσίας δορνάση άλφα μείωσε τις παροξύνσεις και αποτέλεσε την πρώτη επιτυχημένη θεραπεία, έπειτα ακολούθησαν και άλλες θεραπείες με θετικά αποτελέσματα όπως τα εισπνεόμενα αντιβιοτικά τομπραμυκίνη, κολιστίνη, αζτρεονάμη, λεβοφλαξασίνη, υπέρτονος φυσιολογικός ορός, μαννιτόλη και η εκ του στόματος χορήγηση αζιθρομυκίνη. Αυτές οι θεραπείες γενικά έχουν μια μέτρια βελτίωση του FEV1 της τάξης του 3-5% και σημαντική μείωση στη συχνότητα των πνευμονικών παροξύνσεων.



Εικόνα 6: Χρήση αντιβιοτικών για την αντιμετώπιση της κυστικής ίνωσης.

Τα επεισόδια των παροξύνσεων συχνά αναπτύσσονται για αρκετές ημέρες και αντιμετωπίζονται με αντιβιοτικά και αυξημένο καθαρισμό των αεραγωγών. Για λοιμώξεις από τον *Staphylococcus aureus* και τον *Haemophilus influenzae* χορηγούνται συνήθως αντιβιοτικά από το στόμα. Σε ασθενείς με χρόνιες λοιμώξεις από *Pseudomonas*

*aeruginosa* ή Gram αρνητικά βακτήρια, οι παροξύνσεις συχνά θεραπεύονται με τη χορήγηση ενδοφλέβιων αντιβιοτικών όπως πενικιλίνη, τρίτης γενιάς κεφαλοσπορίνες ή καρβαπενέμες σε συνδυασμό με αμινογλυκοσίδες ή πολυμυξίνες. Η θεραπεία με αυτά τα αντιβιοτικά συνιστάται για 14 ημέρες αν και δεν υπάρχουν ισχυρά αποδεικτικά στοιχεία που να υποστηρίζουν ότι αυτή η διάρκεια επαρκεί για την αντιμετώπιση των παθογόνων. Μερικοί ασθενείς δεν ωφελούνται από τις θεραπείες αυτές με αποτέλεσμα να χρειάζονται υποστήριξη με διατροφή, συμπληρωματικό οξυγόνο και σε μερικές περιπτώσεις να απαιτείται μη επεμβατική μηχανική αναπνευστική υποστήριξη. Η αποτελεσματική αντιμετώπιση των παροξύνσεων είναι σημαντική, διότι κατά το 25% περίπου των περιπτώσεων δεν υποχωρούν και η αυξημένη συχνότητάς τους σχετίζεται με μεγαλύτερη μείωση της πνευμονικής λειτουργίας, μειωμένη ποιότητα ζωής και χαμηλό ποσοστό συνολικής επιβίωσης (Elborn, 2016).

Δύο είναι οι γενικές στρατηγικές για τη μείωση της φλεγμονής στους πνεύμονες λόγω της κυστικής ίνωσης, η χορήγηση ευρέως φάσματος αντιφλεγμονωδών φαρμάκων ή πολλαπλών φαρμάκων που στοχεύουν ειδικά στους φλεγμονώδεις μεσολαβητές, όπως είναι τα κορτικοστεροειδή. Η πρώτη κλινική μελέτη στην οποία έγινε χρήση κορτικοστεροειδών ξεκίνησε το 1980, διήρκησε 4 χρόνια και περιελάμβανε 45 παιδιατρικούς ασθενείς με ήπια έως μέτρια πνευμονοπάθεια στους οποίους έγινε χορήγηση πρεδνιζόνης μέρα παρά μέρα (2mg/kg). Τα αποτελέσματα έδειξαν καλύτερη λειτουργία των πνευμόνων, αύξηση του σωματικού βάρους και λιγότερες εισαγωγές στα νοσοκομεία σε σχέση με τη χορήγηση placebo φαρμάκου. Σε μια επόμενη τετραετή κλινική μελέτη, συμμετείχαν 285 ασθενείς με κυστική ίνωση ηλικίας 6 έως 14 ετών με ήπια έως μέτρια πνευμονοπάθεια στους οποίους έγινε τυχαία επιλογή για χορήγηση πρεδνιζόνης ή placebo φαρμάκου μέρα παρά μέρα (1 mg/kg ή 2 mg/kg). Στην ομάδα στην οποία χορηγούνταν 2mg/kg πρεδνιζόνη έγινε διακοπή της μελέτης λόγω αυξημένων ανεπιθύμητων παρενεργειών. Στο τέλος της κλινικής μελέτης οι ασθενείς που λάμβαναν 1mg/kg πρεδνιζόνης μέρα παρά μέρα είχαν καλύτερη λειτουργία των πνευμόνων, κυρίως εάν είχαν μολυνθεί από *Pseudomonas aeruginosa*, αλλά επίσης είχαν αρκετές παρενέργειες που συνδέονταν με τα κορτικοστεροειδή. Το ποσοστό των ασθενών που μολύνθηκαν από *Pseudomonas aeruginosa* κατά τη διάρκεια των κλινικών δοκιμών και ύστερα από τη χορήγηση πρεδνιζόνης ήταν αυξημένο, αν και το ποσοστό των οξέων επιπλοκών παρέμεινε το ίδιο. Έξι χρόνια μετά την ολοκλήρωση της αρχικής κλινικής μελέτης στην οποία χορηγήθηκε

πρεδνιζόνη 1 mg/kg, παρουσιάστηκαν στους ασθενείς προβλήματα στην ανάπτυξή τους και το FEV1 παρέμεινε σταθερό στο ίδιο ποσοστό όπως και στους ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκε placebo φάρμακο, υποδηλώνοντας ότι όχι μόνο τα οφέλη της πρεδνιζόνης σταμάτησαν έπειτα από τη διακοπή της χορήγησής της αλλά και ότι οι πνεύμονες δεν αναπτύχθηκαν πλήρως όπως στο άλλο group των ασθενών. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι για τη διατήρηση της πνευμονικής λειτουργίας απαιτείται συνεχής χορήγηση πρεδνιζόνης, όμως δεδομένης της τοξικότητας αυτού του φαρμάκου και κατά συνέπεια όλης της ομάδας των κορτικοστεροειδών, δεν ενδείκνυται η χορήγηση αυτών σε ασθενείς με κυστική ίνωση. Τέλος, διάφορες ακόμη κλινικές μελέτες για τη χορήγηση εισπνεόμενων κορτικοστεροειδών διεξάχθηκαν οι οποίες έδειξαν να μην επιβράδυνση της μείωσης της λειτουργικότητας των πνευμόνων αλλά και μειωμένο σωματικό βάρος και ανάγκη χορήγησης ινσουλίνης στους ασθενείς. Λόγω λοιπόν έλλειψης θετικών αποτελεσμάτων η μακροχρόνια χρήση κορτικοστεροειδών δεν συνιστάται πια ως θεραπεία για τους ασθενείς με κυστική ίνωση.

Η ιβουπροφαίνη έχει επίσης ευρεία αντιφλεγμονώδη δράση. Σε μια κλινική μελέτη διάρκειας τεσσάρων ετών, ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκε μεγάλη δόση ιβουπροφαίνης δύο φορές την ημέρα εμφάνιζαν βραδύτερη μείωση της πνευμονικής λειτουργίας, καλύτερη διατήρηση του σωματικού βάρους, λιγότερες εισαγωγές στο νοσοκομείο και όχι αύξηση στις ανεπιθύμητες ενέργειες. Μια κλινική μελέτη, στον Καναδά, διάρκειας δύο ετών επίσης παρουσίασε θετικά αποτελέσματα στη λειτουργία των πνευμόνων ύστερα από τη χρήση ιβουπροφαίνης και στατιστικά από το εθνικό μητρώο ασθενών με κυστική ίνωση έδειξαν μείωση του ετήσιου FEV1 κατά 29%. Βέβαια παρ' όλες τις θετικές επιδράσεις η χορήγηση ιβουπροφαίνης συνδέεται με γαστρεντερική αιμορραγία, μια σπάνια σε συχνότητα παρενέργεια. Γενικότερα όμως τα οφέλη της ιβουπροφαίνης υπερτερούν των κινδύνων καθώς μια υψηλή δόση του φαρμάκου μπορεί να επιβραδύνει την εξέλιξη της πνευμονικής νόσου σε άτομα με κυστική ίνωση και ιδιαίτερα στα παιδιά. Η ιβουπροφαίνη θεωρείται πλέον ως το μόνο αντιφλεγμονώδες φάρμακο που συνιστάται για χρόνια χρήση στην κυστική ίνωση (Cantin, et al., 2014;).

### 3.4 Φαρμακομόρια και αναφορά σε κλινικές μελέτες

Η πρόσφατη ανάπτυξη φαρμάκων που διορθώνουν το βασικό ελάττωμα στη λειτουργία της πρωτεΐνης CFTR έχει βελτιώσει σημαντικά την προοπτική για την αποτελεσματική

τροποποιητική θεραπεία της νόσου της κυστικής ίνωσης. Υπάρχουν δύο προσεγγίσεις που προσπάθησαν να αποδώσουν αποτελεσματικές τροποποιητικές θεραπείες της νόσου. Η πρώτη προσέγγιση αποτελεί τη χρήση μικρών μορίων που ρυθμίζουν την πρωτεΐνη CFTR και αποκαθιστούν τη δυσλειτουργία στο δίαυλο μεταφοράς ιόντων. Η δεύτερη προσέγγιση αποτελεί τη χρήση γονιδιακών θεραπειών που διορθώνουν τη μετάλλαξη σε επίπεδο DNA ή RNA και παράγουν λειτουργική πρωτεΐνη η οποία αντικαθιστά τη μεταλλαγμένη. Η προσέγγιση αυτή θα αναλυθεί στο επόμενο κεφάλαιο (Elborn, 2016).

Οι αρχικές θεραπείες για την κυστική ίνωση επικεντρώθηκαν στις επιπλοκές της νόσου, όμως η κεντρική αιτία της παθογένειας ήταν η διαταραγμένη μεταφορά ιόντων χλωρίου κάτι που αργότερα οδήγησε στην ανάπτυξη φαρμακομορίων που ρυθμίζουν τη δυσλειτουργία αυτή στοχεύοντας στο υποκείμενο ελάττωμα. Αυτή τη στιγμή υπάρχουν δύο κατηγορίες διαμορφωτών CFTR για τη θεραπεία ασθενών με κυστική ίνωση, οι διορθωτές που αυξάνουν την επεξεργασία της ελαττωματικής πρωτεΐνης και τη διακίνησή της στην επιφάνεια του κυττάρου και οι ενισχυτές που βελτιώνουν τη δραστηριότητα της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης στην επιφάνεια των κυττάρων (Hoy, 2019).

Το ivacaftor, ένας ενισχυτής, αναπτύχθηκε από τη φαρμακευτική Vertex και εγκρίθηκε για κυκλοφορία από τον FDA το 2012 για χορήγηση σε παιδιά άνω των 6 ετών τα οποία έχουν μια σπάνια μετάλλαξη (Rafeeq & Sayed Murad, 2017). Το φάρμακο αυτό (VX-770) ταυτοποιήθηκε μέσω διαλογής υψηλής απόδοσης και στη συνέχεια τροποποιήθηκε έτσι ώστε να βελτιστοποιηθεί η θεραπευτική του δράση. Προκλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι το ivacaftor διορθώνει τη δυσλειτουργία του διαύλου CFTR στις περισσότερες μεταλλάξεις της ομάδας 3, της ομάδας 4 και σε κάποιες άλλες μεταλλάξεις που επηρεάζουν τη λειτουργία των πνευμόνων και του βλεννογόνου του. Μια σειρά από επόμενες μελέτες απέδειξε ότι το ivacaftor έχει μεγάλα ποσοστά θετικών αποτελεσμάτων σε ασθενείς με μεταλλάξεις της ομάδας 3 και κυρίως με τις μεταλλάξεις Gly551Asp (γνωστή ως G551D), Gly551Ser, Gly178Arg, Gly1244Glu, Gly1349Asp, Ser549Asn, Ser549Arg, Ser1251Asn και Ser1255Pro. Λίγο μετά από αυτή την ιστορική ανακάλυψη, η χρήση του ivacaftor επεκτάθηκε και σε μεταλλάξεις της ομάδας 4 και συγκεκριμένα στις μεταλλάξεις Arg117His και R117H (Elborn, 2016). Το ivacaftor, με την εμπορική ονομασία Kalydeco, ήταν το πρώτο επιτυχημένο φάρμακο για την αποκατάσταση της ελαττωματικής πρωτεΐνης και αποδείχθηκε πολύ αποτελεσματικό σε δύο μεγάλες κλινικές δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν, την STRIVE και την ENVISION (Rafeeq & Sayed Murad, 2017). Σημειώθη-

κε βελτίωση στο FEV1, στο σωματικό βάρος των ασθενών, στην ποιότητα ζωής τους, στην αναπνευστική λειτουργία μειώνοντας τις πνευμονικές παροξύνσεις, στον καλύτερο έλεγχο του σακχαρώδη διαβήτη, στη λειτουργία του παγκρέατος, στις λοιμώξεις και στην απορρόφηση θρεπτικών συστατικών μέσω της διατροφής (Castellani & Assael, 2016). Σε σύγκριση με κλινικές μελέτες στις οποίες έγινε χορήγηση placebo φαρμάκου, αυτές με χορήγηση ivacaftor βελτίωσαν τη λειτουργία των πνευμόνων κατά 10%, μείωσαν τη συγκέντρωση χλωρίου στον ιδρώτα των ασθενών κατά 60mmol/L, βελτίωσαν την ποιότητα ζωής και μείωσαν τη συχνότητα πνευμονικών παροξύνσεων (Elborn, 2016). Πλέον ο FDA έχει εγκρίνει τη χορήγηση του Kalydeco και σε άλλες μεταλλάξεις, καθώς επίσης και σε παιδιά ηλικίας 2 έως 5 ετών με βάση μια επιτυχή κλινική μελέτη που διεξήχθη πρόσφατα, την KIWI. Η μετάλλαξη G551D έχει ως αποτέλεσμα ο δίαυλος CFTR να συμπεριφέρεται να είναι κλειστός, εμποδίζοντας την ομαλή μεταφορά ιόντων χλωρίου και υγρών, έτσι η χρήση του ivacaftor αυξάνει το χρόνο που παραμένει ανοιχτός ο δίαυλος. Βασικό μειονέκτημα όμως της θεραπείας αυτής αποτελεί το γεγονός ότι η μετάλλαξη G551D ανιχνεύεται μόνο στο 2,3% των ασθενών με κυστική ίνωση και έχει αποδειχθεί ότι δεν είναι αποτελεσματική στην περισσότερο κοινή μετάλλαξη, την F508del.

Το lumacaftor, ένας διορθωτής, φάνηκε πιο αποτελεσματικό έναντι της μετάλλαξης F508del, μία από τις πιο κοινές μεταλλάξεις που ανευρίσκεται σε ποσοστό 70% στην Ευρώπη και στο 1/3 των ασθενών στις ΗΠΑ. Αυτή η μετάλλαξη επηρεάζει τη θερμοκίνη σταθερότητα της πρωτεΐνης λόγω λανθασμένης αναδίπλωσης του NBD1, με αποτέλεσμα να παραμένει στο ενδοπλασματικό δίκτυο και σταδιακά να καταστρέφεται. Το lumacaftor βοηθάει στη μεταφορά της πρωτεΐνης στην κυτταρική μεμβράνη, όμως δεν είναι ικανό να διορθώσει την υποκείμενη δυσλειτουργία της.

Προτάθηκε λοιπόν ο συνδυασμός και των δύο αυτών φαρμάκων με την ονομασία Orkambi, για την επιδιόρθωση τόσο των ανωμαλιών του διαύλου όσο και της μεταφοράς της πρωτεΐνης. Στη φάση 2 των κλινικών μελετών χρησιμοποιήθηκαν ομόζυγοι αλλά και ετερόζυγοι ασθενείς άνω των 12 ετών για τη μετάλλαξη F508del, αλλά σημαντική βελτίωση φάνηκε μόνο στους ομόζυγους ασθενείς. Το Orkambi λοιπόν εγκρίθηκε πρόσφατα για χορήγησή του σε ομόζυγους ασθενείς άνω των 12 ετών με την μετάλλαξη F508del. Ο μηχανισμός δράσης του χωρίζεται σε δύο μέρη, το lumacaftor βοηθάει στη μεταφορά της ελαττωματικής πρωτεΐνης στη σωστή θέση της και το ivacaftor διορθώνει και ενισχύει τη δραστηριότητά της με αποτέλεσμα την αύξηση της αγωγιμότητας του δι-

αύλου για τη μεταφορά ιόντων χλωρίου και υγρών (Rafeeq & Sayed Murad, 2017). Δύο κλινικές μελέτες φάσης 3 του διορθωτή lumacaftor σε συνδυασμό με το ivacaftor δημοσιεύτηκαν πρόσφατα. Σε σύγκριση με φάρμακα placebo ο συνδυασμός lumacaftor και ivacaftor βελτίωσαν το FEV1 και μείωσαν τη συχνότητα πνευμονικών παροξύνσεων, αύξησαν το σωματικό βάρος των ασθενών και βελτίωσαν ελαφρώς την ποιότητα ζωής τους. Περίπου το 10% των ασθενών ανέφεραν σφίξιμο στο στήθος σε συνδυασμό με βρογχοσυστολές. Παρ' όλα αυτά, οι παρενέργειες αυτές αποκαταστάθηκαν μερικές βδομάδες μετά από τη χορήγηση της θεραπείας και μόνο πέντε ασθενείς αναγκάστηκαν να εγκαταλείψουν τη μελέτη λόγω των έντονων συμπτωμάτων. Η βελτίωση του FEV1 των ασθενών με το συνδυασμό φαρμάκων lumacaftor και ivacaftor ήταν χαμηλότερη απ' ότι κατά τη χορήγηση θεραπείας με το ivacaftor στους ασθενείς με τη μετάλλαξη Gly551Asp (3% και 10% αντίστοιχα). Παρ' όλα αυτά η επίδραση στη συχνότητα των πνευμονικών παροξύνσεων παρέμεινε η ίδια (30% και 40% μείωση αντίστοιχα). Στη φάση 2 των κλινικών μελετών η συγκέντρωση χλωρίου στον ιδρώτα των ασθενών έδειξε μείωση κατά 9mmol/L ύστερα από τη χορήγηση του συνδυασμού ivacaftor και lumacaftor, σε αντίθεση με τα 90mmol/L σε ασθενείς με τη μετάλλαξη Gly551Asp. Δύο μελέτες έχουν αναφέρει τις επιδράσεις της χρόνιας συγχορήγησης lumacaftor και ivacaftor σε κυτταρικές σειρές και έδειξαν ότι η συνδυαστική αυτή θεραπεία μειώνει τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης CFTR με τη μετάλλαξη Phe508del σε βρογχικές καλλιέργειες επιθηλιακών κυττάρων που εκτίθενται στα φάρμακα αυτά για 48 ώρες. Το ivacaftor παρεμβαίνει στη φαρμακολογική επιδιόρθωση της δυσλειτουργικής πρωτεΐνης CFTR σε συνδυασμό με το lumacaftor. Έχει βρεθεί επίσης ότι το ivacaftor μειώνει τη φυσιολογική λειτουργία της CFTR σε βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα. Ο μηχανισμός αυτής της παρεμπόδισης φαίνεται να οφείλεται στη μείωση της σταθερότητας του διορθωμένου διαύλου CFTR από το ivacaftor, κάτι το οποίο δε συμβαίνει στη μετάλλαξη Gly551Asp. Άλλα επιδιορθωτικά φάρμακα όπως το VX-661 (Vertex φαρμακευτική της Βοστώνης) γίνονται επίσης ασταθή από το ivacaftor, μειώνοντας έτσι τις λειτουργικές τους επιδράσεις στη CFTR. Αυτές οι μελέτες αναδεικνύουν το πόσο σημαντικές είναι οι επιδράσεις μεταξύ φαρμάκων και μεταξύ φαρμάκου και πρωτεΐνης για τη μελλοντική ανάπτυξη νέων φαρμακομοριών για την αντιμετώπιση της κυστικής ίνωσης (Elborn, 2016).

Πολλές ακόμα ενώσεις που εμφανίζουν τη σχέση διορθωτή/ενισχυτή έχουν ανακαλυφθεί και περνούν από διάφορες φάσεις κλινικών μελετών, όπως:

- 4PBA: ενισχύει τη μεταφορά ιόντων χλωρίου σε ασθενείς με τη μετάλλαξη F508del.
- VRT-532: διορθώνει τη δομική δυσλειτουργία της CFTR και αυξάνει την έκφραση και τη σταθερότητά της σε ασθενείς με τη μετάλλαξη F508del και G551D.
- N6022: αυξάνει την ποσότητα της CFTR πρωτεΐνης στο επιθήλιο και μειώνει τη φλεγμονή σε ομοζυγώτες ασθενείς με τη μετάλλαξη F508del.
- Ataluren: διευκολύνει τη ριβοσωμική προσπέλαση του mRNA που περιέχει ένα πρόωρο κωδικόνιο λήξης, με αποτέλεσμα την παραγωγή μιας πλήρους πρωτεΐνης (Rafeeq & Sayed Murad, 2017). Αυτό το μόριο έχει χρησιμοποιηθεί επίσης για την αντιμετώπιση της μυϊκής δυστροφίας Duchenne. Στη φάση 2 των κλινικών μελετών αυτό το φάρμακο έδειξε βελτίωση στην ηλεκτροφυσιολογία διόρθωση της λειτουργίας της CFTR και στο FEV1. Αυτά τα ευρήματα όμως δεν τεκμηριώθηκαν κατά τη φάση 3 των κλινικών μελετών, στην οποία έγινε αναφορά μόνο για μια μικρή βελτίωση του FEV1 σε ασθενείς οι οποίοι δεν έλαβαν αμινογλυκοσίδες. Οι αμινογλυκοσίδες επιδρούν στη ριβοσωμική προσπέλαση του mRNA και μπορεί να ευθύνονται για το γεγονός ότι οι ασθενείς που δεν έλαβαν εισπνεόμενες αμινογλυκοσίδες είχαν μεγαλύτερη επίδραση στη σταθεροποίηση του FEV1 σε σύγκριση με αυτούς που έλαβαν αμινογλυκοσίδες (Elborn, 2016).
- Tezacaftor: σε συνδυασμό με το ivacaftor μετακινεί την ελαττωματική πρωτεΐνη στη σωστή της θέση.
- Riociguat: συμμετέχει στην έκφραση της πρωτεΐνης CFTR με θετικά αποτελέσματα, όμως ακόμα βρίσκεται στο στάδιο 2 των κλινικών δοκιμών.
- QBW251: αποτελεί ενισχυτή για τη δυναμική του διαύλου, δηλαδή την αύξηση του ανοίγματος του διαύλου χωρίς να επηρεάζει τη σταθερότητα της μεμβράνης της πρωτεΐνης, και παρουσιάζει ίδια δράση με αυτή του ivacaftor.
- N91115: αυξάνει τα επίπεδα της S-νιτροζο-γλουταθειόνης η οποία είναι μειωμένη στους ασθενείς με κυστική ίνωση και φαίνεται πως αυξάνει και την ποσότητα της πρωτεΐνης CFTR.
- QR-010: είναι ένα αντινοσηματικό (antisense) ολιγονουκλεοτίδιο που αποσκοπεί στη διόρθωση του ελαττωματικού mRNA της πρωτεΐνης.
- PGM169/GL67A: είναι ένας μη ικός μεταφορέας του γονιδίου CFTR, ο οποίος έδειξε σημαντική βελτίωση της πνευμονικής λειτουργίας.

- PT1428: θεωρείται υποψήφιος ενισχυτής της πρωτεΐνης CFTR και παρ' όλο που βρίσκεται στη φάση 1 των κλινικών δοκιμών φαίνεται πολλά υποσχόμενο.
- Duramycin: ενεργοποιεί το διάλυτο ιόντων ασβεστίου CaCC στο αναπνευστικό επιθήλιο και παρουσιάζει βελτίωση του FEV1 στο στάδιο 2 των κλινικών δοκιμών.
- PDE5 αναστολέας: σε μελέτη σε πειραματόζωα που έφεραν τη μετάλλαξη F508del έδειξε αυξημένη μεταφορά ιόντων χλωρίου στο βλεννογόνο του πνεύμονα και μείωση της ελαστάσης των ουδετερόφιλων στα πτύελα (Rafeeq & Sayed Murad, 2017).

Οι διορθωτές και οι ενισχυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό για την καλύτερη ενίσχυση της δραστηριότητας της CFTR πρωτεΐνης. Αν και ο συνδυασμός ενός διορθωτή (lumacaftor ή tezacaftor) με έναν ενισχυτή (ivacaftor) έδειξε θετικά αποτελέσματα σε ομόζυγους ασθενείς της μετάλλαξης F508del, αυτό δε συνέβη και για τους ασθενείς που ήταν ετερόζυγοι για τη μετάλλαξη F508del ή άλλες μεταλλάξεις που επηρεάζουν τη λειτουργία της πρωτεΐνης, στους οποίους δε παρατηρήθηκε βελτίωση της κλινικής τους εικόνας. Ένας συνδυασμός του διορθωτή tezacaftor και του ενισχυτή ivacaftor με τον νέας γενιάς διορθωτή elexacaftor (γνωστό με την εμπορική ονομασία Trikafta) πήρε έγκριση για δοκιμή στις ΗΠΑ τον Οκτώβριο του 2019 για τη χορήγησή του σε ασθενείς με κυστική ίνωση άνω των 12 ετών που είχαν τουλάχιστον μία μετάλλαξη F508del στο γονίδιο CFTR. Ο τριπλός αυτός συνδυασμός αναπτύχθηκε από την φαρμακευτική Vertex και είναι ο πρώτος στο είδος του για τη θεραπεία της πιο κοινής μετάλλαξης για την κυστική ίνωση. Η προτεινόμενη δοσολογία είναι δύο ταμπλέτες Trikafta (με κάθε μία να περιέχει 100mg elexacaftor, 75mg ivacaftor, 50mg tezacaftor) κάθε πρωί και μία ταμπλέτα ivacaftor 150mg περίπου 12 ώρες μετά σε συνδυασμό με κάποιο λιπαρό φαγητό ή γαλακτοκομικά προϊόντα με πλήρη λιπαρά.

Τόσο το elexacaftor όσο και το tezacaftor αυξάνουν την ποσότητα της F508del πρωτεΐνης που φθάνει στην κυτταρική επιφάνεια διευκολύνοντας τη διακίνησή της. Καθώς κάθε φάρμακο δεσμεύεται σε διαφορετικό σημείο στην πρωτεΐνη, η ταυτόχρονη χορήγησή τους έχει αθροιστική δράση. Το ivacaftor ενισχύει τη δραστηριότητα της CFTR πρωτεΐνης στην κυτταρική επιφάνεια αυξάνοντας την πιθανότητα ανοίγματος του διαύλου και επομένως τη μεταφορά ιόντων χλωρίου και άλλων υγρών. Η συνδυασμένη δράση του elexacaftor, του ivacaftor και του tezacaftor αυξάνει την ποιότητα και τη λειτουργία της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης στην επιφάνεια των κυττάρων, με τελικό αποτέλεσμα την αυξημένη δραστηριότητά της.



Σε βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα που προέρχονται από ασθενείς άνω των 18 ετών με κυστική ίνωση και ετερόζυγους ή ομόζυγους για τη μετάλλαξη F508del διενεργήθηκε η πρώτη μεγάλη κλινική μελέτη φάσης 2 (μελέτη 001). Η χρήση του elexacaftor αύξησε την έκφραση της ώριμης πρωτεΐνης και ο συνδυασμός elexacaftor με tezacaftor με ή χωρίς την παρουσία του ivacaftor, αύξησε σημαντικά τα επίπεδα της ώριμης CFTR πρωτεΐνης και τη μεταφορά ιόντων χλωρίου μέσω του διαύλου σε σύγκριση με το συνδυασμό ivacaftor/tezacaftor. Αξίζει να σημειωθεί ότι η προσθήκη του ivacaftor στο elexacaftor σε συνδυασμό με το tezacaftor είχε ως αποτέλεσμα αύξηση στη μεταφορά των ιόντων χλωρίου κατά 1,4-3,1 φορές περισσότερο, απ' ό,τι το elexacaftor σε συνδυασμό με το ivacaftor, ή το elexacaftor σε συνδυασμό με το tezacaftor ή το tezacaftor μαζί με το ivacaftor. Οι βελτιώσεις στη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης φαίνονται από τη μείωση της τιμής της συγκέντρωσης χλωρίου στον ιδρώτα των ασθενών κατά την τέταρτη εβδομάδα της κλινικής μελέτης. Κατά τη διάρκεια μιας παγκόσμιας κλινικής μελέτης φάσης 3 (μελέτη 002) 24<sup>wv</sup> εβδομάδων, χορηγήθηκε σε ασθενείς άνω των 12 ετών, οι οποίοι ήταν ετερόζυγοι για τη μετάλλαξη F508del, ο συνδυασμός elexacaftor/ivacaftor/tezacaftor και παρουσιάστηκε σημαντική μείωση της συγκέντρωσης του χλωρίου στον ιδρώτα τους κατά τη διάρκεια της 4<sup>ης</sup> εβδομάδας της μελέτης σε σύγκριση με ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκε placebo φάρμακο. Αυτή η μείωση που παρατηρήθηκε διήρκεσε μέχρι την 24<sup>η</sup> εβδομάδα της μελέτης. Ο τριπλός συνδυασμός των φαρμάκων αυτών επίσης μείωσε σημαντικά τις συγκεντρώσεις χλωρίου στον ιδρώτα των ασθενών σε σύγκριση με την απλή χορήγηση ivacaftor/tezacaftor, σε ασθενείς άνω των 12 ετών ομόζυγους για τη μετάλλαξη F508del κατά τη διάρκεια μιας άλλης κλινικής μελέτης φάσης 3 (μελέτη 003) διάρκειας 4<sup>wv</sup> εβδομάδων. Συμπερασματικά η συγκέντρωση χλωρίου στον ιδρώτα των ασθενών στο τέλος των κλινικών μελετών (24<sup>η</sup> εβδομάδα και 4<sup>η</sup> εβδομάδα) ήταν 57,9 mmol/L και 48 mmol/L (αντίστοιχα) στους ασθενείς που έλαβαν το συνδυασμό των τριών φαρμάκων, ενώ σε αυτούς που έλαβαν το συνδυασμό ivacaftor/tezacaftor ήταν περίπου 92,5 mmol/L και τέλος σε όσους έλαβαν placebo θεραπεία η συγκέντρωση ήταν 102,4 mmol/L (Hoy, 2019).

#### 3.4.1 Κόστος Θεραπείας

Το κόστος για την περίθαλψη των ασθενών με κυστική ίνωση (συμπεριλαμβανομένων: του εξοπλισμού, των διατροφικών αναγκών και των θεραπειών συντήρησης) είναι πολύ

μεγάλο (Lommatzsch & Taylor-Cousar, 2018). Το κόστος, ανέρχεται στα 150.000 - 250.000€ ανά ασθενή ετησίως. Γι' αυτό το λόγο, αν και έχουν πάρει έγκριση και τα τρία φάρμακα από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων, η αποζημίωσή τους από το κράτος καθυστερεί σε πολλές χώρες. Ακόμα και το Kalvdeco που παρέχει τεράστια οφέλη σε ασθενείς με μεταλλάξεις της ομάδας 3, δε χρηματοδοτείται από τα συστήματα υγείας στην Πορτογαλία, στις περισσότερες χώρες της Ανατολικής Ευρώπης, ακόμα και στη Νέα Ζηλανδία. Καθώς η αναλογία οφέλους και κόστους αυξάνεται για τον τριπλό συνδυασμό των φαρμάκων (Trikafta) και πολλές φαρμακευτικές εταιρίες ετοιμάζουν την παραγωγή νέων διαμορφωτών, το κόστος της θεραπείας ενδέχεται μελλοντικά να μειωθεί (De Boeck, 2020).

#### 3.4.2 Επιδράσεις των διαμορφωτών στο μικροβίωμα

Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι είτε μόνα τους είτε σε συνδυασμό αυτά τα φάρμακα ασκούν αντιμικροβιακή δράση τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Για παράδειγμα το ivacaftor έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τη βιωσιμότητα και την ανάπτυξη των *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae* και *Staphylococcus aureus*, καθώς επίσης έχει φανεί να έχει ενισχυμένη δραστηριότητα παρουσία αντιβιοτικών. Παρόμοια αποτελέσματα έδειξαν και δύο άλλες μελέτες, όπου το ivacaftor μόνο του ή σε συνδυασμό με σιπροφλοξασίνη έδειξε την ίδια αντιμικροβιακή δράση ενάντια στους ίδιους παθογόνους. Αξίζει να σημειωθεί ότι το μικροβίωμα σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με ivacaftor παρουσίασε μείωση στον αποικισμό από *Pseudomonas aeruginosa*, χωρίς όμως την πλήρη εκρίζωσή της και ύστερα από την ολοκλήρωση της θεραπείας το ποσοστό του παθογόνου αυτού αυξήθηκε ξανά (Scialo, et al., 2021).

Στο εντερικό μικροβίωμα το ivacaftor αυξάνει τα επίπεδα του Akkermansia, ενός ευεργετικού βακτηρίου που εμπλέκεται στην προστασία του βλεννογόνου και μειώνει τα εντεροβακτηρίδια, τα οποία συσχετίζονται με μειωμένη καλπροτεκτίνη των κοπράνων, έναν δείκτη φλεγμονής. Ενώ στο μικροβίωμα του πνεύμονα εμφανίζονται σημαντικές θετικές αλλαγές μέσα σε 48 ώρες ύστερα από τη χορήγηση του ivacaftor, όπως μείωση της *Pseudomonas* και αύξηση σε σχετική αφθονία των ενδογενών ειδών (*Streptococcus*, *anaerobes*). Οι μελέτες έδειξαν αρνητική συσχέτιση μεταξύ της μικροβιακής ποικιλομορφίας και της φλεγμονής του αναπνευστικού και θετική συσχέτιση μεταξύ του αυξημένου μικροβιώματος και του FEV1 (Françoise & Héry-Arnaud, 2020).

Η κατανόηση του πώς και εάν αυτοί οι διαμορφωτές του CFTR επηρεάζουν άμεσα το μικροβίωμα των ασθενών με κυστική ίνωση έχει πολλές κλινικές επιπτώσεις. Για παράδειγμα, εάν η διόρθωση της λειτουργίας του CFTR θα αποκαταστήσει την ποικιλομορφία του μικροβιώματος και θα μειώσει το φορτίο των παθογόνων και στη συνέχεια θα αξιολογήσει τη σύνθεση του μικροβιώματος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σαν διαγνωστικό εργαλείο για την παρακολούθηση της σοβαρότητας της νόσου και την εξέλιξή της. Εάν όμως αυτό δε συνέβαινε τότε θα ξέραμε ότι η αποκατάσταση της λειτουργίας του CFTR δεν επαρκεί και η αποκατάσταση της ποικιλότητας του μικροβιώματος θα μπορούσε να αποτελεί το κλειδί για την αποκατάσταση της λειτουργίας των πνευμόνων. Τέλος εάν τα φορτία των παθογόνων δεν μειώνονταν, τότε η αντιβιοτική θεραπεία σε συνδυασμό με αυτά τα φάρμακα θα εξακολουθούσε να είναι απαραίτητη (Scialo, et al., 2021).

## Κεφάλαιο 4: Νεότερα δεδομένα στη θεραπεία της κυστικής ίνωσης

Η επιδιόρθωση γονιδίων έχει μπει στην κλινική πράξη για τη θεραπεία διαφόρων αιματολογικών παθήσεων αλλά και του καρκίνου, με τη χρήση αδενοϊών και αδενοσχετιζόμενων ιών. Επιπλέον, η ταχύτατη ανάπτυξη των τεχνικών του συστήματος CRISPR και τα ενθαρρυντικά προκλινικά και κλινικά αποτελέσματα υποδηλώνουν μια επερχόμενη ακόμη μεγαλύτερη και ευρεία χρήση της τεχνολογίας αυτής για τη θεραπεία ακόμα και άλλων διαφόρων παθήσεων. Τέλος, οι επιγενετικές τροποποιήσεις ίσως είναι αυτές που θα μπορέσουν να ενώσουν τον κρίκο που λείπει μεταξύ των κληρονομικών παραγόντων και των φαινοτυπικών διακυμάνσεων στην κυστική ίνωση (Maule, et al., 2020).

### 4.1 Ιικοί και μη ιικοί φορείς

Οι ιοί έχουν εξελιχθεί με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να μολύνουν αποτελεσματικά τον ξενιστή μεταφέροντας το γενετικό τους υλικό σε αυτόν. Επομένως, οι ιοί οι οποίοι έχουν τροποποιηθεί ώστε να μην αποτελούν κίνδυνο έναντι του ξενιστή, αποτελούν ισχυρά εργαλεία για την αποτελεσματική μεταφορά θεραπευτικών γονιδίων στα όργανα στόχους. Ωστόσο υπάρχουν ιικοί φορείς οι οποίοι εμφανίζουν κάποιους περιορισμούς, όπως χαμηλή ικανότητα μεταφοράς DNA, ακριβή και περίπλοκη παραγωγή τους και θέματα ασφάλειας. Επιπλέον, το ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί να αναγνωρίσει και να καταπολεμήσει τους ιικούς φορείς, κάτι το οποίο περιορίζει την αποτελεσματικότητά τους.

Έχουν γίνει μελέτες σε μια ευρεία γκάμα ιικών φορέων οι οποίοι σχετίζονται με τη μεταφορά γονιδίων στους πνεύμονες και έχουν φτάσει ακόμα και σε κλινικές δοκιμές για την αντιμετώπιση της κυστικής ίνωσης. Τέτοιοι ιικοί φορείς είναι οι αδενοϊοί (AV), οι αδενοσχετιζόμενοι ιοί (adeno-associated viral ή AAV) και οι λεντιοί (lentiviruses).

Η πρώτη κλινική δοκιμή με γονιδιακή θεραπεία για την κυστική ίνωση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αδενοϊών. Οι αδενοϊοί παραμένουν επισωματικοί και δεν ενσωματώνονται στο γονιδίωμα του ξενιστή, όμως ο κύριος περιορισμός τους είναι ότι μπορούν να προκαλέσουν φλεγμονώδεις αποκρίσεις στον ξενιστή οργανισμό. Στην πρώτη κλινική δοκιμή ο Zabner και οι συνεργάτες του χορήγησαν τροποποιημένους αδενοϊούς σε τρεις μόνο ασθενείς, όμως αργότερα πραγματοποιήθηκαν εννιά ακόμη κλινικές δοκι-

μές, κατά το χρονικό διάστημα 1993-2001. Αυτές οι μελέτες έδειξαν χαμηλά επίπεδα μεταφοράς γονιδίων και η αποτελεσματικότητα ήταν χαμηλότερη από ότι είχαν προβλέψει αρχικά. Επιπλέον η χορήγηση αδενοϊών προκάλεσε κάποιες παρενέργειες όπως δοσοεξαρτώμενη φλεγμονή των πνευμόνων και ανοσοαποκρίσεις που επηρέασαν την αποτελεσματικότητα της θεραπείας μετά την επαναχορήγησή τους.

Οι αδενο-σχετιζόμενοι ιικοί φορείς παρουσιάζουν αρκετά επιθυμητά χαρακτηριστικά σχετικά με τη μεταφορά γονιδίων, όπως ευρύ τροπισμό στους ιστούς, υψηλή απόδοση μεταγωγής και μακροχρόνια και εμμένουσα επισωματική έκφραση. Επιπλέον, ο αδενο-σχετιζόμενος ιός άγριου τύπου δεν σχετίζεται με καμία γνωστή ανθρώπινη ασθένεια και οι ανασυνδυασμένοι αδενο-σχετιζόμενοι ιικοί φορείς έχουν δείξει καλό προφίλ ασφάλειας σε διάφορες κλινικές δοκιμές. Όμως οι φορείς αυτοί παρουσιάζουν και κάποια μειονεκτήματα, με πιο σημαντικό τη χαμηλή χωρητικότητα DNA που μπορούν να αποθηκεύσουν στο δικό τους DNA (μικρότερη από 5Kb). Από το 1999 έως και το 2007 πραγματοποιήθηκαν έξι κλινικές δοκιμές με τη χρήση φορέων AAV για τη γονιδιακή θεραπεία της κυστικής ίνωσης. Στη φάση 1 των κλινικών δοκιμών η χορήγηση χαμηλής δόσης φορέων AAV στην αναπνευστική οδό ήταν ασφαλής και ανεκτή από τον οργανισμό των ασθενών, όμως μεταγενέστερες χορηγήσεις μεγαλύτερων δόσεων σε μελέτη εκατό ασθενών δεν παρουσίασε βελτίωση της λειτουργίας των πνευμόνων.

Οι μη ενσωματωμένοι ιικοί φορείς όπως οι αδενοϊοί ή οι αδενο-σχετιζόμενοι ιοί έχουν οδηγήσει σε σημαντικές προόδους στον τομέα της γονιδιακής θεραπείας της κυστικής ίνωσης. Ωστόσο αυτά τα επισωματικά συστήματα έκφρασης μπορεί να παρουσιάζουν κάποιους περιορισμούς, όπως σταδιακή μείωση της έκφρασης των διαγονιδίων και ανοσοαποκρίσεις του ξενιστή ύστερα από επαναχορήγησή τους. Γι' αυτό η χρήση λεντιϊκών φορέων έχει κινήσει το ενδιαφέρον των ερευνητών τα τελευταία χρόνια σχετικά με τη γονιδιακή θεραπεία της κυστικής ίνωσης και από τις τελευταίες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε πειραματόζωα (ποντίκια) έχει αποδειχθεί ότι διατηρούν σταθερή την έκφραση του διαγονιδίου με την πάροδο του χρόνου στον αεραγωγό των ποντικών. Οι λεντιοί ανήκουν στην οικογένεια των ρετροϊών, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους για την αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε DNA. Επιπλέον περιλαμβάνουν ευρύ τροπισμό, επίμονη έκφραση του διαγονιδίου, ικανότητα μόλυνσης τόσο διαιρούμενων όσο και μη διαιρούμενων κυττάρων και απουσία έκφρασης των πρωτεϊνών του ιού. Αν και ο ανασυνδυασμένος ιός ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) χρησιμοποιεί-

ται συχνότερα, έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες και με άλλους ιούς ανοσοανεπάρκειας όπως του πιθήκου (SIV), αιλουροειδών (FIV) και ιπποειδών (EIAV).

Οι μη ιικοί φορείς θεωρούνται ασφαλέστεροι, πιο φθηνοί και πιο εύκολοι στην παραγωγή τους σε σύγκριση με τους ιικούς φορείς. Αν και οι ιικοί φορείς εξακολουθούν να κυριαρχούν λόγω της υψηλότερης αποτελεσματικότητας μεταγωγής, οι μη ιικοί φορείς έχουν τις προοπτικές να ξεπεράσουν πολλούς από τους περιορισμούς των ιικών φορέων από τη στιγμή που μπορούν να παραχθούν σε μεγάλες ποσότητες, με χαμηλό κόστος και υψηλή αναπαραγωγικότητα. Επιπλέον είναι αρκετά σταθεροί για να αποθηκευτούν, μπορούν να χορηγηθούν επανειλημμένα με χαμηλή ανοσοαπόκριση και το μέγεθος του γενετικού υλικού που μπορούν να μεταφέρουν είναι πρακτικά απεριόριστο. Οι περισσότεροι από τους μη ιικούς φορείς βασίζονται σε κατιονικά λιπίδια και πολυμερή, καθώς επίσης και σε πεπτίδια, τα οποία σχηματίζουν συμπιεσμένα νανοσωματίδια DNA. Αυτά τα σκευάσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μεταφορά θεραπευτικών γονιδίων σε συγκεκριμένα όργανα στόχους ή κυτταρικούς τύπους και να προσπεράσουν αρκετούς εξωκυττάριους και ενδοκυττάριους φραγμούς. Οι μη ιικοί φορείς σχηματίζουν συμπυκνωμένα συμπλέγματα με το αρνητικά φορτισμένο DNA μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, δημιουργώντας συμπλέγματα μη ιικού DNA που προστατεύουν τα νουκλεϊκά οξέα από την ενζυματική αποικοδόμηση και διευκολύνουν την κυτταρική απορρόφηση. Στην παρούσα φάση ο κύριος χρησιμοποιούμενος μη ιικός φορέας για τη γονιδιακή θεραπεία της κυστικής ίνωσης, που βασίστηκε σε κλινικές δοκιμές, είναι ο GL67A, ένα κατιονικό λιπίδιο, ο οποίος σχεδιάστηκε για να διευκολύνει την ενδοσωμική διαφυγή του πλασμιδιακού DNA και για να είναι σταθερός κατά τη χορήγησή του με αερόλυμα στους πνεύμονες. Άλλα γνωστά κατιονικά λιπίδια όπως το DOTMA, το DOPE και το DOTAP έχουν μελετηθεί για την ανάπτυξη μη ιικών σχηματισμών για τη γονιδιακή θεραπεία της κυστικής ίνωσης. Αν και δεν έχουν παρατηρηθεί σημαντικά θέματα ασφάλειας κατά τη ρινική χορήγηση αυτών των σχηματισμών σε ασθενείς των κλινικών δοκιμών, η αποτελεσματικότητα της επιμόλυνσης ήταν χαμηλή και τα σκευάσματα αυτά αποσταθεροποιήθηκαν μετά τη χορήγηση του αερολύματος.

Τα μη ιικά σκευάσματα που βασίζονται σε πολυμερή, όπως η πολυαιθυλενιμίνη (PEI) η οποία είναι μία πολλά υποσχόμενη υποψήφια ουσία, δεν έχουν φτάσει ακόμα σε επίπεδο κλινικών δοκιμών. Ένας σημαντικός περιορισμός του σκευάσματος PEI είναι ότι είναι δύσκολο να παρασκευαστεί σε υψηλές συγκεντρώσεις πλασμιδιακού DNA, όμως η

δομή του PEI είναι τέτοια ώστε να μπορεί να τροποποιηθεί για να αυξήσει την αποδοτικότητα στη μεταφορά γονιδίων.

Μεταξύ των μη ικών σκευασμάτων που βασίζονται σε πεπτίδια, το 30μερές πεπτίδιο λυσίνης που υποκαταστάθηκε από πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG-CK30) έχει αναδειχθεί ως ενδιαφέρουσα επιλογή, λόγω της μη ανοσογονικής του φύσης και επειδή ενισχύει την κυτταρική πρόσληψη, όμως χρειάζεται περαιτέρω βελτιστοποίηση της σύνθεσής του έτσι ώστε να καταστεί κατάλληλο για χορήγηση στους πνεύμονες με τη μορφή αερολύματος.

Η εισπνοή, η ενδορινική ενστάλαξη, η ενδοτραχειακή ενστάλαξη και η ενδοτραχειακή διασωλήνωση αποτελούν μεθόδους που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μεταφορά γονιδίων στους πνεύμονες. Μεταξύ αυτών, η μη επεμβατική μεταφορά γονιδίων στους πνεύμονες μέσω συμπλόκων αερολύματος (φορέα/πλασμιδιακού DNA) για εισπνοή θεωρείται η καλύτερη επιλογή, εφόσον επιτρέπουν υψηλές τοπικές συγκεντρώσεις στους αεραγωγούς χωρίς πόνο και χωρίς τη χρήση βελόνας. Παρ' όλα αυτά, μόνο μερικοί ικοί και μη ικοί φορείς έχει αποδειχθεί ότι προστατεύουν αποτελεσματικά το πλασμιδιακό DNA από τις δυνάμεις διάτμησης που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια χορήγησης του αερολύματος.

Το 2011 σε μια προ κλινική μελέτη έγινε χορήγηση γονιδίων μέσω αερολύματος και έγινε σύγκριση των τριών σκευασμάτων που χρησιμοποιήθηκαν, το πολυμερές PEI, το κατιονικό λιπόσωμα GL67A και συμπιεσμένα νανοσωματίδια DNA διαμορφωμένα με PEG-CK30. Από αυτά το κατιονικό λιπόσωμα GL67A αποδείχθηκε ο καλύτερος μη ικός φορέας για παροχή αερολύματος στους πνεύμονες των προβάτων. Σε κλινική μελέτη φάσης 2 (2014) η χορήγηση πλασμιδιακού DNA, που βελτιστοποιήθηκε και ονομάστηκε rGM169, έδειξε ότι η μηνιαία εφαρμογή του σκευάσματος GL67A/rGM169 συνδέθηκε με σημαντικό όφελος στην λειτουργία των πνευμόνων των ασθενών (Villate-Beitia, et al., 2017).

#### 4.2 Αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια (ASO)

Τα antisense (αντινοσηματικά) ολιγονουκλεοτίδια είναι μικρά μονόκλινα μόρια νουκλεϊκού οξέος που συνήθως αποτελούνται από 13-50 ζεύγη βάσεων με επικρατέστερο μήκος αυτό των 20-25 ζευγών βάσεων. Τα antisense ολιγονουκλεοτίδια (ASO) έχουν την ικανό-

τητα να ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων αλληλεπιδρώντας με συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες μέσω διαφόρων μηχανισμών. Είναι κατάλληλα σχεδιασμένα έτσι ώστε να μπορούν να συνδεθούν με υψηλή συγγένεια και ειδικότητα σε συγκεκριμένα νουκλεϊκά οξέα στόχους μέσω της σύζευξης βάσεων κατά τους Watson και Crick. Καθώς ο φωσφοδιεστερικός σκελετός του RNA και του DNA είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος στην αποικοδόμηση από την νουκλεάση, η χημεία που χρησιμοποιήθηκε σε πρώιμες μελέτες για κάθε antisense νουκλεοτίδιο ήταν ασταθής και αναποτελεσματική. Αυτό το πρόβλημα σύντομα διορθώθηκε με χημικές τροποποιήσεις στο σκελετό των ολιγονουκλεοτιδίων που είχαν ως στόχο τη βελτίωση της συγγένειας του στόχου, του τοξικολογικού προφίλ, της αντίστασης στη νουκλεάση, βιοσταθερότητα και βελτίωση της φαρμακοκινητικής. Πρόσφατα δύο νέα φάρμακα πήραν έγκριση από τον FDA για τη θεραπεία δύο γενετικών ασθενειών, τη μυϊκή δυστροφία Duchenne (DMD) και τη νωτιαία μυϊκή ατροφία (SMA).

Στην κυστική ίνωση οι μεταλλάξεις ματίσματος και αλλαγής του πλαισίου ανάγνωσης είναι γνωστό ότι συμβαίνουν σε όλα τα εξώνια του γονιδίου CFTR. Η θεραπεία με antisense ολιγονουκλεοτίδια θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε συγκεκριμένες περιπτώσεις για τη θεραπεία της κυστικής ίνωσης, για την παράλειψη ενός εξωνίου που θα περιέχει μια μετάλλαξη nonsense ή μετατόπισης του πλαισίου ανάγνωσης. Το 2004 ο Zamecnik και οι συνεργάτες του δημιούργησαν ένα τροποποιημένο ολιγοδεοξυριβονουκλεοτίδιο για την αποκατάσταση της δυσλειτουργικής CFTR πρωτεΐνης, εισάγοντας στο mRNA τις τρεις βάσεις που έλλειπαν λόγω της μετάλλαξης Phe508del. Αυτό το τροποποιημένο ASO χρησιμοποιήθηκε *in vitro* και έδειξε βελτιωμένη λειτουργία της CFTR. Υπάρχει μια κλινική μελέτη φάσης 1/2 που χρησιμοποιεί ένα τροποποιημένο RNA ολιγονουκλεοτίδιο με την ονομασία QR-010 που έχει σχεδιαστεί αποκλειστικά για τη μετάλλαξη Phe508del και βασίζεται στη δημοσίευση του Zamecnik και των συνεργατών του (Martinovich, et al., 2018). Το QR-010, Eluforsen, είναι ένα τροποποιημένο RNA ολιγονουκλεοτίδιο το οποίο όταν χορηγήθηκε σε ομόζυγους ασθενείς της μετάλλαξης Phe508del βελτίωσε την ποιότητα ζωής τους, τη λειτουργία των πνευμόνων και τη διαφορά δυναμικού της ρινικής κοιλότητας (Lopes-Pacheco, 2020).

Τα ASO μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να ενισχύσουν τη συγκράτηση του CFTR εξωνίου 10 στο ώριμο mRNA και μπορούν να επηρεάσουν την εκδήλωση της νόσου σε ασθενείς με διάφορες μεταλλάξεις, ή μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να συμπλη-



ρώσουν εναλλακτικές στρατηγικές αυξάνοντας τα επίπεδα του mRNA. Ένα *in vitro* παράδειγμα της εφαρμογής αυτής είναι για τη μετάλλαξη ματίσματος 2657+5G> A, που προκαλεί αποκοπή του εξωνίου 16 κατά τη διάρκεια του ματίσματος. Ωστόσο το αντίγραφο αυτό διορθώθηκε με ένα ASO σχεδιασμένο για να ενισχύσει τη συνένωση του εξωνίου. Μία μετάλλαξη που βρέθηκε στο 5% των Εβραίων ασθενών Ashkenazi, η 3849+10 kb C → T, δημιουργεί μια νέα αλληλουχία στο ιντρόνιο 19, προκαλώντας την ενσωμάτωση ενός ψευδοεξωνίου 84 ζευγών βάσεων στο mRNA και τη δημιουργία ενός πρόωρου κωδικονίου λήξης της μετάφρασης. Η *in vitro* διόρθωση αυτού του ελαττώματος χρησιμοποιώντας ASO επιτεύχθηκε το 1999 από τον Friedman και τους συνεργάτες του (Martinovich, et al., 2018).

### 4.3 Gene editing

Από την ταυτοποίηση του μεταλλαγμένου γονιδίου CFTR ως η αιτία της κυστικής ίνωσης έχουν γίνει πολλές μελέτες και προσπάθειες αξιοποίησης της γονιδιακής θεραπείας ως μέσο για τη διόρθωση των μεταλλάξεων σε κυτταρικό επίπεδο. Η παραδοσιακή γονιδιακή θεραπεία θα είχε ως στόχο να τοποθετήσει ένα αντίγραφο του φυσιολογικού γονιδίου στα κύτταρα των ασθενών. Η προοπτική αυτής της προσέγγισης είναι ότι θα μπορούσε ενδεχομένως αυτό να αποτελεί θεραπευτική λύση για όλους τους ασθενείς με κυστική ίνωση ανεξαιρέτως του γονοτύπου τους. Παρά τη θεωρητική γοητεία της γονιδιακής θεραπείας, η πραγματικότητα της μεταφοράς αυτής της τεχνολογίας στο κλινικό περιβάλλον έχει αποδειχθεί μια σημαντική πρόκληση (Prickett & Jain, 2012).

Οι τεχνολογίες μεταφοράς γονιδίων έχουν επεκταθεί για να περιλαμβάνουν και τεχνικές επιδιόρθωσης γονιδίων (gene editing), με την προοπτική μόνιμης επιδιόρθωσης των γενετικών αλλοιώσεων της υποκείμενης νόσου. Η διαδικασία πραγματοποιείται κυρίως με τη χρήση νουκλεασών, όπως τις νουκλεάσες ψευδαργύρου (zinc finger nucleases, ZFN), τις νουκλεάσες TALE (transcription activator like effector nucleases) και το σύστημα CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) το οποίο είναι ευρέως χρησιμοποιούμενο. Το σύστημα CRISPR/Cas9 βασίζεται στο βακτηριακό ανοσοποιητικό σύστημα, το οποίο προσδίδει αντίσταση και προσαρμογή στο ξένο γενετικό υλικό. Χρησιμοποιεί μια νουκλεάση, την Cas9, για να δημιουργήσει δίκλινα θραύσματα με συγκεκριμένο τρόπο και ένα RNA μόριο οδηγό για να στοχεύσει την αλληλουχία του DNA. Έχουν πραγματοποιηθεί επιτυχημένες διορθώσεις ανθρωπίνων ασ-

θενειών σε ζωικά μοντέλα με τη χρήση του gene editing, όπως η αποκατάσταση του παράγοντα πήξης IX στην αιμορροφιλία Β σε ποντίκια.

Ο Schwank και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν εντερικά οργανοειδή από τα βλαστοκύτταρα ασθενών με κυστική ίνωση και διόρθωσαν τη μετάλλαξη Phe508del με χρήση του συστήματος CRISPR/Cas9 για τον ακριβή προσδιορισμό της σωστής ακολουθίας. Έτσι επιτεύχθηκε η διάσωση του φαινοτύπου, με λειτουργική έκφραση της πρωτεΐνης CFTR, φυσιολογική απόκριση ύστερα από διέγερση με φορσκολίνη και επαγόμενη διόγκωση, ένα χαρακτηριστικό που λείπει από τα οργανοειδή με ελαττωματική λειτουργία CFTR. Ομοίως, τα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα που προέρχονται από ασθενείς με κυστική ίνωση και έχουν διορθωθεί με gene editing, διαφοροποιήθηκαν σε επιθηλιακά κύτταρα του εγγύς αεραγωγού και απέδειξαν σταθερή λειτουργικότητα του γονιδίου CFTR. Τα παραπάνω συνεπάγονται ότι η ex vivo γονιδιακή διόρθωση μπορεί να επιτευχθεί και σε βλαστοκύτταρα του πνεύμονα ασθενών με κυστική ίνωση τα οποία έπειτα θα επαναμεταμοσχευθούν για την αποκατάσταση του αεραγωγού των ασθενών και έτσι θα αποκτήσουν λειτουργικά κύτταρα που εκφράζουν την πρωτεΐνη CFTR. Το κατά πόσο είναι ασφαλές να χρησιμοποιείται το σύστημα CRISPR/Cas9 διερευνάται σε πολλές κλινικές δοκιμές πρώιμης φάσης σε ανθρώπους, όπως η κλινική δοκιμή NCT03399448, με ex vivo χρήση γονιδιακής διόρθωσης των Τ κυττάρων των ασθενών και ενίσχυση των δυνατοτήτων στόχευσης για την αντιμετώπιση πολλαπλών κακοηθειών (Miah, et al., 2019).

#### 4.3.1 CRISPR/Cas9

Το σύστημα CRISPR αποτελείται από δύο τμήματα, ένα μόριο γνωστό ως οδηγός RNA (gRNA) κατασκευάζεται ειδικά για να έχει την ίδια αλληλουχία βάσεων με το σημείο στόχο του γονιδιώματος και μια νουκλεάση (DNA μόριο που κόβει αλληλουχίες) με την ονομασία Cas9. Το σύστημα CRISPR/Cas9 αποτελεί ένα προκαρυωτικό ανοσοποιητικό σύστημα που προσδίδει αντίσταση σε ξένα γενετικά στοιχεία, παρέχοντας ένα είδος επίκτητης ανοσίας. Αυτό το σύστημα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία οδηγών RNA βιβλιοθηκών ικανών να συμμετέχουν σε οποιαδήποτε γονιδιακή αλληλουχία. Η δημιουργία ενός οδηγού RNA γίνεται με τη σύντηξη ενός βακτηριακού RNA (TracrRNA) και ενός RNA συμπληρωματικού της αλληλουχίας που θα τροποποιηθεί (crRNA). Αυτό το σύστημα μπορεί να απλοποιηθεί με τη σύντηξη αλληλουχιών crRNA και tracrRNA για την παραγωγή ενός συνθετικού χμαιρικού μονοκατευθυνόμενου RNA (sgRNA). Όταν εκφρά-

ζεται στο κύτταρο το sgRNA ενώνεται με το Cas9 και οδηγείται στην αλληλουχία στόχο, το Cas9 κόβει το DNA στην επιθυμητή θέση και ενεργοποιεί τους παράγοντες επιδιόρθωσης του DNA για ομόλογο ανασυνδυασμό. Εάν η σωστή αλληλουχία του γονιδίου που επρόκειτο να τροποποιηθεί εισαχθεί στο κύτταρο, ο ομόλογος ανασυνδυασμός θα χρησιμοποιήσει αυτή την αλληλουχία ως εκμαγείο και θα διορθώσει το μεταλλαγμένο γονίδιο. Το sgRNA θα συνδεθεί συμπληρωματικά με τη θέση στόχο και θα βοηθήσει να έρθει η νουκλεάση Cas9 για να κόψει το DNA δημιουργώντας έτσι ειδικές θέσεις θραύσματα του δίκλωνου μορίου (DSBs).

Σε δεύτερο στάδιο τα θραύσματα (DSBs) επιδιορθώνονται με τη βοήθεια του ενδογενούς συστήματος του κυττάρου. Τα κύτταρα επιδιορθώνουν αυτή τη βλάβη με τη βοήθεια είτε του μονοπατιού που δεν κατευθύνεται από ομολογία (NHEJ) είτε από το μονοπάτι που κατευθύνεται από ομολογία (HDR). Το πρώτο μονοπάτι δρα γρήγορα και με αποτελεσματικό τρόπο ενώνοντας τους κλώνους μεταξύ τους, όμως παρουσιάζει υψηλή πιθανότητα δημιουργίας μη επιθυμητών βάσεων κατά τη συνένωση των κλώνων (Marangi & Pistrutto, 2018).

#### 4.3.2 Βλαστοκύτταρα

Ο Wang και οι συνεργάτες του στα πλαίσια ερευνών για την κυστική ίνωση, πρότειναν ότι τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (MSC) ήταν ικανά να διαφοροποιηθούν σε επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού συστήματος όταν συγκαλλιεργούνται με πρωτεύοντα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού συστήματος σε μια διεπιφάνεια αέρα-υγρού (ALI). Επίσης διαπιστώθηκε ότι τα MSC που διόρθωσαν το CFTR (με τη χρήση λεντικών φορέων που έφεραν γονίδιο CFTR άγριου τύπου) σε ομόζυγους ασθενείς με τη μετάλλαξη F508del, ήταν ικανά να συνεισφέρουν στην έκκριση ιόντων χλωρίου σε απόκριση της διέγερσης από τον cAMP αγωνιστή. Σε μεταγενέστερες μελέτες ο Carbone και οι συνεργάτες του απέδειξαν ότι τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα που προέρχονται από ανθρώπινα αμνιακά μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα που συγκαλλιεργήθηκαν με ζωντανά επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού με κυστική ίνωση, ήταν ικανά να αποκαταστήσουν μερικά από τα πιο βασικά ελαττώματα που σχετίζονται με την ασθένεια αυτή.

Σε μελέτη που έγινε σε ποντίκια με κυστική ίνωση τα οποία παρουσίαζαν λοίμωξη του αναπνευστικού, από τον Bonfield και τους συνεργάτες του, αποδείχθηκε ότι τα

ανθρώπινα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα μείωσαν τη βακτηριακή επιμόλυνση και επιπλέον ενίσχυσαν την ικανότητα του αναπνευστικού συστήματος να αντιμετωπίζει επιτυχώς επικείμενες λοιμώξεις με την in vivo παραγωγή του αντιμικροβιακού πεπτιδίου LL-37. Επίσης φάνηκε in vitro ότι τα ανθρώπινα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα που προέρχονται από το μυελό των οστών και το λιπώδη ιστό μείωσαν τη βακτηριακή ανάπτυξη των *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* και *Streptococcus pneumoniae*. Ακόμη, σε in vivo δοκιμασίες φάνηκε ότι τα MSC ενεργοποιούν τα μακροφάγα που είναι σημαντικά για την αντιμετώπιση των λοιμώξεων και την εξασθένηση της φλεγμονώδους αντίδρασης. Τέλος, η χρήση βλαστοκυττάρων μείωσε την παραγωγή προφλεγμονώδους κυτοκίνης σε ποντίκια που διεγείρονται από LPS υπό την επίδραση μακροφάγων τα οποία προέρχονται από το μυελό των οστών ή από μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος αυξάνοντας την έκφραση του PPAR $\gamma$ , έναν σημαντικό ρυθμιστή της φλεγμονής σε χρόνιες φλεγμονώδεις ασθένειες όπως η κυστική ίνωση.

Μέχρι στιγμής έχουν πραγματοποιηθεί δύο κλινικές μελέτες φάσης 1 για τη θεραπεία της κυστικής ίνωσης με τη χρήση μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων. Η πρώτη αφορά την αξιολόγηση της ασφάλειας και της ανεκτικότητας της αλλογενούς μεταμόσχευσης MSC σε 15 ασθενείς με κυστική ίνωση άνω των 18 ετών. Η δεύτερη επικεντρώνεται αρχικά στην απόδειξη της ασφάλειας που υπάρχει κατά τη διάρκεια ενδοφλέβιας χορήγησης MSC σε 15 ασθενείς με κυστική ίνωση και επιπλέον τη διερεύνηση εάν τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα μπορούν να βελτιώσουν τα συμπτώματα της νόσου, όπως την πνευμονική λειτουργία, το ρυθμό πνευμονικών παροξύνσεων, τις συστηματικές και τοπικές φλεγμονές και τέλος την ποιότητα ζωής των ασθενών που σχετίζεται με τα συμπτώματά τους (Duchesneau, et al., 2020).

Τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSCs) είναι μια πρόσφατη επιστημονική ανακάλυψη κατά την οποία διαφοροποιημένα κύτταρα όπως οι ινοβλάστες μπορούν να επαναπρογραμματιστούν ώστε να μοιάζουν με τα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα (ESCs). Στη συνέχεια τα iPSC μπορούν να διαφοροποιηθούν σε πνευμονικά, καρδιακά, νευρικά κύτταρα ή σε άλλη κυτταρική σειρά με τελικό αποτέλεσμα την πλήρη διαφοροποίησή τους. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα εμβρυονικά και τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα είναι γενετικά πανομοιότυπα όταν αναπτύσσονται από τα ίδια κύτταρα δότη. Κάποιες από τις πιο σημαντικές ιδιότητες των iPSC είναι ότι μπορούν

να πολλαπλασιαστούν πολύ γρήγορα και επ' αόριστον και μπορούν να παρέχουν μεγάλες ποσότητες κυττάρων για εξατομικευμένη αναγέννηση παθολογικών ιστών.

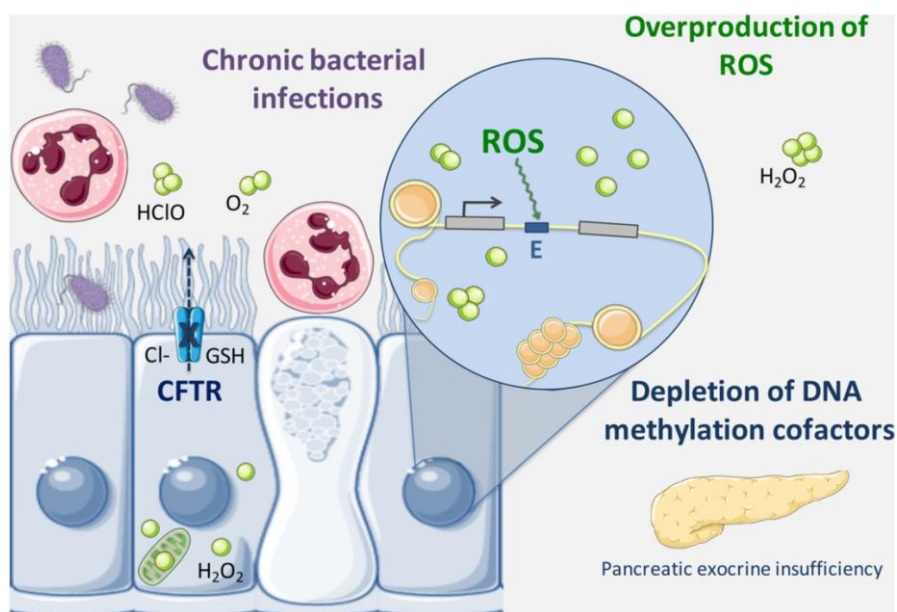
Για παράδειγμα, η αντικατάσταση του μεταλλαγμένου γονιδίου CFTR, λόγω της μετάλλαξης F508del, με γονίδιο άγριου τύπου ύστερα από τη χρήση των πολυδύναμων επαγόμενων βλαστοκυττάρων και με την τεχνική CRISPR/Cas9 θα μπορούσε να επαναπρογραμματίσει τα iPSC, έτσι ώστε να διαφοροποιηθούν κατάλληλα και να αντικαταστήσουν τα ελαττωματικά επιθηλιακά κύτταρα στους πνεύμονες των ασθενών με κυστική ίνωση. Τα ενθαρρυντικά νέα είναι ότι αυτό έχει πραγματοποιηθεί με επιτυχία προς το παρόν in vitro, με τη χρήση ινοβλαστών, και έχει αποδειχθεί από τον Firth και τους συνεργάτες του ύστερα από την ανίχνευση της ενεργοποιημένης αγωγιμότητας χλωρίου από το cAMP και της ώριμη πρωτεΐνης CFTR στη ζώνη C κατά την εκτέλεση της τεχνικής Western blot.

Έτσι για τη θεραπεία της πνευμονοπάθειας λόγω κυστικής ίνωσης το όραμα για την αποτελεσματικότητα των βλαστοκυττάρων είναι η λήψη ινοβλαστών από ασθενείς με κυστική ίνωση, η επαγωγή τους σε πολυδύναμα βλαστοκύτταρα, η διόρθωση του μεταλλαγμένου γονιδίου CFTR είτε με το σύστημα CRISPR/Cas9 είτε με το ZFNs, η παραγωγή απεριόριστων iPSCs και η επαγωγή τους έτσι ώστε να διαφοροποιηθούν κατάλληλα για να επανεισαχθούν στους ασθενείς από τους οποίους πάρθηκαν αρχικά οι ινοβλάστες, ως εξειδικευμένη θεραπεία (Pollard & Pollard, 2018).

#### 4.3.3 Επιγενετική

Πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει ότι η μεθυλίωση του DNA αλλοιώθηκε σε δείγματα κυττάρων του ρινικού επιθηλίου, ολικού αίματος και μακροφάγων του πνεύμονα σε ασθενείς με κυστική ίνωση. Συγκεκριμένα η μείωση και η αύξηση της μεθυλίωσης του DNA σε πολλαπλά δινουκλεοτίδια CpG (5'-C-phosphate-G-3') ήταν αυξημένη και εμφανιζόταν κυρίως σε γονίδια που κωδικοποιούν τις σχετικές πρωτεΐνες των ιστών που προσβάλλονται. Σε δείγματα του ρινικού επιθηλίου οι διάφορες μεθυλιωμένες θέσεις CpG εμφανίστηκαν σε μεγάλο ποσοστό σε γονίδια σημαντικά για την κυτταρική προσκόλληση, τις ανοσολογικές αλλά και τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις. Στα μακροφάγα των πνευμόνων η μεθυλίωση είχε ως στόχο γονίδια που σχετίζονται με τη φαγοκυττάρωση, ενώ η μεθυλίωση διαφόρων θέσεων CpG συσχετίζεται με τη λειτουργία των πνευμόνων, δηλαδή το ποσοστό του FEV1 σε δείγματα του ρινικού επιθηλίου. Τα αίτια της μεθυλίωσης του DNA

που προκαλούνται σε ασθενείς με κυστική ίνωση παραμένουν άγνωστα και δεν μπορεί να εξηγηθεί η συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων μεθυλίωσης σε συγκεκριμένες θέσεις CpG και της λειτουργίας των πνευμόνων των ασθενών. Γι' αυτό έχει προταθεί ότι οι αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA (αύξηση και μείωση) στην κυστική ίνωση είναι η συνέπεια της νόσου και οφείλεται σε τρεις πιθανούς παράγοντες.



Εικόνα 7: Παράγοντες που επηρεάζουν τη μεθυλίωση του DNA στην κυστική ίνωση.

Η υπερπαραγωγή ROS (Reactive Oxygen Species) συνδέεται με την αύξηση και τη μείωση της μεθυλίωσης του DNA σε πολλαπλές θέσεις του γονιδιώματος σε δείγματα με κυστική ίνωση και είναι υπεύθυνη για την αυξημένη παρουσία μεθυλιωμένων θέσεων CpG σε ενεργά γονίδια και ενισχυτές και σχετίζονται με μια προσβάσιμη χρωματίνη και επομένως είναι επιρρεπείς στις δράσεις των ROS. Επίσης τα υψηλά επίπεδα ROS εξηγούν τις διάφορες παραλλαγές της μεθυλίωσης του DNA στους ιστούς των αεραγωγών, στις θέσεις φλεγμονής και σε δείγματα αίματος, καθώς τα περιφερειακά κυκλοφορούντα ουδετερόφιλα είναι ήδη ενεργοποιημένα.

Η μείωση των συμπαραγόντων μεθυλίωσης λόγω χαμηλής αναλογίας SAM:SAH (S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine) σε ασθενείς με κυστική ίνωση μπορεί να εξηγήσει την απώλεια μεθυλίωσης του DNA, αλλά αυτό δεν ισχύει και για την αύξηση της μεθυλίωσης ούτε όμως και την αυξημένη παρουσία της σε ενεργά γονίδια και ενισχυτές.

Τέλος αρκετές μελέτες έχουν δείξει μια συσχέτιση μεταξύ αλλαγών της μεθυλίωσης του DNA με ιογενείς ή βακτηριακές λοιμώξεις. Η απαιτούμενη *de novo* δραστηριότητα μεθυλίωσης του DNMT1 (DNA Methyltransferase 1) παρουσία *S.aureus* παρατηρήθηκε *in vitro* και μπορεί να εξηγήσει την αύξηση της μεθυλίωσης αλλά όχι τη μείωσή της, καθώς επίσης δε μπορεί να εξηγήσει τις αλλαγές της μεθυλίωσης στα κύτταρα του αίματος που δεν εκτίθενται σε βακτηριακές λοιμώξεις.

Εν κατακλείδι, αυτά τα ευρήματα παρέχουν έδαφος για το συμπέρασμα ότι η μεθυλίωση του DNA σε κύτταρα με κυστική ίνωση είναι συνέπεια της νόσου αυτής, με αντίκτυπο τη χρόνια φλεγμονή και τα υψηλά επίπεδα ROS τα οποία φαίνεται να εξηγούν καλύτερα την ποικιλομορφία που εμφανίζει η μεθυλίωση του DNA (Scott & De Sario, 2020).

Τα *microRNAs* (*miRNAs*) είναι μικρά μονόκλωνα, μη κωδικοποιημένα RNA, που αποτελούνται από 21-23 νουκλεοτίδια ενδογενούς RNA ικανά να καταστέλλουν την έκφραση των γονιδίων στόχων. Μπορούν να ταξινομηθούν σχετικά με τη θέση τους στο γονιδίωμα και τη δομή τους. Στη βάση δεδομένων miRBase έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 28.000 *miRNAs* και πάνω από τα μισά εντοπίζονται σε διαγονιδιακές περιοχές. Μέχρι σήμερα υπολογίζεται ότι πάνω από το 60% των γονιδίων που κωδικοποιούν μια πρωτεΐνη ρυθμίζονται από τα *miRNAs*.

Ο Gillen και οι συνεργάτες του ήταν οι πρώτοι που ανακάλυψαν ότι τα *miRNA* συνδέονται με τη δραστηριότητα του γονιδίου CFTR, πολλά από αυτά μάλιστα ρύθμιζαν άμεσα την έκφραση του γονιδίου καθώς ενώνονταν με το 3'-UTR άκρο του mRNA του. Η ρύθμιση της έκφρασης του mRNA του CFTR διαφέρει ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου που μελετάται, είναι στην ουσία εξαρτώμενη από τον ιστό στον οποίο βρίσκεται και από το χρόνο στον οποίο πραγματοποιείται, κάτι που καθιστά την ανάπτυξη των θεραπειών με *miRNA* πολύπλοκη για την αντιμετώπιση της κυστικής ίνωσης.

Η ρύθμιση του CFTR διαφέρει πριν και μετά τη γέννηση των ασθενών και αυτό επιβεβαιώθηκε με το *miR-101* το οποίο ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση του CFTR σε κυτταρικές σειρές του πνεύμονα των ενηλίκων, όμως δεν έχει καμία επίδραση στα βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα των εμβρύων. Στις *silico* αναλύσεις τα *miR-101* και *miR-494* έδειξαν ότι μπορούν να στοχεύσουν γονίδια ταυτόχρονα και συνεπώς να επηρεάσουν τη βαρύτητα της παθολογίας των ασθενών με κυστική ίνωση. Αυτή η άμεση σχέση μεταξύ *miRNA* και CFTR έχει επιβεβαιωθεί και από άλλους ερευνητές οι οποίοι απέδειξαν ότι τα *miR-*

145, miR-223 και miR-494 σε συνεργασία μεταξύ τους ή αυτόνομα, ρυθμίζουν άμεσα την έκφραση του CFTR. Αυτό ισχύει επίσης και για τα miR-509-3p και miR-494 τα οποία προκαλούν ισχυρότερη καταστολή της έκφρασης του γονιδίου. Επίσης μερικά miRNAs για να μπορούν να αλληλεπιδρούν άμεσα με το CFTR, δρουν σε ενδιάμεσους φορείς της βιοσύνθεσής του όπως ο μεταγραφικός παράγοντας SIN3A, ο οποίος καταστέλλεται από το miR-138. Επιπλέον η υπερέκφραση του miR-138 συμβάλλει στην αύξηση της έκφρασης, στον αριθμό αλλά και στη δραστηριότητα των διαύλων CFTR στην επιφάνεια των κυττάρων, τόσο σε υγιή άτομα όσο και σε ασθενείς που φέρουν τη μετάλλαξη F508del.

Η έκφραση των miRNAs μπορεί επίσης να ρυθμίσει και την έκφραση άλλων διαύλων και άλλων πρωτεϊνών των οποίων η δραστηριότητα εξαρτάται από το CFTR. Για παράδειγμα η δραστηριότητα του συμμεταφορέα NKCC1 ή του διαύλου ENaC επηρεάζεται από το miR-183. Σε μια πρόσφατη μελέτη παρατηρήθηκε ότι η αύξηση στην έκφραση του miR-9 είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της έκφρασης του διαύλου χλωρίου ANO1, ο οποίος ρυθμίζει την ενυδάτωση της βλέννας και τη δραστηριότητα εκροής του χλωρίου (Bardin, et al., 2018).

Τα miRNA είναι μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος για τη διόρθωση των γονιδίων σε σύγκριση με άλλα μόρια για διάφορους λόγους όπως το ότι είναι μικρότερα, λιγότερο αντιγονικά και πιο εύκολο να εισαχθούν στα κύτταρα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Παρ' όλο που οι τεχνικές που βασίζονται σε μοριακό επίπεδο απαιτούν μεταφορά μορίων στον πυρήνα τα miRNA αρκεί να φτάσουν το κυτταρόπλασμα για να δράσουν και η δράση τους αυτή έχει διάρκεια περισσότερο από 3 βδομάδες, σε αντίθετη όμως περίπτωση η αναστολή της δράσης τους έχει ως αποτέλεσμα τη σταδιακή αποικοδόμησή τους.

Τέλος, πρόσφατα μια ομάδα ερευνητών καλλιέργησε το 10% κυττάρων άγριου τύπου μαζί με το 90% κυττάρων με κυστική ίνωση. Οι ερευνητές απέδειξαν ότι το 10% των φυσιολογικών κυττάρων ήταν επαρκές έτσι ώστε να ρυθμίσει σωστά τις δυσλειτουργίες που είχαν δημιουργηθεί, όπως η έκκριση IL-8 και η αγωγιμότητα των ιόντων χλωρίου και νατρίου. Αυτή η ικανότητα διόρθωσης των δυσλειτουργιών με την επιδιόρθωση λίγων μόνο κυττάρων είναι πολύ σημαντική για την εξέλιξη της γονιδιακής θεραπείας καθώς ως γνωστόν είναι πρακτικά αδύνατον να διορθωθούν όλα τα προβληματικά κύτταρα των ασθενών με κυστική ίνωση (Sonneville, et al., 2015).



## Συμπεράσματα

Η γονιδιακή θεραπεία για την κυστική ίνωση έχει αποδειχθεί πιο προβληματική απ' ότι αναμενόταν αρχικά και αυτά τα προβλήματα σχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με φραγμούς στη διαμόλυνση του πνεύμονα από τους ενδοκυτταρικούς φραγμούς των μεταμιτωτικών κυττάρων που επενδύουν τους αεραγωγούς. Τα διάφορα εμπόδια που προκύπτουν στους βλεννογόνους των αεραγωγών παρουσιάζουν μεγάλες προκλήσεις στην ανάπτυξη νέων γενετικών θεραπειών και έτσι απαιτούνται φορείς που έχουν σχεδιαστεί ειδικά για να ξεπερνούν καλύτερα αυτά τα εμπόδια, ενώ πολλές νέες προσεγγίσεις αναπτύσσονται με ιογενείς και μη ιογενείς προσεγγίσεις.

Η ανάπτυξη ιικών φορέων, συμπεριλαμβανομένων των AAV φορέων και των λεντικών φορέων συνεχίζεται για τις θεραπείες γονιδιακής αντικατάστασης του ελαττωματικού CFTR, όπως και άλλες τεχνολογίες προχωρούν επίσης γρήγορα, καθεμία από τις οποίες προσφέρει διαφορετικά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Το mRNA του CFTR γονιδίου είναι μια από τις πιο υποσχόμενες νέες προσεγγίσεις στη θεραπεία της κυστικής ίνωσης με ενθαρρυντικά αποτελέσματα κλινικών δοκιμών φάσης 1 και 2 που ανακοινώθηκαν πρόσφατα.

Τα πλεονεκτήματα της θεραπείας με mRNA έναντι της θεραπείας με pDNA περιλαμβάνουν την κυτταροπλασματική θέση του μεταφραστικού μηχανισμού, προλαμβάνοντας την ανάγκη για πυρηνική πρόσληψη, η οποία εξαλείφει ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα που περιορίζουν την αποτελεσματικότητα του pDNA και έτσι ενισχύει σημαντικά τη διαμόλυνση. Επιπλέον το mRNA δεν ενέχει τον κίνδυνο παρεμβολής από κάποια μετάλλαξη, κάτι το οποίο πρέπει να ληφθεί υπόψη για τη γονιδιακή θεραπεία με βάση το pDNA. Παρ' όλα αυτά οι θεραπείες με mRNA εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από αποτελεσματικά συστήματα παροχής νανοσωματιδίων που μπορούν να παραδοθούν επανειλημμένα και επομένως είναι πιθανό να υπάρξουν συνεχείς εξελίξεις σε αυτόν τον τομέα τα επόμενα χρόνια.

Η χρήση της τεχνικής CRISPR για τη γονιδιακή θεραπεία αρχίζει και χρησιμοποιείται ολοένα και περισσότερο τα τελευταία χρόνια σε πρώιμες μελέτες για την κυστική ίνωση και τα αποτελέσματα δείχνουν αυξημένη δυνατότητα επιδιόρθωσης συγκεκριμένων μεταλλάξεων στο γονίδιο CFTR. Ιικοί ή μη ιικοί φορείς απαιτούνται για τη χρήση της τεχνικής CRISPR, η οποία θα αντιμετωπίσει τα ίδια εμπόδια με αυτά που υπάρχουν στη

γονιδιακή θεραπεία. Οι μη ικές προσεγγίσεις επιτρέπουν τη διανομή νουκλεασών Cas είτε ως mRNA είτε ως προσχηματισμένο σύμπλεγμα ριβονουκλεοπρωτεΐνης (RNP), προσφέροντας έτσι μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα από τη μη ική πλασμιδιακή μόλυνση του Cas9 και gRNA μαζί με μεγαλύτερη ασφάλεια απ' ότι οι λεντικοί φορείς ή οι φορείς AAV.

Τέλος μια περαιτέρω πρόκληση που πρέπει να ληφθεί υπόψη είναι ότι υπάρχουν πολυάριθμοι τύποι κυττάρων στο ψευδοστρωματοποιημένο επιθήλιο των αεραγωγών, οι οποίοι έχουν πρόσφατα χαρακτηριστεί λεπτομερώς με single cell RNA sequencing, δημιουργώντας έτσι έναν άτλαντα πνευμονικών κυτταρικών τύπων. Κάθε τύπος κυττάρου παίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική λειτουργία των αεραγωγών και στην προστασία τους από μολύνσεις. Δεν είναι ακόμα σαφές πόσο σημαντικό θα είναι να στοχεύσουμε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους εντός του επιθηλίου ιδιαίτερα με τις προσεγγίσεις της γονιδιακής θεραπείας (Boyd, et al., 2020).

## Αναφορές

Anon., 2022. *Johns Hopkins Cystic Fibrosis Center*. [Ηλεκτρονικό]  
Available at: <https://hopkinscf.org/knowledge/cftr/>

Anon., n.d. *cysticfibrosis.gr*. [Ηλεκτρονικό]  
Available at: <http://www.cysticfibrosis.gr/el/>

Anon., n.d. *Johns Hopkins Cystic Fibrosis Center*. [Ηλεκτρονικό]  
Available at: <https://hopkinscf.org/knowledge/cftr/>

Bardin, P., Sonnevile, F., Corvol, H. & Tabary, O., 2018. Emerging microRNA Therapeutic Approaches for Cystic Fibrosis. *Frontiers in Pharmacology*, 08 October, pp. 1-11.

Bergeron, C. & Cantin, A. M., n.d. Cystic Fibrosis: Pathophysiology of Lung Disease. *Respiratory and Critical Care Medicine*, pp. 1-12.

Bergeron, C. & Cantin, A. M., n.d. Cystic Fibrosis: Pathophysiology of Lung Disease. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, pp. 1-12.

Bienvenu, T. & Nguyen-Khoa, T., 2020. Current and future diagnosis of cystic fibrosis: Performance and limitations. *Archives de Pédiatrie*, pp. 1-6.

Boyd, C. A. και συν., 2020. New approaches to genetic therapies for cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, 13 January, pp. 1-6.

Brown, S. D., White, R. & Tobin, P., 2017. Keep them breathing: Cystic fibrosis pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Journal of the American Academy of Physician Assistants*, May, pp. 1-5.

Cantin, A. M., Hartl, D., Konstan, M. W. & Chmiel, J. F., 2014;. Inflammation in cystic fibrosis lung disease: Pathogenesis and therapy. *Journal of Cystic Fibrosis*, 18 November, pp. 1-12.

Cantin, A. M., Hartl, D., Konstan, M. W. & Chmiel, J. F., 2015. Inflammation in cystic fibrosis lung disease: Pathogenesis and therapy. *Journal of Cystic Fibrosis*, 8 March, pp. 1-12.

Castellani, C. & Assael, B. M., 2016. Cystic fibrosis: a clinical view. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 5 October, pp. 1-12.

Castellani, C. & Assael, B. M., 2016. Cystic fibrosis: a clinical view. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 05 October, pp. 1-12.

De Boeck, K., 2020. Cystic fibrosis in the year 2020: A disease with a new face. *Acta Paediatrica*, 2 January, pp. 893-899.

De Boeck, K., 2020. Cystic fibrosis in the year 2020: A disease with a new face. *Acta Paediatrica*, 2 January, pp. 1-7.

- De Boeck, K., 2020. Cystic fibrosis in the year 2020: A disease with a new face. *Acta Paediatrica*, 2 January, pp. 1-7.
- De Boeck, K. & Amaral, M. D., 2016. Progress in therapies for cystic fibrosis. *The Lancet*, 1 April, pp. 1-13.
- del-Valle, M. F., Fagundes Donadio, M. V. & Pérez-Ruiz, M., 2020. Physical exercise as a tool to minimize the consequences of the Covid-19 quarantine: An overview for cystic fibrosis. *Wiley*, pp. 1-6.
- Duchesneau, P., Waddell, T. K. & Karoubi, G., 2020. Cell-Based Therapeutic Approaches for Cystic Fibrosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23 July, pp. 1-20.
- Elborn, S. J., 2016. Cystic fibrosis. *The Lancet*, 26 April, pp. 1-13.
- Elborn, S. J., 2016. Cystic fibrosis. *The Lancet*, 29 April, pp. 1-13.
- Elborn, S. J., 2016. Cystic fibrosis. *The Lancet*, 29 April, pp. 1-13.
- Fanen, P., Wohlhuter-Haddad, A. & Hinzpeter, A., 2014. Genetics of cystic fibrosis: CFTR mutation classifications toward genotype-based CF therapies. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 28 February, pp. 1-9.
- Françoise, A. & Héry-Arnaud, G., 2020. The Microbiome in Cystic Fibrosis Pulmonary Disease. *Genes*, 11 May, pp. 1-17.
- F. R. και συν., 2015. Cystic fibrosis. *Nature reviews*, 14 May, pp. 1-19.
- Hoy, S. M., 2019. Elexacaftor/Ivacaftor/Tezacaftor: First Approval. *Springer Nature*, 29 November, pp. 1-7.
- Hoy, S. M., 2019. Elexacaftor/Ivacaftor/Tezacaftor: First Approval. *Springer Nature*, 29 November, pp. 1-7.
- Kamal, N., Surana, P. & Koh, C., 2018. Liver disease in patients with cystic fibrosis. *Wolters Kluwer Health*, pp. 1-6.
- Lommatzsch, S. T. & Aris, R., 2009. Genetics of Cystic Fibrosis. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, pp. 1-9.
- Lommatzsch, S. T. & Aris, R., 2009. Genetics of Cystic Fibrosis. *Seminars in respiratory and critical care medicine*, pp. 1-9.
- Lommatzsch, S. T. & Taylor-Cousar, J. L., 2018. The combination of tezacaftor and ivacaftor in the treatment of patients with cystic fibrosis: clinical evidence and future prospects in cystic fibrosis therapy. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*, 19 December, pp. 1-13.
- Lopes-Pacheco, M., 2020. CFTR Modulators: The Changing Face of Cystic Fibrosis in the Era of Precision Medicine. *Frontiers in Pharmacology*, 21 February, pp. 1-29.

- Marangi, M. & Pistrutto, G., 2018. Innovative Therapeutic Strategies for Cystic Fibrosis: Moving Forward to CRISPR Technique. *Frontiers in Pharmacology*, 20 April, pp. 1-6.
- Marson, F. A. L., Bertuzzo, C. S. & Ribeiro, J. D., 2016. Classification of CFTR mutation classes. *The Lancet*, 1 July, pp. 1-2.
- Martinovich, K. M. και συν., 2018. The potential of antisense oligonucleotide therapies for inherited childhood lung diseases. *Molecular and Cellular Pediatrics*, pp. 1-10.
- Maule, G., Arosio, D. & Cereseto, A., 2020. Gene Therapy for Cystic Fibrosis: Progress and. *International Journal of Molecular Sciences*, 30 May, pp. 1-13.
- Maule, G., Arosio, D. & Cereseto, A., 2020. Gene Therapy for Cystic Fibrosis: Progress and Challenges of Genome Editing. *International Journal of Molecular Sciences*, 30 May, pp. 1-13.
- McIlwaine, M. P., Lee Son, N. M. & Richmond, M. L., 2014. Physiotherapy and cystic fibrosis: what is the evidence base?. *Wolters Kluwer Health*, November, pp. 1-5.
- Miah, K. M., Hyde, S. C. & Gill, D. R., 2019. Emerging gene therapies for cystic fibrosis. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 17 June, pp. 1-18.
- Moran, O., 2016. The gating of the CFTR channel. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 01 October, pp. 1-8.
- O'Sullivan, B. P. & Freedman, S. D., 2009. Cystic fibrosis. *The Lancet*, 30 May, pp. 1-14.
- O'Sullivan, B. P. & Freedman, S. D., 2009. Cystic fibrosis. *The Lancet*, 30 May, pp. 1-14.
- Ode, K. L. και συν., 2019. Cystic fibrosis related diabetes :Medical management. *Journal of Cystic Fibrosis*, 9 August, pp. 1-9.
- Pacheco, M. L., 2020. CFTR Modulators: The Changing. *Frontiers in Pharmacology*, 21 February, pp. 1-29.
- Pacheco, M. L., 2020. CFTR Modulators: The Changing Face of Cystic Fibrosis in the Era of Precision Medicine. *Frontiers in Pharmacology*, 21 February, pp. 1-29.
- Pollard, B. S. & Pollard, H. B., 2018. Induced pluripotent stem cells for treating cystic fibrosis: State of the science. *Pediatric Pulmonology*, 31 May, pp. 1-18.
- Prickett, M. & Jain, M., 2012. Gene therapy in cystic fibrosis. *Translational Research*, 1 December, pp. 1-10.
- Rafeeq, M. M. & Sayed Murad, H. A., 2017. Cystic fibrosis: current therapeutic targets and future approaches. *Journal of Translational Medicine*, pp. 1-9.
- Rafeeq, M. M. & Sayed Murad, H. A., 2017. Cystic fibrosis: current therapeutic targets and future approaches. *Journal of Translational Medicine*, pp. 1-9.
- Rand, S., Hill, L. & Prasad, S., 2012. Physiotherapy in cystic fibrosis: optimising techniques to improve outcomes. *Paediatric Respiratory Reviews*, pp. 1-7.

- Ratchford, T. L., Teckman, J. H. & Patel, D. R., 2018. Gastrointestinal pathophysiology and nutrition in cystic fibrosis. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 3 August, pp. 1-11.
- Ratjen, F. και συν., 2015. Cystic fibrosis. *NATURE REVIEWS*, 14 May, pp. 1-19.
- Sandsa, D. και συν., 2011. End of life care for patients with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, pp. 1-8.
- Scialo, F. και συν., 2021. Lung Microbiome in Cystic Fibrosis. *Life*, 27 January, pp. 1-7.
- Scott, M. & De Sario, A., 2020. DNA methylation changes in cystic fibrosis: Cause or consequence?. *Clinical Genetics*, 25 February, pp. 1-7.
- Singh, V. K. & Schwarzenberg, S. J., 2017. Pancreatic insufficiency in Cystic Fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, 30 June, pp. 1-9.
- Sonneville, F. και συν., 2015. New Insights about miRNAs in Cystic Fibrosis. *The American Journal of Pathology*, 18 April, pp. 1-12.
- Team, E., 2019. <https://cystic-fibrosis.com/>. [Ηλεκτρονικό]  
Available at: <https://cystic-fibrosis.com/life-expectancy>  
[Πρόσβαση 30 July 2019].
- Turcios, N. L., 2019. Cystic Fibrosis Lung Disease: An Overview. *Respiratory care*, 26 November, pp. 1-19.
- Turcios, N. L., 2019. Cystic Fibrosis Lung Disease: An Overview. *Respiratory Care*, 26 November, pp. 1-19.
- Villate-Beitia, I., Zarate, J., Puras, G. & Pedraz, J. L., 2017. Gene delivery to the lungs: pulmonary gene therapy for cystic fibrosis. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 24 February, pp. 1-41.
- Whitsett, J. A., 2018. Airway Epithelial Differentiation and Mucociliary Clearance. *Annals of the American Thoracic Society*, 3 November, pp. 1-6.

## Πηγές Εικόνων

Εικόνα 1: <https://drtsoumpou.gr/en/obstetrics/cystic-fibrosis/>

Εικόνα 2: <https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/9358-cystic-fibrosis>

Εικόνα 3 :<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/CftrDomainPage.html?domainName=NBD2>

Εικόνα 4: <https://hopkinscf.org/knowledge/cftr/>

Εικόνα 5: <https://www.archbronconeumol.org/en-cftr-protein-repair-therapy-in-articulo-S1579212914000731>

Εικόνα 6: <https://www.mdpi.com/2079-6382/10/3/338/htm>

Εικόνα 7: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cge.13731>