

ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΟΠΑΘΕΙΕΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ

ΘΕΡΑΠΕΙΑ

ΖΩΗ ΡΕΠΑΠΙΝΟΥ - ΝΕΡΑΝΤΖΟΥΛΑΚΗ

ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΟΣ - ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ

**ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΑΙΜΟΛΥΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ - ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗΣ
ΑΝΑΙΜΙΑΣ & ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΟΠΑΘΕΙΩΝ - ΠΗΞΗΣ**

ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΗΡΑΚΛΕΙΟΥ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΟΠΑΘΕΙΕΣ

Διαταραχές της αιμοσφαιρίνης

Διαταραχές του μεταβολισμού της αίμης (πορφυρίες)

Διαταραχές της σφαιρίνης δηλ των πολυπεπτιδικών αλυσίδων

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

1) Με βάση την έκφραση της γονιδιακής διαταραχής

Ποσοτικές Αιμοσφαιρινοπάθειες

έλλειψη ή ελάττωση της παραγωγής μιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας

-Θαλασσαιμίες

α-θαλασσαιμίες

β- θαλασσαιμίες

γ- θαλασσαιμίες

δ- θαλασσαιμίες

δβ- θαλασσαιμίες

γδβ- θαλασσαιμίες

Ποιοτικές Αιμοσφαιρινοπάθειες

διαταραχή στη δομή της αιμοσφαιρίνης

Δρεπανοκυτταρικά σύνδρομα

HbS (β 6Glu \rightarrow Val)

Θαλασσαιμικές Αιμοσφαιρινοπάθειες

δημιουργία παθολογικής αιμοσφαιρίνης και ελαττωμένη σύνθεση αλυσίδων

Hb Constant Spring (α 2 142 Gln)

HbE (β 26Glu \rightarrow Lys)

2) Με βάση τον τρόπο εκδήλωσης της διαταραχής

Ασταθείς αιμοσφαιρίνες >100

1/3 de novo μεταλλάξεις

Hb Setif ($\alpha 2$ 94Asp→Tyr)

Hb Agrinio ($\alpha 2$ 29 Le→Pro)

Hb Heraklion ($\alpha 1$ cd36/37Pro→0)

Hb Ferrara (β 57Asn→Lys)

Hb Köln (β 98Val→Met)

Zürich (β 63His→Arg)

Αιμοσφαιρίνες που προκαλούν κυάνωση

με χαμηλή δεσμευτική ικανότητα οξυγόνου (Hb Kansas β 102Asp→Thr)

με μετατροπή της αιμοσφαιρίνης σε μεθαιμοσφαιρίνη [Hbs M-

Hb Boston ($\alpha 2$ 58His→Tyr), Hb Saskatoon (β 63His→Tyr)]

Αιμοσφαιρίνες που εκδηλώνονται με ερυθροκυττάρωση

με αυξημένη δεσμευτική ικανότητα οξυγόνου >120

Hb San Diego (β 109Val→Met)

Hb Crete (β 129Ala→Pro)

Hb Olympia (β 20Val→Met)

3) Με βάση τον αριθμό και το είδος των γονιδίων που διαταράσσονται

Ετερόζυγες (β_0/β , α^+/α , β_s/β)

Ομόζυγες (β_0/β_0 , α^+/α^+)

Διπλές ετεροζυγωτίες (μικροδρεπανοκυτταρική αναιμία - β_s/β_0 , β^+/β_0 .)

Κληρονομικές

Επίκτητες

Επίκτητη Hb/πάθεια H (συχνότερη)

Σε μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα και άλλα αιματολογικά νεοπλάσματα

ATR (Alpha Thalassemia mental Retardation)

θαλασαιμικός φαινότυπος, δυσμορφίες και διανοητική καθυστέρηση

Σύνδρομο ATR-16 μεγάλες ελλείψεις τμημάτων άλλων γονιδίων στο χρωμόσωμα 16

28 γνωστές ελλείψεις

Σύνδρομο ATR-X διαταραχή στο χρωμόσωμα X (πιθανόν XH2 Locus) που κωδικοποιεί μια DNA ελικάση η οποία επηρεάζει την έκφραση των α-γονιδίων.

ΓΕΝΕΤΙΚΗ

Διαταραχή στη σύνθεση αιμοσφαιρινικών αλυσίδων

Γονιδιακές μεταλλάξεις = αλλαγές στην αλληλουχία των βάσεων μέσα ή έξω από το γονίδιο → νέος γονότυπος - νέος φαινότυπος

Αντικαταστάσεις βάσεων (1 βάση σημειακή μετάλλαξη)

Σημειακές μεταλλάξεις (HbS, HbC, HbE, HbCS)

Ελλείψεις ενός ή περισσότερων γονιδίων (οι περισσότερες α-θαλασσαιμίες και η HPFH ελλειπτικού τύπου)

Διπλασιασμοί ενός ή περισσότερων γονιδίων (ααα/αα)

Παθολογικός επιχιασμός κατά τη μείωση που οδηγεί σε σύντηξη γονιδίων (Hb Lepore)

Έλλειψη νουκλεοτιδίων χωρίς αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης (Hb Gun Hill) β -5 nt

Προσθήκη νουκλεοτιδίων χωρίς αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης (Hb Koriyama) β -5 nt

Μεταλλάξεις που οδηγούν σε αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης (frameshift mutations)

Μεταθέσεις χρωμοσωμάτων

Μεταλλάξεις έξω από τα γονίδια των αιμοσφαιρινικών αλυσίδων μπορεί να οδηγήσουν σε ανώμαλη σύνθεση αλυσίδων όπως π.χ. σε:

Ορισμένες μορφές της δβo-θαλασσαιμίας (έλλειψη στην περιοχή LCR-Locus Control Region του β-γονιδίου)

Ορισμένες μορφές της ΗΡFH (μετάλλαξη στο χρωμόσωμα X και 6)

Το σύνδρομο ATR-X (μετάλλαξη του πιθανολογούμενου γονιδίου XH2 στο χρωμόσωμα X)

Σημειακές μεταλλάξεις μπορεί να προκύψουν

αν κωδικοποιείται το ίδιο αμινοξύ → καμιά συνέπεια (same sense mutation)

αν κωδικοποιείται άλλο αμινοξύ → νέος φαινότυπος (missense mutation) HbS, HbC, HbE

αν δεν κωδικοποιείται κανένα αμινοξύ → κωδίκιο περάτωσης -βραχύτερη αλυσίδα (non-sense mutation) HbMcKees Rocks

αν ένα κωδίκιο περάτωσης μετατρέπεται σε κωδίκιο αμινοξέος - επιμηκυσμένη αλυσίδα (new sense mutation) HbConstant Spring, HbIcaria

ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

Ασυμπτωματικές (β⁺- θαλασσαιμία , δβ- θαλασσαιμία, HPFH, ετερόζυγη δρεπανοκυτταρική, α⁺- θαλασσαιμία, α⁰- θαλασσαιμία , δ-θαλασσαιμία)

Με ήπια κλινική εικόνα (β⁰- θαλασσαιμία, α⁰-θαλασσαιμία)

Με ενδιάμεσης βαρύτητας κλινική εικόνα - ευρεία διακύμανση - (β⁺- θαλασσαιμία/ β⁺- θαλασσαιμία, δβ- θαλασσαιμία/ δβ- θαλασσαιμία, Hb/πάθεια H)

Με βαρεία κλινική εικόνα (μείζων β-θαλασσαιμία, ομόζυγη δρεπανοκυτταρική μετά τον 6ο μήνα, εμβρυϊκός ύδρωπας με HbBart's, κλινικά σοβαρή αιμοσφαιρινοπάθεια H)

Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία

Αναιμία σε κύηση ή σε υποτροπιάζουσες λοιμώξεις

Σπάνια σπληνομεγαλία

Ενδιάμεση β-θαλασσαιμία

Μέτρια αναιμία χωρίς ανάγκη μετάγγισης

Πιθανός υπερσπληνισμός

Μακρά επιβίωση

Μείζων β-θαλασσαιμία

Από τον 3ο-6ο μήνα

Χρόνια αιμολυτική αναιμία

Έντονη ωχρότητα με λεμονοειδή απόχρωση λόγω αναιμίας και ικτέρου - αξιόλογη ηπατοσπληνομεγαλία

Υπερσπληνισμός (αναιμία , λευκοπενία, θρομβοπενία)

Καθυστέρηση ανάπτυξης λόγω της χρόνιας ιστικής υποξίας

Εναπόθεση σιδήρου σε ευαίσθητα όργανα (καρδιά, ήπαρ)

Υπογοναδισμός, καθυστέρηση εφηβείας, υποθυρεοειδισμός , μυοκαρδιοπάθεια , σακχαρώδης διαβήτης

Χολολιθίαση συχνά

Αυξημένη ερυθροποίηση στο Μ.Ο - παραμόρφωση οστών προσώπου

Οστικά άλγη

**Ετερόζυγη δρεπανοκυτταρική
ασυμπτωματική**

**αιματουρία - υποσθενουρία λόγω νεφρικών εμφράκτων κάτω από
συνθήκες υποξίας ή αφυδάτωσης**

**Ομόζυγη δρεπανοκυτταρική
αναιμία**

χολολιθίαση

λοιμώξεις

**κρίσεις (οξεία απλαστική, κρίση εγκλωβισμού, αγγειοαποφρακτική ή
επώδυνη)**

άσηπτη νέκρωση της κεφαλής του μηριαίου

αμφιβληστροειδοπάθεια

έλκη κνημών

πριαπισμός

αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια

οξύ πνευμονικό σύνδρομο

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ

α) Δείγμα : περιφερικό αίμα

Διερεύνηση αναιμίας

Για διαγνωστικούς λόγους

Διάγνωση φορέων

Για την ελάττωση της συχνότητας της νόσου

Γενική αίματος (RBC, Hb, MCV, MCH, RDW, ΔΕΚ, μορφολογία ερυθροκυττάρων) - Φυσιολογικοί ερυθροκυτταρικοί δείκτες δεν αποκλείουν την παρουσία αιμοσφαιρινοπάθειας

Έλεγχος για σιδηροπενία (Σίδηρος και φερριτίνη ορού)

Ανάλυση των αιμοσφαιρινικών κλασμάτων με Ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης ή Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Ποσοτικός προσδιορισμός της HbA2, HbF

Δοκιμασία διαλυτότητας και δοκιμασία δρεπάνωσης

Ενδοερυθροκυτταρικά έγκλειστα (έγκλειστα α-αλυσίδων, έγκλειστα HbH, σωματία Heinz)

διάγνωση στο μεγαλύτερο ποσοστό των εξεταζομένων

Ωσμωτική αντίσταση ερυθροκυττάρων

Δοκιμασίες ασταθούς αιμοσφαιρίνης (θέρμανση, ισοπροπανόλη)

Προσδιορισμός HbM (φασματοφωτομετρία)

**Προσδιορισμός Hb με αυξημένη ή μειωμένη συγγένεια με το οξυγόνο
(καμπύλη κορεσμού της αιμοσφαιρίνης)**

Ηλεκτροφόρηση αλυσίδων

Ισοηλεκτρική εστίαση (IEF- Iso-Electric Focusing)

Ανοσολογικές μέθοδοι (μονοκλωνικά αντισώματα)

Βιοσύνθεση αλυσίδων

Γονιδιακή ανάλυση

**η εφαρμογή τους κατά περίπτωση είναι απαραίτητη για τη διαγνωστική
προσπέλαση και των σπάνιων μορφών αιμοσφαιρινοπαθειών**

β) Δείγμα : κύτταρα του εμβρύου

Προγεννητική διάγνωση

Για την αποφυγή απόκτησης παιδιού με κλινικά σοβαρή αιμοσφαιρινοπάθεια σε ζευγάρι που διατρέχει σημαντικό κίνδυνο DNA από κύτταρα του εμβρύου

Τρόποι λήψης του δείγματος

- **Βιοψία τροφοβλάστης (CVS-Chorionic Villous Sampling) 10η -11η εβδομάδα συχνότητα επιπλοκών <1,5%**
- **Λήψη εμβρυϊκών κυττάρων με αμνιοπαρακέντηση 15η - 20η εβδομάδα**
- **Λήψη εμβρυϊκών κυττάρων από εμβρυϊκό αίμα με ομφαλιδοπαρακέντηση 18η-20η εβδομάδα**
- **Προσπάθεια για ανίχνευση εμβρυϊκών ερυθροβλαστών στο περιφερικό αίμα της εγκύου με κυτταρομετρία ροής**

Προεμφυτευτική γενετική διάγνωση

ανάλυση του βλαστομεριδίου πριν από την εμφύτευση

η γενετική καθοδήγηση πρέπει να γίνεται πρόσωπο με πρόσωπο και σε καμιά περίπτωση με τη μορφή γραπτής οδηγίας

Γονιδιακή ανάλυση

PCR (Polymerase Chain Reaction)

Πολλαπλασιασμός / ενίσχυση (amplification) του γονιδίου που ερευνάται

Διερεύνηση του PCR προϊόντος με :

Probes (ανιχνευτές) και σταθερό υβριδισμό με σεσημασμένα ολιγονουκλεοτίδια συμπληρωματικά για τη φυσιολογική και την παθολογική αλληλουχία (dot blot hybridization)

Περιοριστικά ένζυμα αναγνωρίζουν στο PCR προϊόν με συγκεκριμένη σημειακή μετάλλαξη

Gap PCR παραλλαγή της PCR με δυνατότητα ανίχνευσης κενού στην αλληλουχία

ARMS (Amplification Refractory Mutation System)

παραλλαγή της PCR με δυνατότητα αξιολόγησης του αποτελέσματος αμέσως μετά την αντίδραση χωρίς την ανάγκη υβριδισμού

set εκκινητών (primers) για φυσιολογική και παθολογική αλληλουχία

DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

Ηλεκτροφόρηση του PCR προϊόντος σε αποδιατακτική γέλη ακρυλαμίδης με κλίση πυκνότητας όταν η σημειακή μετάλλαξη είναι άγνωστη

DNA sequencing μελέτη της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας

Συνδυασμός εργαστηριακών ευρημάτων, κλινικών πληροφοριών και ιστορικού

ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία

Χωρίς θεραπεία

Χορήγηση καθημερινά 0,5mg φυλλικού οξέος

Μείζων θαλασσαιμία

Μετάγγιση - αποσιδήρωση

Δρεπανοκυτταρική νόσος

α) Προληπτική αντιμετώπιση

Πενικιλίνη, φυλλικό, εμβολιασμός

Αποφυγή ψύχους, σωματικής κόπωσης, έκθεσης σε λοιμώξεις, λήψης
οινοπνεύματος

β) Αντιμετώπιση των επιπλοκών (δρεπανοκυτταρική κρίση, πριαπισμός,
οξύ πνευμονικό οίδημα, εγκεφαλικό επεισόδιο)

Παυσίπινα, ενυδάτωση, μετάγγιση

γ) Αντιμετώπιση της νόσου

υδροξουρία

Μικροδρεπανοκυτταρική νόσος

Θεραπεία ανάλογη με αυτή της ομόζυγης δρεπανοκυτταρικής

Μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων

Καταστολή των κυττάρων του μυελού των οστών και αντικατάστασή του με αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα από συμβατό υγιή δότη

BMT (Bone Marrow Transplantation) από μυελό των οστών

SCT (Stem Cell Transplantation) από περιφερικό αίμα ή αίμα ομφαλίου λώρου

Γονιδιακή θεραπεία

Θεραπευτική διόρθωση β-θαλασσαιμίας και δρεπανοκυτταρικής αναιμίας

Συλλογή και έγχυση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων από τον ίδιο τον ασθενή αφού προηγηθεί εισαγωγή διορθωμένου γονιδίου με τη βοήθεια ιικών φορέων

Η πρώτη επιτυχής γονιδιακή θεραπεία

Έγινε σε άνδρα 18 ετών - σήμερα είναι 21 ετών

Δημοσιεύθηκε στο περιοδικό Nature τον Σεπτέμβριο του 2010 και μετά από ένα μήνα η εφημερίδα «το Βήμα της Κυριακής» δημοσίευσε σχετικό άρθρο

βο/βΕ γονείς από Ταϊλάνδη και Βιετνάμ διαμονή στη Γαλλία

δεν υπήρχε συμβατός δότης για μεταμόσχευση μυελού

Φιλίπ Λεμπούλς καθηγητής στο Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας και Ιατρικής Έρευνας και επισκέπτης καθηγητής στο Πανεπιστήμιο του Χάρβαντ

30 χρόνια έρευνα για τη γονιδιακή θεραπεία

Τα πρώτα χρόνια παρατηρήθηκαν σοβαρές παρενέργειες και θάνατος ασθενούς λόγω έντονης ανοσολογικής αντίδρασης στον αδενοϊό-φορέα του γονιδίου

Πριν 10 χρόνια ο ίδιος και η ομάδα του εφάρμοσαν επιτυχημένη γονιδιακή θεραπεία σε ποντίκια με δρεπανοκυτταρική αναιμία

Η προσπάθεια εστιάστηκε στην επιλογή κατάλληλου ιού-φορέα και τελευταία χρησιμοποιείται ο ιός HIV σε αδρανοποιημένη μορφή επειδή μπορεί να μεταφέρει μεγάλα τμήματα DNA

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Το φυσιολογικό γονίδιο της β-σφαιρίνης τροποποιείται ελαφρά (1 αμινοξύ του) για να υπάρχει εικόνα της έκφρασής του

Λαμβάνεται Μ.Ο και απομονώνονται σε τρυβλίο κύτταρα (CD34+, ο πληθυσμός τους περιέχει πολυδύναμα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα από τα οποία προέρχονται τα κύτταρα του αίματος)

Μεταφέρεται το υγιές γονίδιο στα αιμοποιητικά κύτταρα του ασθενούς στο τρυβλίο (καλλιέργεια) με όχημα μεταφοράς αδρανοποιημένη μορφή του ιού HIV. Τα κύτταρα στη συνέχεια καταψύχονται

Υποβολή του ασθενούς σε χημειοθεραπεία για να απαλλαγεί ο οργανισμός του από τα «ελαττωματικά» κύτταρα πριν τη μεταμόσχευση

Απόψυξη των κυττάρων και έγχυσή τους στην κυκλοφορία του αίματος

Τα θέματα που προκύπτουν είναι

Τα δεδομένα αφορούν ένα μόνο ασθενή

Είναι αρκετά τα 3 χρόνια για να αποκλεισθεί ενδεχόμενο παρενεργειών ?

Στόχος είναι να γίνει γονιδιακή θεραπεία σε συνολικά 10 άτομα με θαλασσαιμία και δρεπανοκυτταρική αναιμία