

## ***Η γονιδιακή θεραπεία στην καταπολέμηση συγγενών νόσων***

Γονιδιακή θεραπεία είναι η εισαγωγή γονιδίων στα κύτταρα και τους ιστούς ενός οργανισμού που εκδηλώνει μια κληρονομική ως επί το πλείστον νόσο με σκοπό τη θεραπεία της. Στόχος είναι η αντικατάσταση του μεταλλαγμένου αλληλίου με το λειτουργικό. Αν και η τεχνολογία βρίσκεται ακόμα σε πρώιμο στάδιο έχει σημειώσει σημαντική πρόοδο σε κάποια νοσήματα.

Η γονιδιακή θεραπεία περνάει από το πειραματικό στάδιο στην κλινική πράξη υποσχόμενη για το προσεχές μέλλον ριζική θεραπεία για νόσους όπως η μεσογειακή και η δρεπανοκυτταρική αναιμία, η αιμορροφιλία, ο καρκίνος και άλλες παθήσεις που μέχρι σήμερα η προοπτική θεραπείας ήταν ανύπαρκτη ή ελάχιστη. Νοσήματα, όπως οι συγγενείς ανοσοανεπάρκειες, η νόσος του μοσχεύματος κατά του ξενιστή και ορισμένες μορφές καρκίνου, μπορούν να αντιμετωπιστούν αποτελεσματικά με στρατηγικές γονιδιακής θεραπείας. Με τις μεθόδους της γονιδιακής θεραπείας δε γίνεται αντικατάσταση του μεταλλαγμένου γονιδίου στα κύτταρα του οργανισμού αλλά ενσωμάτωση του φυσιολογικού αντιγράφου στο γονιδίωμα συγκεκριμένων σωματικών κυττάρων. Συνεπώς δε μεταβιβάζεται στους απογόνους. [1]

Η γονιδιακή θεραπεία στοχεύει στην επιδιόρθωση γονιδίων που ευθύνονται για συγγενείς ασθένειες, ή και άλλες. Αν και σήμερα η γονιδιακή θεραπεία βρίσκεται, σε μεγάλο βαθμό, σε πειραματικό στάδιο αξίζει να αναφερθούν οι τεχνικές και οι προσεγγίσεις που χρησιμοποιούνται αλλά και οι προοπτικές της.

Η ανάπτυξη της τεχνολογίας του ανασυνδυσμένου DNA και η δημιουργία διαγονιδιακών ζωικών οργανισμών δημιούργησε ελπίδες την ερευνητική κοινότητα για την εφαρμογή των τεχνολογιών αυτών στη γονιδιακή θεραπεία. Η γονιδιακή θεραπεία φέρει

λοιπόν τον ενθουσιασμό μιας τεχνολογίας στην αντιμετώπιση πληθώρας ασθενειών, αλλά παράλληλα τις αντιπαραθέσεις σε κάθε προσπάθεια παρέμβασης στο γενετικό υλικό. Σε αυτό, συνετέλεσε και ο θάνατος (1999) ενός ασθενούς που είχε εθελοντικά υποβληθεί σε γονιδιακή θεραπεία στα πλαίσια ενός πιλοτικού προγράμματος, ξεσηκώνοντας θύελλα αντιπαραθέσεων. Στην πορεία ανέλαβε δράση ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας θέτοντας προϋποθέσεις και περιορισμούς στην εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας σε κλινικά πειράματα.

Στη δεκαετία του '90 περισσότερες από 400 κλινικές δοκιμές άρχισαν να εφαρμόζονται ενάντια σε πολλά γενετικά νοσήματα. Αν και υπάρχουν περιπτώσεις όπου ασθενείς ζουν και μετά από δέκα χρόνια εφαρμογής της μεθόδου (π.χ. η περίπτωση της οξείας συνδυασμένης ανοσοανεπάρκειας), τα πρώτα αποτελέσματα έδειξαν ότι η κατάσταση δεν ήταν τόσο απλή και εύκολη, τουλάχιστον στο βαθμό που ανέμεναν.

Η γονιδιακή θεραπεία εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 1990 σε ένα τετράχρονο κορίτσι που έπασχε από έλλειψη του ενζύμου απαμινάση της αδενοσίνης (ADA), που παίρνει μέρος στον μεταβολισμό των πουρινών στα κύτταρα του μυελού των οστών. Η νόσος εμφανίζει αυτοσωμικό υπολειπόμενο τύπο κληρονομικότητας και οι πάσχοντες χαρακτηρίζονται από χρόνιες λοιμώξεις και έχουν την προδιάθεση για ανάπτυξη καρκίνου σε πολύ μικρή ηλικία. Η διαδικασία που ακολουθείται για τη γονιδιακή θεραπεία της παραπάνω ασθένειας είναι η εξής: [2]

1. Λεμφοκύτταρα του πάσχοντος παιδιού λαμβάνονται και πολλαπλασιάζονται σε κυτταροκαλλιέργειες.
2. Το φυσιολογικό γονίδιο της απαμινάσης της αδενοσίνης ενσωματώνεται στον ιό φορέα (που έχει καταστεί αβλαβής) με την τεχνική του ανασυνδυασμένου DNA.
3. Ο γενετικά τροποποιημένος ιός εισάγεται στα λεμφοκύτταρα
4. Τα γενετικά τροποποιημένα λεμφοκύτταρα εισάγονται με ενδοφλέβια ένεση στο

παιδί και παράγουν το ένζυμο ADA.

Βέβαια τα τροποποιημένα λεμφοκύτταρα δε ζουν πάντα μέσα στον οργανισμό και χρειάζονται επαναλαμβανόμενες εγχύσεις τέτοιων κυττάρων. Ο τύπος αυτός της γονιδιακής θεραπείας ονομάζεται **ex vivo** γιατί τα κύτταρα τροποποιούνται έξω από τον οργανισμό και εισάγονται πάλι σε αυτόν.

Ένα άλλο είδος γονιδιακής θεραπείας εφαρμόστηκε για την αντιμετώπιση της κυστικής ίνωσης το 1993. Η κυστική ίνωση οφείλεται σε μετάλλαξη ενός γονιδίου στο χρωμόσωμα 7 που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που είναι απαραίτητη για τη σωστή λειτουργία των επιθηλιακών κυττάρων των πνευμόνων και όχι μόνο. Το φυσιολογικό γονίδιο ενσωματώθηκε αρχικά σε έναν αδενοϊό. Ο ανασυνδυασμένος ιός εισήλθε στον οργανισμό με ψεκασμό με τη βοήθεια βρογχοσκοπίου και μόλυνε τα κύτταρα του αναπνευστικού συστήματος. Με την εισαγωγή του στα κύτταρα, το φυσιολογικό γονίδιο ενσωματώθηκε στο γονιδίωμα και παράγαγε το φυσιολογικό προϊόν. Αυτό το είδος γονιδιακής θεραπείας, όπου τα φυσιολογικά γονίδια ενσωματώνονται σε μόρια φορείς, που εισάγονται κατευθείαν στον οργανισμό, ονομάζεται *in vivo*. [2]

Συνοψίζοντας, η γονιδιακή θεραπεία, ως τεχνολογία επιδιόρθωσης / αντικατάστασης των ελαττωματικών γονιδίων, ακολουθεί τα παρακάτω στάδια: [3, 4]

- **A. Συστήματα μεταφοράς**
- Εισαγωγή του «θεραπευτικού γονιδίου» στο κύτταρο-στόχο και την αντικατάσταση του ελαττωματικού γονιδίου.
- Επιλογή του κατάλληλου φορέα για την ασφαλή μεταφορά του γονιδίου στο κύτταρο στόχο.

**B. Αποτελεσματική διέλευση των συστημάτων μεταφοράς από τους φραγμούς της κυτταρικής και πυρηνικής μεμβράνης**

- Έκφραση του μεταφερόμενου γονιδίου στον κατάλληλο τόπο και χρόνο

- Ανάπτυξη συστημάτων, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις συμπαγών καρκινικών όγκων, που στοχεύουν στο θάνατο των καρκινικών κυττάρων. [6]

### ***Γ. Έκφραση γονιδίων στον ιστό στόχο στον κατάλληλο χρόνο***

- Αντιμετώπιση των προβλημάτων που απορρέουν από την αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος σε ότι, ξένο προς τον οργανισμό, εισάγεται σ' ένα κύτταρο.

Είναι φανερό, ότι κάθε στάδιο προσέγγισης, κρύβει τις δικές του δυσκολίες και προβληματισμούς, παράγοντες που φαίνεται να επηρεάζουν την εδραίωση της γονιδιακής θεραπείας ως μέσο αντιμετώπισης των γενετικών ασθενειών. Έτσι, στην τεχνολογία της γονιδιακής θεραπείας αναζητείται μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα.

Η ερευνητική δραστηριότητα επικεντρώνεται στα παρακάτω επίπεδα:

**A. Συστήματα μεταφοράς:** Τα συστήματα μεταφοράς αποτέλεσαν και αποτελούν ένα πρώτο επίπεδο ερευνητικών προσπαθειών που είναι συνυφασμένο με την αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Και αυτό γιατί ένα οποιοδήποτε σύστημα μεταφοράς θα πρέπει να περάσει α) τους φραγμούς της κυτταρικής και πυρηνικής μεμβράνης β) να φθάσει στα κύτταρα στόχο και αν είναι δυνατόν, μόνο σ' αυτά και γ) να μπορέσει να ενσωματωθεί στο γενετικό υλικό του κυττάρου και να λειτουργήσει αποτελεσματικά στο κύτταρο στόχο. [3]

Τρία συστήματα μεταφοράς έχουν δοκιμασθεί ή δοκιμάζονται σήμερα με κυριότερο αυτό των ιών (ιικά συστήματα). Οι προσπάθειες αυτές εστιάζονται στη μετατροπή των ιών σε μη παθογόνους, διαδικασία που περιλαμβάνει την αντικατάσταση των παθογόνων γονιδίων τους με τα θεραπευτικά γονίδια και την διατήρηση εκείνων που είναι υπεύθυνα για την εισαγωγή τους στο κύτταρο. Μεταξύ των ιών αυτών συγκαταλέγονται οι ρετροϊοί, οι αδενοϊοί, και οι ερπητοϊοί. Διαφέρουν στο μέγεθος της ένθεσης του DNA που μπορούν να φέρουν, στα προβλήματα τοξικότητας που μπορεί να προκαλέσουν στα κύτταρα, στο βαθμό ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος στα είδη των κυττάρων που προσβάλ-

λουν, στην διάρκεια παραμονής τους σε αυτά και τέλος στην δυνατότητα ενσωμάτωσής τους στο γενετικό υλικό. Οι περισσότεροι μπορεί να εισέλθουν κατευθείαν στο σώμα του ασθενούς, διαδικασία που καλείται *in vivo*. Άλλοι χρησιμοποιούνται για να μολύνουν κύτταρα σε κυτταροκαλλιέργειες και εισάγονται στη συνέχεια στο σώμα του ασθενούς, διαδικασία που είναι γνωστή ως *ex vivo*. [3]

Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζουν δύο μη ιικά συστήματα βιολογικής προέλευσης. Το πρώτο χρησιμοποιεί ορισμένα βακτήρια Gram θετικά, που εισάγονται με ένεση στο σώμα του ασθενούς. Το χαρακτηριστικό των βακτηρίων αυτών είναι ότι μπορούν να ζήσουν κάτω από αναερόβιες συνθήκες, ανάλογες με αυτές που υπάρχουν σε συμπαγείς καρκινικούς όγκους οι οποίοι και χαρακτηρίζονται από υποξία. Η εισαγωγή λοιπόν τροποποιημένων βακτηρίων που μπορούν να εκφράσουν διάφορους τοξικούς παράγοντες για να μειώσουν τον όγκο βρίσκονται σήμερα σε εξέλιξη. Άλλο είδος κυτάρων που χρησιμοποιούνται είναι τα μακροφάγα κύτταρα που συμμετέχουν στην ανοσία του οργανισμού. Η χρησιμοποίηση των μακροφάγων στηρίζεται στην ιδιότητα που έχουν να μεταναστεύουν σε περιοχές φλεγμονών ως απόκριση σε ουσίες που απελευθερώνονται από τα μολυσμένα κύτταρα. Μια τέτοια μέθοδος έχει προταθεί για την στόχευση των αγγείων σε μολυσμένους ιστούς που τα άλλα συστήματα δεν είναι αποτελεσματικά. Τροποποιημένα μακροφάγα που να μπορούν να εκφράζουν θεραπευτικές πρωτεΐνες βρίσκονται σήμερα στο στόχαστρο των ερευνητών. [3]

Επιπλέον έχουν αναπτυχθεί και συστήματα μη βιολογικής προέλευσης, όπως η εισαγωγή «γυμνού» DNA ή DNA καλυμμένου με χρυσό ή σφαιρίδια βολφραμίου ή μέσω των λιποσωμάτων. Τα λιποσώματα είναι σταγονίδια λίπους που περικλείουν το DNA και το προστατεύουν από την αποικοδόμησή του. Στα περισσότερα απ' αυτά τα συστήματα, η είσοδος τους γίνεται με ένεση στο σώμα του ασθενούς. Αν και η μεθοδολογία αυτή είναι φθηνή και κυρίως δεν δημιουργεί, στις περισσότερες περιπτώσεις, διέγερση του ανο-

σοποιητικού συστήματος, εν τούτοις η αποτελεσματικότητά της είναι περιορισμένη. Απαιτεί την είσοδο μεγάλων ποσοτήτων πλασμιδιακού DNA ενώ ο χρόνος διατήρησής τους στο σώμα του ασθενούς έχει μικρή διάρκεια. Παρουσιάζουν ιστοειδικότητα, η δράση των λιποσωμάτων π.χ έχει αποδειχθεί ικανοποιητική σε παθήσεις του πνεύμονα ( περίπτωση κυστικής ίνωσης) [3]

**B.** Το δεύτερο επίπεδο ερευνητικής δραστηριότητας αφορά την αποτελεσματική διέλευση των συστημάτων μεταφοράς από τους φραγμούς της κυτταρικής και της πυρηνικής μεμβράνης. Αυτό σχετίζεται τόσο με το μέγεθος του μεταφορέα όσο και με πρωτεϊνικά συστήματα που διευκολύνουν την ενεργό μεταφορά τους στο εσωτερικό του κυττάρου. Στόχος όλων αυτών των προσπαθειών είναι ο μεταφορέας και συνεπώς το θεραπευτικό γονίδιο να φθάσει με ασφάλεια στον ιστό-στόχο. [3]

**Γ.** Το τελευταίο επίπεδο αφορά την έκφραση των γονιδίων, που το κάθε σύστημα μεταφέρει, στον ιστό-στόχο, στον κατάλληλο χρόνο. Οι προσπάθειες αυτές έχουν επικεντρωθεί στην χρησιμοποίηση ειδικών υποκινητών και ενισχυτών που να ενεργοποιούνται μόνον στους ιστούς ή κύτταρα στόχους. [3]

Στην Ελλάδα επιλεγμένες ερευνητικές ομάδες ασχολούνται με τη γονιδιακή θεραπεία της ομόζυγου μεσογειακής αναιμίας. Μάλιστα, χάρη σε πρόσφατες εξελίξεις, φαίνεται ότι η γονιδιακή θεραπεία περνάει πλέον από το πειραματικό στο κλινικό στάδιο. Συγκεκριμένα στη μονάδα γονιδιακής και κυτταρικής θεραπείας του νοσοκομείου Παπανικολάου της Θεσσαλονίκης ξεκίνησε πιλοτική προκαταρκτική μελέτη για να εκτιμηθεί η ασφάλεια και αποτελεσματικότητα της συλλογής των αιμοποιητικών αρχέγονων κυττάρων από ασθενείς με μεσογειακή αναιμία, καθώς και η αποτελεσματικότητα της μεταφοράς και θεραπευτικής έκφρασης του γονιδίου της β-σφαιρίνης στα αιμοποιητικά κύτταρα των ασθενών με τη χρη-

σιμοποίηση ενός μη λοιμογόνου ιικού φορέα. Στην περίπτωση της μεσογειακής αναιμίας, όπου η παραγωγή της αιμοσφαιρίνης είναι σημαντικά μειωμένη ή απουσιάζει εντελώς, η εισαγωγή του φυσιολογικού γονιδίου της β-σφαιρίνης στα πρώιμα αιμοποιητικά κύτταρα των ασθενών και στη συνέχεια η φυσιολογική έκφρασή του στα ερυθρά αιμοσφαίρια αναμένεται να οδηγήσει σε παραγωγή αιμοσφαιρίνης σε επίπεδα ικανά να καταστήσουν τους ασθενείς ανεξάρτητους από μεταγγίσεις αίματος.

Παρομοίως, η γονιδιακή θεραπεία της φυλοσύνδετης (κληρονομούμενης από τη μητέρα) βαρείας συνδυασμένης ανοσοανεπάρκειας, νόσου θανατηφόρου στην πρώτη παιδική ηλικία, είναι πραγματικότητα. Παρομοίως, η νόσος του μοσχεύματος κατά του ξενιστή, μια βαριά και δυνητικά θανατηφόρος επιπλοκή της αλλογενούς μεταμόσχευσης μυελού των οστών, αντιμετωπίζεται αποτελεσματικά με τη γονιδιακή θεραπεία. Για την αιμοφιλία επίσης, τα πρώτα αποτελέσματα κλινικών μελετών είναι πολύ ενθαρρυντικά.

Είναι φανερό ότι έως πρόσφατα η πιθανότητα επιτυχούς γονιδιακής θεραπείας ανήκε στη σφαίρα της επιστημονικής φαντασίας. Με τον προσδιορισμό των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τις συγγενείς ασθένειες και την εύρεση της αλληλουχίας τους δημιουργούνται νέες προοπτικές για τη γονιδιακή θεραπεία ασθενειών, που μέχρι σήμερα είναι περιορισμένη αφού δεν έχουν ακόμα ξεπεραστεί τα προβλήματα σχετικά με τη χρήση φορέων. Έτσι λοιπόν η ανάπτυξη κατάλληλων φορέων είναι ο επόμενος στόχος για τη βελτίωση των μεθόδων της γονιδιακής θεραπείας. [5]

---

### **BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- [1]. Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer Βιοχημεία Τόμος 1, Κεφ. 6 Εξερευνώντας τα γονίδια σελ. 182-184.
- [2] ΒΙΟΛΟΓΙΑ θετικής κατεύθυνσης Γ' τάξης Ενιαίου Λυκείου, 2006 σελ. 122-125.
- [3]. Αντιγόνη Ζαχαροπούλου, Γονιδιακή Θεραπεία στον Άνθρωπο, Υπερκείμενο ΚΦΕ 53, σελ. 1-5.

[4]. Παναγιώτης Κατσώρης, Μοριακή Βιολογία, Υπερκείμενο ΚΦΕ53, 2008, σελ114-119.

[5]. Human Genome Project Information: Gene Therapy

[http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human\\_Genome/medicine/genetherapy.shtml](http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/medicine/genetherapy.shtml)

[6] Richard A. Morgan, Mark E. Dudley, John R. Wunderlich, Marybeth S. Hughes, James C. Yang, Richard M. Sherry, Richard E. Royal, Suzanne L. Topalian, Udai S. Kammula, Nicholas P. Restifo, Zhili Zheng, Azam Nahvi, Christiaan R. de Vries, Linda J. Rogers-Freezer, Sharon A. Mavroukakis, and Steven A. Rosenberg Cancer Regression in Patients After Transfer of Genetically Engineered Lymphocytes. Science 2006 October 6; 314 (5796): 126-129.