

## ΠΡΩΤΟΤΥΠΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

# Εξορθολογισμός της φαρμακευτικής χορήγησης χλωροκίνης και ρασμπουρικάσης σε ασθενείς με ανεπάρκεια του ενζύμου G6PD

Γεώργιος Ψάριος, Ευανθία Ηλιοπούλου, Μαρία Θεριανού, Ζωή Γκιζαριώτη, Γεώργιος Π. Πατρινός, Σταυρούλα Σιαμόγλου\*

Πανεπιστήμιο Πατρών, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Φαρμακευτικής  
Εργαστήριο Φαρμακογονιδιωματικής και Εξατομικευμένης Θεραπείας, Πάτρα

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ανεπάρκεια του ενζύμου αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD) εντοπίζεται με αυξημένη συχνότητα στη Ελλάδα. Το υπεύθυνο γονίδιο είναι φυλοσύνδετο, και ένα αλληλόμορφο του πολυμορφισμού rs5030868 συσχετίζεται με την ανεπάρκεια κατηγορίας II του G6PD που ενέχει κίνδυνο αιμολυτικής αναιμίας κατά τη λήψη των φαρμάκων χλωροκίνη και ρασμπουρικάση με φαρμακογονιδιωματικές συσχετίσεις επίπεδου 3 και 1A αντίστοιχα. Μια γρήγορη, εύκολη, αξιόπιστη και οικονομική μέθοδος γονοτύπησης του

πολυμορφικού τύπου rs5030868 με φαινολική εκχύλιση DNA και αλληλοειδική γονοτύπηση τεσσάρων εκκινήτων με PCR σε φορητό εργαστήριο μοριακής βιολογίας αναπτύχθηκε για να επιτρέψει τη βελτιστοποίηση χορήγησης της χλωροκίνης και της ρασμπουρικάσης ειδικά σε ασθενείς με νόσο CoViD-19 σε περιόδους κρίσης. Η μέθοδος συγκρίθηκε με γονοτύπηση μέσω αλληλούχισης κατά Sanger και με ταυτόσημες PCR σε εδραίο θερμικό κυκλοποιητή και αποδείχθηκε αξιόπιστη με τιμή  $p > .5$  στη δοκιμή κατά Fisher.

ΛΕΞΕΙΣ ΕΥΡΕΤΗΡΙΟΥ: 2MoBiL, φορητό εργαστήριο μοριακής βιολογίας, G6PD, ανεπάρκεια ενζύμου G6PD, χλωροκίνη, ρασμπουρικάση, γονοτύπηση

## \* Αντεπιστέλλων Συγγραφέας

Πανεπιστήμιο Πατρών, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εργαστήριο Φαρμακογονιδιωματικής και Εξατομικευμένης Θεραπείας, Πανεπιστημιούπολη, Ρίο, 265 04, Πάτρα Τηλέφωνο Επικοινωνίας: 2610-962368, Fax: 2610-969955, Email: permed@upatras.gr

## Εισαγωγή

Η πανδημία του κορωνοϊού ξεκίνησε το 2019 από το στέλεχος κορωνοϊού οξέος αναπνευστικού συνδρόμου 2 (SARS-CoV-2/2019 nCoV) και συνεχίζει να αποτελεί σοβαρή απειλή για την δημόσια υγεία [1]. Από τις 3 Μαρτίου 2020 ως τις 18 Σεπτεμβρίου 2020 έχουν επιβεβαιωθεί πάνω από 90.000 περιπτώσεις στην Κίνα και πάνω από 6,6 εκατομμύρια στις Ηνωμένες Πολιτείες, ενώ οι θάνατοι έχουν φτάσει τους 946.685 παγκοσμίως. Πιο συγκεκριμένα, στην Ελλάδα έχουν σημειωθεί πάνω από 14.000 κρούσματα του ιού και 325 θάνατοι [2].

Σύμφωνα με τον Εθνικό Οργανισμό Δημόσιας Υγείας και τη Διεύθυνση Επιδημιολογικής Επιτήρησης και Παρέμβασης για λοιμώδη νοσήματα τονίζεται ότι δεν υπάρχει αποδεδειγμένη θεραπεία για τη λοίμωξη COVID-19. Μεταξύ των προτεινόμενων φαρμάκων είναι η φωσφορική χλωροκίνη και η θειική υδροξυχλωροκίνη [3][4][5][6][7]. Πρόσφατα, αξιολογήθηκαν *in vitro* πέντε φάρμακα εγκεκριμένα από τον FDA και δύο αντιικά φάρμακα ευρέως φάσματος έναντι του SARS-CoV-2 και προέκυψε ότι «η χλωροκίνη είναι πολύ αποτελεσματική για τον έλεγχο της μόλυνσης από τον 2019-nCoV *in vitro* και φαίνεται ότι πρέπει να αξιολογηθεί σε ανθρώπους που πάσχουν από τη νέα νόσο του κορωνοϊού» [8-9]. Σύμφωνα με μία συστηματική ανασκόπηση επί της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας της χλωροκίνης για τη θεραπεία της COVID-19, η χλωροκίνη φαίνεται να είναι αποτελεσματική στον περιορισμό της αντιγραφής του SARS-CoV-2 *in vitro* [10].

Η φωσφορική χλωροκίνη και η θειική υδροξυχλωροκίνη χρειάζονται προσοχή στην χορήγησή τους σε άτομα με ανεπάρκεια του ενζύμου αφυδρογονάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης (Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase, G6PD). Το ένζυμο G6PD εξασφαλίζει την παραγωγή NADPH στα ερυθροκύτταρα διατηρώντας τα επίπεδα της γλουταθειόνης μειωμένα. Το ένζυμο δρα στα ερυθροκύτταρα ως πηγή ηλεκτρονίων σε αντιδράσεις εξουδετέρωσης ελεύθερων οξειδωτικών ριζών. Για το λόγο αυτό, κύτταρα στα οποία απουσιάζει το G6PD είναι ευαίσθητα στο οξειδωτικό στρες [11]. Αλλαγές στο γονίδιο *G6PD* μειώνουν την ικανότητα του ερυθροκυττάρου να ανθίσταται στο οξειδωτικό στρες, επιφέροντας αιμόλυση δυνητικά θανατηφόρα [12-13]. Ο κίνδυνος αιμολυτικών διαταραχών επηρεάζει κυρίως τα άτομα με ανεπάρκεια G6PD των κατηγοριών II και III, που ορίζονται αντίστοιχα ως σοβαρή ενζυμική ανεπάρκεια και μέτρια έως ήπια ενζυμική ανεπάρκεια με κίνδυνο εμφάνισης οξείας αιμόλυσης, βάσει του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO)[11].

Για το *G6PD* έχουν χαρακτηριστεί πάνω από 100 δι-

αφορετικές σημειακές μεταλλάξεις υποδηλώνοντας τη μεγάλη γενετική του ετερογένεια. Το παραλλαγμένο αλληλόμορφο του τύπου rs5030868 επί του γονιδίου *G6PD* βρέθηκε στην Ελλάδα σε ποσοστό 77% μεταξύ των εξετασθέντων ασθενών με ανεπάρκεια G6PD [14]. Επιπλέον, η ίδια γενετική παραλλαγή βρέθηκε σε συχνότητα 80% μεταξύ ατόμων με σοβαρή ανεπάρκεια G6PD (δραστικότητα του G6PD μικρότερη από το 10% της φυσιολογικής) και εμφάνιση οξείας αιμολυτικής αναιμίας. Η παραπάνω γενετική παραλλαγή φαίνεται να συσχετίζεται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας με ανεπάρκεια κατηγορίας II του G6PD σε πληθυσμούς της Μεσογείου και της Μέσης Ανατολής [4, 15].

Ο τύπος rs5030868 έχει φαρμακογονιδιωματική συσχέτιση επιπέδου 1A με την ρασμπουρικάση και επίπεδου 3 με την χλωροκίνη [16]. Η ρασμπουρικάση είναι ισχυρός ουρικολυτικός παράγοντας που καταλύει την ενζυματική οξειδωση του ουρικού οξέος σε αλλαντοΐνη και χορηγείται κατά της ουρικής αρθρίτιδας και της υπερουριαιμίας. Άτομα παραλλαγμένα ως προς το rs5030868 και λαμβάνουν ρασμπουρικάση έχουν αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης αιμόλυσης [17]. Σύμφωνα με τον FDA, στα άτομα τα οποία πάσχουν από ανεπάρκεια G6PD, ιδιαίτερα στους ασθενείς Αφρικανικής ή Μεσογειακής καταγωγής, θα πρέπει να διακόπτεται άμεσα η χορήγηση του συγκεκριμένου φαρμάκου.

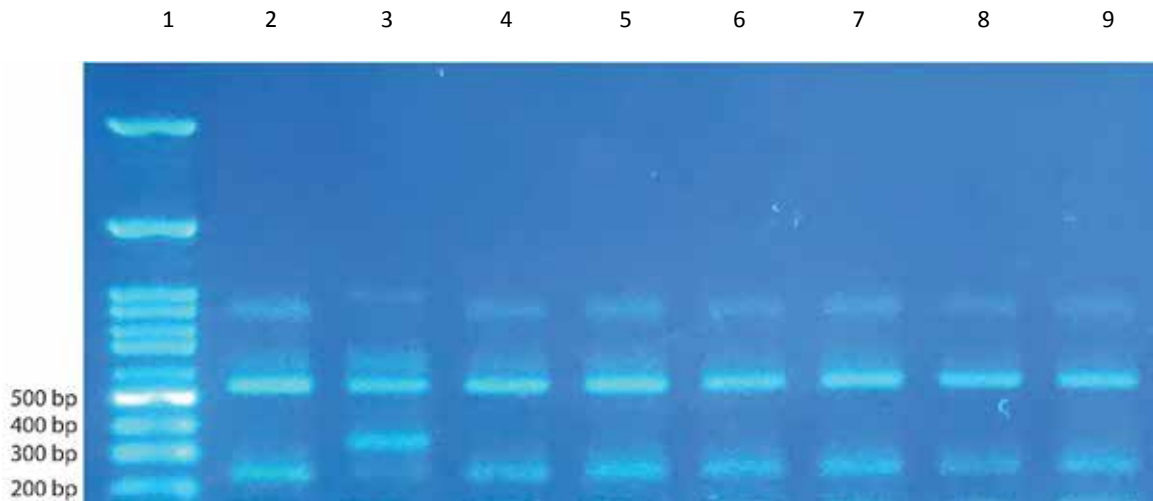
Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, περιγράφεται, με τη βοήθεια ενός φορητού εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας (2MoBiL), η ανάπτυξη ενός γρήγορου, αξιόπιστου και αποτελεσματικού τρόπου γονοτύπησης του τύπου rs5030868 για τη διευκόλυνση του εξορθολογισμού της χορήγησης της χλωροκίνης και της ρασμπουρικάσης στον ελληνικό πληθυσμό, προς αποφυγή της εμφάνισης ανεπιθύμητων ενεργειών σε ασθενείς με ανεπάρκεια του ενζύμου G6PD, ειδικά εκείνων που νοσούν από CoViD-19.

## Υλικά και μέθοδοι

### Απομόνωση DNA και γονοτύπηση

Λαμβάνοντας γραπτή συναίνεση από ασθενείς ελληνικής καταγωγής και με την παράλληλη έγκριση της μελέτης από την Επιτροπή Δεοντολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Πατρών, απομονώθηκε DNA από περιφερικό αίμα εθελοντών με τη μέθοδο φαινολικής εκχύλισης το οποίο γονοτυπήθηκε ως προς τον πολυμορφισμό rs5030868 του *G6PD*.

Ο πολυμορφισμός rs5030868 (G>A) εντοπίζεται στο χρωμόσωμα X [3-18] με μέγιστη συχνότητα εμφάνισης του υπολειπόμενου αλληλομόρφου 0,02 και οδηγεί σε αντικατάσταση της σερίνης στη θέση 218 της πολυπε-



**Εικόνα 1:** Απεικόνιση των γονοτύπων 6 δειγμάτων κατόπιν αλληλο-ειδικής ενίσχυσης τεσσάρων εκκινητών σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%. Στην διαδρομή 1 αντιστοιχεί ο μάρτυρας μοριακών μεγεθών (100bp DNA ladder). Τα δείγματα στις διαδρομές 2,4,5,6,7,8,9 φέρουν μόνο το αλληλόμορφο G (ζώνη στα 538bp και 238bp), ενώ το δείγμα στη διαδρομή 3 φέρει και το αλληλόμορφο A (ζώνη στα 538bp, 338bp και 238bp).

πτιδικής αλυσίδας από φαινυλαλανίνη (p.Ser218Phe). Η αλλαγή αυτή έχει ως αποτέλεσμα την μειωμένη καταλυτική δραστηριότητα και σταθερότητα του ενζύμου G6PD [19] αλλά και αυξημένη αντοχή έναντι του πλασμωδίου της Ελονοσίας η οποία έχει υψηλά ποσοστά εμφάνισης στους πληθυσμούς της Μεσογείου και της Μέσης Ανατολής [11- 20].

Η μέθοδος γονοτύπησης που εφαρμόστηκε ήταν η αλληλοειδική γονοτύπηση τεσσάρων εκκινητών (T-ARMS-PCR, tetra-primer amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction). Οι εκκινητές συντέθηκαν σχεδιάζοντας έναν εσωτερικό αριστερό και έναν εσωτερικό δεξί εκκινητή που υβριδοποιούνται αποκλειστικά είτε στο G είτε στο A αλληλόμορφο αντίστοιχα. Ο αριστερός εσωτερικός εκκινητής σε συνδυασμό με τον δεξί εξωτερικό προάγουν τον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA που πιστοποιεί το αρχέγονο αλληλόμορφο G ενώ ο εσωτερικός δεξί εκκινητής σε συνδυασμό με τον εξωτερικό αριστερό εκκινητή πιστοποιούν το παραλλαγμένο αλληλόμορφο A.

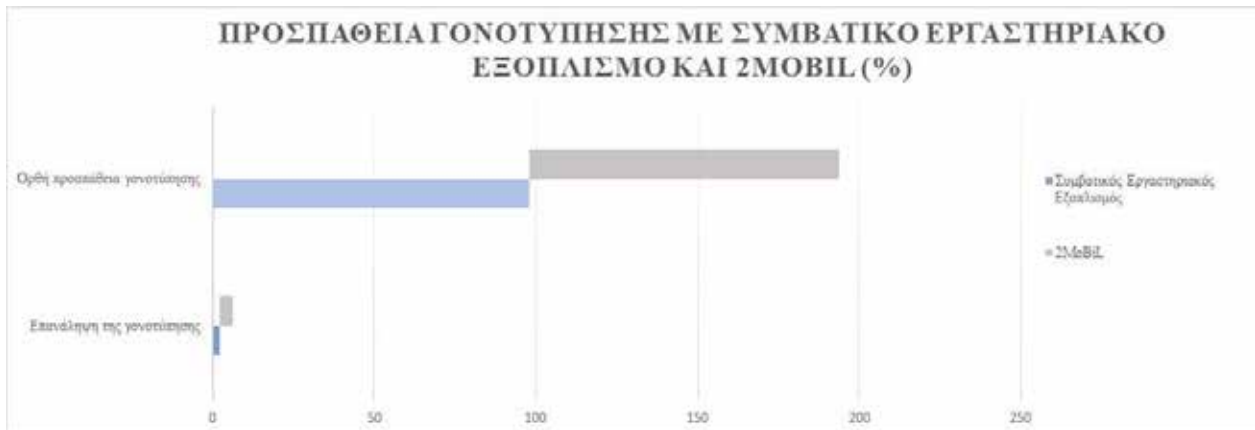
Οι αντιδράσεις έγιναν συγκριτικά σε συμβατικό εδραίο θερμικό κυκλοποιητή (Kyratex) και στις αντίστοιχες μονάδες φορητού εργαστηρίου μοριακής βιολογίας 2MoBiL (BentoLab). Το 2MoBiL ζυγίζει 3,5kg και φέρει θερμικό κυκλοποιητή χωρητικότητας 32 δειγμάτων, μικροφυγόκεντρο χωρητικότητας 6 δειγμάτων και δυνατότητα περιστροφής 500-8.000g, συσκευή ηλε-

κτροφόρησης 50-120V και τράπεζα παρατήρησης LED. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης είναι αποσπώμενη, και όταν αποσυνδεθεί μπορεί να απομακρυνθεί από την ενιαία μονάδα του 2MoBiL.

Χρησιμοποιήθηκε Ταq πολυμεράση (enzyQUEST) με θερμικό πρωτόκολλο προθέρμανσης στους 95°C για 5min, ακολουθούμενη από 38 κύκλους (αποδιάταξη στους 95°C για 30s, υβριδοποίηση στους 60°C για 80s και επέκτασης στους 72°C για 60s), και από ένα τελικό βήμα επέκτασης στους 72°C για 5 λεπτά. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων ενίσχυσης σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%. Οι γονότυποι διακρίνονται ελέγχοντας τα μεγέθη των ζωνών σε σχέση με τον μάρτυρα μοριακών μεγεθών βήματος 100bp (Nippon Genetics) (**Εικόνα 1**).

### Στατιστική ανάλυση

Πραγματοποιήθηκε σύγκριση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν με το 2MoBiL και των αποτελεσμάτων που προέκυψαν με τον συμβατικό εργαστηριακό εδραίο εξοπλισμό, χρησιμοποιώντας ως πρότυπο αποτέλεσμα το αποτέλεσμα γονοτύπησης με αλληλούχιση κατά Sanger. Η σύγκριση και η αναγνώριση των γονοτύπων έγινε ορίζοντας το γονότυπο για το κάθε αναλυθέν δείγμα ως «Σωστό» ή «Λάθος» (N=50 δείγματα), ανάλογα με την εμφάνιση των αντίστοιχων ζωνών σε όλα τα παραγόμενα πηκτώματα αγαρόζης. Για τη σύγκριση μεταξύ



**Εικόνα 2:** Απεικόνιση των ποσοστών των επιτυχημένων γονοτυπήσεων με τον συμβατικό εργαστηριακό εξοπλισμό (μπλέ) και με το 2MoBiL (γκρί). Το ποσοστό των ορθών γονοτυπικών αποτελεσμάτων στο σύνολο των 50 αναλυθέντων δειγμάτων, εφαρμόζοντας την ίδια μέθοδο γονοτύπησης στον συμβατικό εργαστηριακό εξοπλισμό και στο 2MoBiL, είναι 98% και 96% αντίστοιχως.

των δύο μεθόδων, πραγματοποιήθηκε η δοκιμή κατά Fisher δημιουργώντας έναν πίνακα 2x2 στο λογισμικό GraphPad και υπολογίστηκε επίσης η αντίστοιχη τιμή  $p$ .

### Αποτελέσματα

Πραγματοποιήθηκε η ίδια μέθοδος γονοτύπησης για 50 δείγματα χρησιμοποιώντας τον εδραίο συμβατικό εργαστηριακό εξοπλισμό και το φορητό εργαστήριο μοριακής βιολογίας 2MoBiL. Η γραφική αναπαράσταση της σύγκρισης φαίνεται στο γράφημα που απεικονίζει με τη μορφή ραβδογραμμάτων τις επιτυχημένες προσπάθειες γονοτύπησης και την ανάγκη των επαναληπτικών προσπαθειών γονοτύπησης (**Εικόνα 2**).

Για να εκτιμηθεί η σημασία αυτής της διαφοράς, πραγματοποιήθηκε η ακριβής δοκιμή του Fisher. Όπως περιγράφεται στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι» για την αξιολόγηση της γονοτύπησης από τους ερευνητές χρησιμοποιήθηκε η βαθμολόγηση των γονοτυπικών αποτελεσμάτων με τους όρους «Σωστό» ή «Λάθος». Υποθέσαμε ότι η ικανότητα γονοτύπησης του 2MoBiL και της συμβατικής επιτραπέζιας στο φαινόμενο Peltier. Η τιμή  $p$  είναι υψηλότερη από το 0,05, οπότε η μηδενική υπόθεσή μας δεν απορρίπτεται και η σχέση μεταξύ των δύο εξεταζόμενων μεθόδων δεν είναι στατιστικά σημαντική. Επομένως, η προτεινόμενη μέθοδος που βασίζεται σε 2MoBiL μπορεί να πραγματοποιήσει με επιτυχία μια ακριβή ανάλυση γονότυπου, παράγοντας αποτελέσματα συγκρίσιμα με μια συμβατική επιτραπέζια εργαστηριακή μέθοδο και την μέθοδο αλληλούχισης κατά Sanger. Η σύγκριση μεταξύ του 2MoBiL και του τυπικού

εδραίου εργαστηριακού εξοπλισμού παρουσιάζεται στην **Εικόνα 3**.

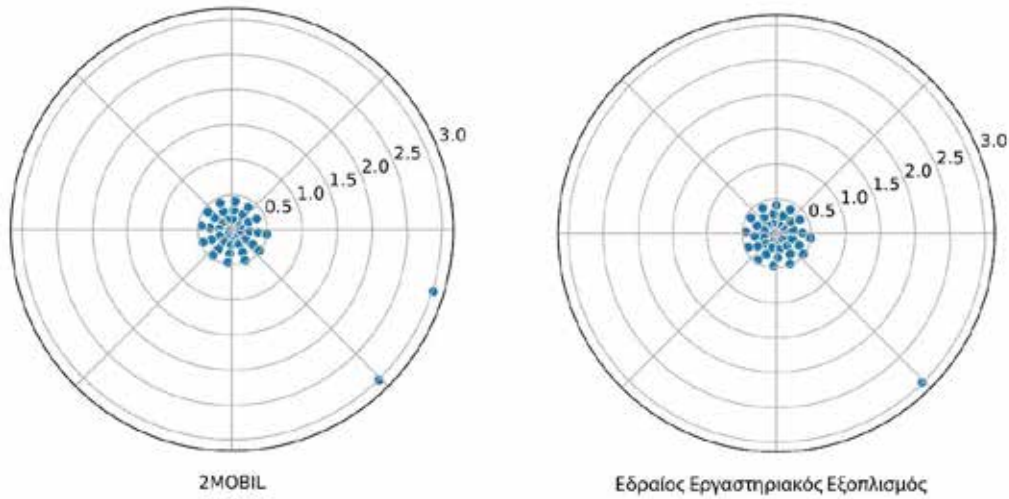
### Συζήτηση

Στα Πλαίσια της προτεινόμενης χορήγησης χλωροκίνης για την αντιμετώπιση της νόσου που προκαλεί ο SARS-CoV2 [21], κρίνεται απαραίτητη η εξατομίκευση της πιθανής θεραπείας για τα άτομα που εμφανίζουν ανεπάρκεια του ενζύμου G6PD, γεγονός που δύναται να προκαλέσει αιμολυτικό επεισόδιο. Ταυτόχρονα, αιμολυτικό επεισόδιο προκαλείται από την χορήγηση ρασμπουρικάσης σε άτομα με αυξημένα επίπεδα ουρικού οξέος και παράλληλη ανεπάρκεια του ενζύμου. Με άξονα την προσβασιμότητα όλων των ατόμων σε έγκυρες διαγνωστικές μεθόδους, οργανώθηκε συγκριτική μελέτη μεταξύ εδραίου συμβατικού εργαστηριακού εξοπλισμού και 2MoBiL. Μέσω του 2MoBiL, χρησιμοποιώντας την τεχνική της αλληλο-ειδικής γονοτύπησης τεσσάρων εκκινήτων, είναι δυνατή η ταχεία, ακριβής και οικονομική γονοτύπηση του rs5030868.

Η εφαρμογή των φορητών εργαστηρίων έχει ήδη επεκταθεί στους διαγνωστικούς και φαρμακογονιδιωματικούς τομείς [22]. Η αποτελεσματικότητα και η ακρίβεια στην ανίχνευση μεταλλάξεων με τη χρήση αυτών των συσκευών έχει συμβάλει στη διάγνωση της νόσου της αιμοχρωμάτωσης και των μυελοπλασματοειδών νεοπλασμάτων [23, 24].

Στα πλαίσια προηγούμενων μελετών προτυποποιήθηκαν μεθοδολογίες ανίχνευσης μολυσματικών παραγόντων δυνητικώς επικίνδυνων για τους ανθρώπους, τα





**Εικόνα 3:** Απεικόνιση των συγκρινόμενων πειραματικών προσπαθειών ανάλυσης των ίδιων δειγμάτων και με την ίδια μέθοδο γονοτύπησης με το 2MoBiL και σε συμβατικό εργαστηριακό εξοπλισμό. Οι μπλε κουκίδες που είναι στο κέντρο του στόχου δείχνουν τις επιτυχημένες προσπάθειες ανάλυσης που χαρακτηρίζονται με τη λήψη ίδιου γονοτυπικού αποτελέσματος τόσο με το 2MoBiL όσο και με τον εδραίο θερμοκυκλοποιητή. Μόλις δύο γονοτυπήσεις με το 2Mobil απέκλιναν από αυτές της αλληλούχισης, έναντι μίας με τον εδραίο θερμοκυκλοποιητή

ζώα, τις αγροτικές καλλιέργειες ή το περιβάλλον γενικότερα βασισμένες σε χρήση συστήματος 2MoBiL [25]. Επιπλέον, σε πρόσφατη μελέτη πραγματοποιήθηκε η προτυποποίηση μεθοδολογίας βασισμένης σε 2MoBiL για ταχεία και αποτελεσματική εξατομίκευση της θεραπείας καρδιαγγειακών νοσημάτων με συνταγογράφηση στατινών [26].

Στην παρούσα μελέτη, αποδείχθηκε πως ένα φορητό εργαστήριο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αξιόπιστη διαγνωστική προσέγγιση για τη χορήγηση χλωροκίνης και ρασμπουρικάσης, οδηγώντας έτσι στην εξατομίκευση αυτών των θεραπευτικών προσεγγίσεων βάσει την ανεπάρκεια ενζύμου G6PD.

Η real-time PCR χαρακτηρίζεται ως η βέλτιστη μέθοδος γονοτύπησης, εφόσον σε πραγματικό χρόνο πραγματοποιεί ταχεία, και ακριβή ανίχνευση αλληλουχιών [27-29]. Πρέπει να αναφερθεί ότι η παραπάνω μέθοδος χρησιμοποιείται ευρύτατα και για την ανίχνευση φαρμακογονιδιωματικών δεικτών που αντιστοιχούν σε διάφορες ασθένειες, όπως στεφανιαία νοσήματα, γαστρικό έλκος, χρόνια ηπατίτιδα C, ψυχικές διαταραχές και άλλες [27, 30-32]. Βέβαια, η τεχνική αυτή, παρά την υψηλή πιστότητα των αποτελεσμάτων παρουσιάζει δυσκολία στην εφαρμογή της, καθώς απαιτεί ένα κεντρικό κλινικό εργαστήριο με εξοπλισμό υψηλής απόδοσης και καλά εκπαιδευμένο προσωπικό [28]. Υποστηρίζεται

ότι η ARMS-PCR μπορεί να δώσει εξίσου αξιόπιστα αποτελέσματα με την RT-PCR κατά τον εντοπισμό φαρμακογονιδιωματικών δεικτών, λαμβάνοντας ταυτόχρονα υπόψιν ότι αποτελεί μια πιο φθηνή και γρήγορη μέθοδο γονοτύπησης [33].

Με την παρούσα μέθοδο γονοτύπησης με το 2MoBiL αποφεύγεται η μετακίνηση των βιολογικών δειγμάτων σε κεντρικό διαγνωστικό εργαστήριο. Ταυτόχρονα, εγκαθιστώντας ένα φορητό διαγνωστικό εργαστήριο στην περιοχή ενδιαφέροντος, η οποία ενδέχεται να είναι απομακρυσμένη και δύσκολα προσβάσιμη, όχι μόνο εκμηδενίζεται ο χρόνος μεταφοράς δειγμάτων και κατ' επέκταση ο χρόνος που απαιτείται για να εξαχθούν τα αποτελέσματα, ιδίως σε ανάγκη επανεξέτασης/επαναληπτικής δειγματοληψίας, αλλά ευνοούνται οι προβλέψεις και η συμβατότητα με διαδικασίες βιοασφαλείας. Συγκεκριμένα, εξαλείφεται ο βιοκίνδυνος κατά τη μεταφορά δυνητικών μολυσματικών δειγμάτων σε μεγάλες αποστάσεις, και συρρικνώνονται τα εκτελεστά πρωτόκολλα σε περίπτωση lockdown της περιοχής.

Συνεπώς προτείνεται η ενσωμάτωση του 2MoBiL στην κλινική πράξη προς έγκαιρη διευθέτηση της χορηγούμενης δοσολογίας των φαρμακευτικών ουσιών χλωροκίνης και ρασμπουρικάσης σε άτομα με ανεπάρκεια του ενζύμου G6PD ανεξαρτήτως χιλιομετρικής απόστασης του ενδιαφερόμενου από διαγνωστικά εργαστήρια

μεγάλων αστικών κέντρων.

### Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία και το φορητό εργαστήριο 2MoBiL χρηματοδοτείται από πόρους του Εργαστηρίου Φαρμακογονιδιωματικής και Εξατομικευμένης Θεραπείας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Πατρών.

Ευχαριστούμε όλους όσους βοήθησαν με τα πολύτιμα σχόλια και τις προτάσεις τους συμβάλλοντας στη συνεχή βελτίωση και εξέλιξη της παρούσας μελέτης. Είμαστε ευγνώμονες στα μέλη του Εργαστηρίου Φαρμακογονιδιωματικής και Εξατομικευμένης Θεραπείας και τα μέλη της ομάδας iGEM Patras 2020 για την σημαντική συμβολή τους. ●

## ABSTRACT

# Rationalizing chloroquine and rasburicase treatment in patients with G6PD enzyme deficiency

George Psarias, Evanthia Iliopoulou, Maria Therianou, Zoi Gkizarioti, George P. Patrinos, Stavroula Siamoglou

University of Patras School of Health Sciences, Department of Pharmacy, Laboratory of Pharmacogenomics and Individualized Therapy, Patras, Greece

The prevalence of cases deficient for the enzyme glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) is largely increased in Greece. The gene encoding the G6PD enzyme is X-linked and therefore G6PD deficiency is more common amongst the males. One locus correlating with G6PD deficiency class II is rs5030868 with level 1A pharmacogenomic association with rasburicase and level 3 with chloroquine. To develop a fast, reliable and affordable genotyping method for rs5030868

a tetra-primer Amplification Refractory Mutation System PCR was performed with a Mobile Molecular Biology Laboratory following phenol-chloroform extraction and compared with identical reactions with a benchtop instrument and with Sanger sequencing of all the same 50 samples. The Fisher's test proved ( $p > .5$ ) the method reliable and thus eligible to use to inform chloroquine and rasburicase administration to CoV-ID-19 patients based on G6PD deficiency risk.

**KEY WORDS:** 2MoBiL, mobile molecular biology laboratory, G6PD, G6PD deficiency, chloroquine, rasburicase, genotyping

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Gand M, Vanneste K, Thomas I, Van Gucht S, Capron A, Herman P, et al. Use of Whole Genome Sequencing Data for a First in Silico Specificity Evaluation of the RT-qPCR Assays Used for SARS-CoV-2 Detection. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Aug 4 [cited 2020 Sep 6];21(15). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32759818/>
- Colson P, Rolain JM, Lagier JC, Brouqui P, Raoult D. Chloroquine and hydroxychloroquine as available weapons to fight COVID-19 [Internet]. Vol. 55, *International Journal of Antimicrobial Agents*. Elsevier B.V.; 2020 [cited 2020 Sep 7]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32145363/>.
- Capoluongo ED, Capoluongo ED, Capoluongo ED, Amato F, Amato F, Castaldo G, et al. The friendly use of chloroquine in the COVID-19 disease: A warning for the G6PD-deficient males and for the unaware carriers of pathogenic alterations of the G6PD gene [Internet]. Vol. 58, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. De Gruyter; 2020 [cited 2020 Sep 7]. p. 1162–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32333649/>

4. Yao X, Ye F, Zhang M, Cui C, Huang B, Niu P, et al. In Vitro Antiviral Activity and Projection of Optimized Dosing Design of Hydroxychloroquine for the Treatment of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Clin Infect Dis* [Internet]. 2020 Jul 28 [cited 2020 Sep 7];71(15):732–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32150618/>
5. Colson P, Rolain JM, Lagier JC, Brouqui P, Raoult D. Chloroquine and hydroxychloroquine as available weapons to fight COVID-19 [Internet]. Vol. 55, *International Journal of Antimicrobial Agents*. Elsevier B.V.; 2020 [cited 2020 Sep 7]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32145363/>.
6. Gautret P, Lagier JC, Parola P, Hoang VT, Meddeb L, Mailhe M, et al. Hydroxychloroquine and azithromycin as a treatment of COVID-19: results of an open-label non-randomized clinical trial. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2020 Sep 7];56(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32205204/>
7. Liu J, Cao R, Xu M, Wang X, Zhang H, Hu H, et al. Hydroxychloroquine, a less toxic derivative of chloroquine, is effective in inhibiting SARS-CoV-2 infection in vitro [Internet]. Vol. 6, *Cell Discovery*. Springer Nature; 2020 [cited 2020 Sep 7]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32194981/>
8. Wang M, Cao R, Zhang L, Yang X, Liu J, Xu M, et al. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro [Internet]. Vol. 30, *Cell Research*. Springer Nature; 2020 [cited 2020 Sep 7]. p. 269–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32020029/>
9. Touret F, de Lamballerie X. Of chloroquine and COVID-19 [Internet]. Vol. 177, *Antiviral Research*. Elsevier B.V.; 2020 [cited 2020 Sep 7]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32147496/>
10. Cortegiani A, Ingoglia G, Ippolito M, Giarratano A, Einav S. A systematic review on the efficacy and safety of chloroquine for the treatment of COVID-19. *J Crit Care* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2020 Sep 7];57:279–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32173110/>
11. Howes RE, Battle KE, Satyagraha AW, Baird JK, Hay SI. G6PD Deficiency. Global Distribution, Genetic Variants and Primaquine Therapy. In: *Advances in Parasitology* [Internet]. Academic Press; 2013 [cited 2020 Sep 7]. p. 133–201. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23384623/>
12. Sirdah M, Reading NS, Perkins SL, Shubair M, Aboud L, Prchal JT. Hemolysis and Mediterranean G6PD mutation (c.563 C>T) and c.1311 C>T polymorphism among Palestinians at Gaza Strip. *Blood Cells, Mol Dis* [Internet]. 2012 Apr 15 [cited 2020 Sep 7];48(4):203–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22364808/>
13. Snpedia.com. 2020. Rs5030868 - Snpedia. [online] Available at: <<https://www.snpedia.com/index.php/Rs5030868>> [Accessed 7 September 2020].
14. Menounos P, Zervas C, Garinis G, Doukas C, Kolokithopoulos D, Tegos C, et al. Molecular heterogeneity of the glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the Hellenic population. *Hum Hered* [Internet]. 2000 [cited 2020 Sep 7];50(4):237–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10782016/>
15. Belfield KD, Tichy EM. Review and drug therapy implications of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Am J Heal Pharm* [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2020 Sep 7];75(3):97–104. Available from: <https://academic.oup.com/ajhp/article/75/3/97/5102042>
16. PharmGKB. 2020. Pharmgkb. [online] Available at: <<https://www.pharmgkb.org/>> [Accessed 7 September 2020]
17. Khan M, Paul S, Farooq S, Oo TH, Ramshesh P, Jain N. Rasburicase-Induced Methemoglobinemia in a Patient with Glucose-6- Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *Curr Drug Saf* [Internet]. 2017 May 5 [cited 2020 Sep 7];12(1):13–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28078984>
18. Luzzatto L, Nannelli C, Notaro R. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency [Internet]. Vol. 30, *Hematology/Oncology Clinics of North America*. W.B. Saunders; 2016 [cited 2020 Sep 7]. p. 373–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27040960/>
19. Ensembl.org. 2020. Rs5030868 (SNP) - Explore This Variant - Homo\_Sapiens - Ensembl Genome Browser 101. [online] Available at: <[https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Explore?db=core;r=X:154533919-154534919;v=rs5030868;vdb=variation;vf=141818457](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?db=core;r=X:154533919-154534919;v=rs5030868;vdb=variation;vf=141818457)> [Accessed 7 September 2020]
20. Glucose-6 phosphate dehydrogenase mutations and haplotypes in various ethnic groups - PubMed [Internet]. [cited 2020 Sep 7]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7803800/>

21. Gao J, Tian Z, Yang X. Breakthrough: Chloroquine phosphate has shown apparent efficacy in treatment of COVID-19 associated pneumonia in clinical studies [Internet]. Vol. 14, *BioScience Trends*. International Advancement Center for Medicine and Health Research Co., Ltd.; 2020 [cited 2020 Sep 7]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32074550/>
22. Zhang L, Guo H. Biomarkers of COVID-19 and technologies to combat SARS-CoV-2. *Adv Biomark Sci Technol* [Internet]. 2020 Aug [cited 2020 Sep 6];2:1. Available from: [/pmc/articles/PMC7435336/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/327435336/?report=abstract)
23. Macleod JA, Nemeth AC, Dicke WC, Wang D, Manalili Wheeler S, Hannis JC, et al. Fast, sensitive point of care electrochemical molecular system for point mutation and select agent detection. *Lab Chip* [Internet]. 2016 [cited 2020 Sep 18];16(13):2513–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27280174/>
24. Wang H, Zhang X, Xu X, Zhang Q, Wang H, Li D, et al. A portable microfluidic platform for rapid molecular diagnostic testing of patients with myeloproliferative neoplasms. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2020 Sep 18];7(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28819248/>
25. Kambouris ME, Siamoglou S, Kordou Z, Milioni A, Vassilakis S, Goudoudaki S, et al. Point-of-need molecular processing of biosamples using portable instrumentation to reduce turnaround time. *Biosaf Heal*. 2020 Jun 12.
26. Georgios Psarias, Evanthia Iliopoulou, Ioannis Liopeas, Anna Tsironi, Dimitrios Spanos, Athina Tsikrika et al. Development of rapid pharmacogenomic testing assay in a Mobile Molecular Biology Laboratory (2MoBiL). *Omi A J Integr Biol*. Unpublished data.
27. Dharavath B, Yadav N, Desai S, Sunder R, Mishra R, Ketkar M, et al. A one-step, one-tube real-time RT-PCR based assay with an automated analysis for detection of SARS-CoV-2. *Heliyon* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2020 Sep 6];6(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32665985/>
28. Chan JFW, Yip CCY, To KKW, Tang THC, Wong SCY, Leung KH, et al. Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-RdRp/Hel real-time reverse transcription-PCR assay validated in vitro and with clinical specimens [Internet]. Vol. 58, *Journal of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology; 2020 [cited 2020 Sep 6]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32132196/>
29. Yuan X, Yang C, He Q, Chen J, Yu D, Li J, et al. Current and Perspective Diagnostic Techniques for COVID-19. *ACS Infect Dis* [Internet]. 2020 Aug 14 [cited 2020 Sep 6];6(8):1998–2016. Available from: [/pmc/articles/PMC7409380/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/327409380/?report=abstract)
30. Fedorinov DS, Mirzaev KB, Ivashchenko DV., Temirbulatov II, Sychev DA, Maksimova NR, et al. Pharmacogenetic testing by polymorphic markers 681G>A and 636G>A CYP2C19 gene in patients with acute coronary syndrome and gastric ulcer in the Republic of Sakha (Yakutia). *Drug Metab Pers Ther* [Internet]. 2018 Jun 27 [cited 2020 Sep 6];33(2):91–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29738309/>
31. Motawi TK, Shaker OG, El-Maraghy SA, Senousy MA. Serum interferon-related microRNAs as biomarkers to predict the response to interferon therapy in chronic hepatitis C genotype. *PLoS One* [Internet]. 2015 Mar 19 [cited 2020 Sep 6];10(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25790297/>
32. Pisanu C, Congiu D, Costa M, Chillotti C, Ardaur R, Severino G, et al. Convergent analysis of genome-wide genotyping and transcriptomic data suggests association of zinc finger genes with lithium response in bipolar disorder. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2020 Sep 6];177(7):658–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30318722/>
33. Soloviov OO, Pampukha VM, Livshits LA. Development of ARMS PCR tests for detection of common CFTR gene mutations.