



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

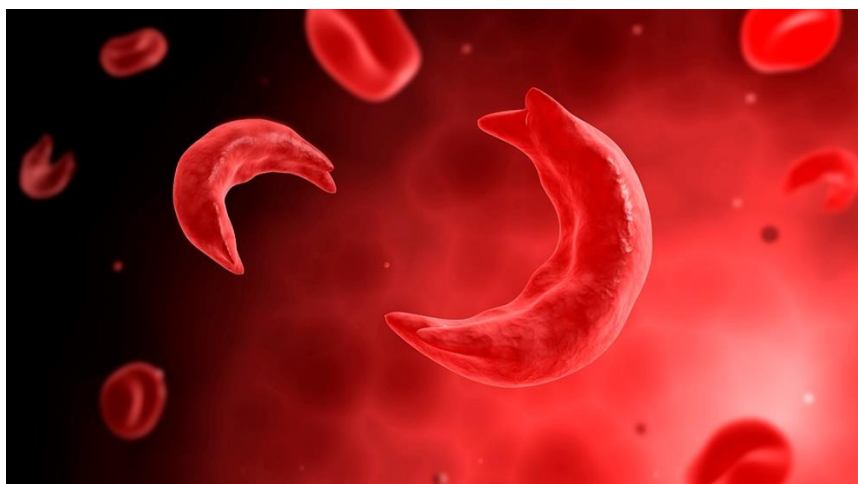


ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Γονιδιακή θεραπεία και Δρεπανοκυτταρική νόσος. Νεότερα δεδομένα

POST GRADUATE THESIS

Gene therapy and Sickle cell disease. Latest data



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/NAME OF STUDENT

Κωνσταντίνα Μουντανιάλη
Konstantina Mountaniali

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

Αναστάσιος Κριεμπάρδης
Anastasios Kriempardis

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2024



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



POST GRADUATE THESIS

Gene therapy and Sickle cell disease. Newer data

KONSTANTINA MOUNTANIALI

22018

dml22018@uniwa.gr

FIRST SUPERVISOR

ANASTASIOS KRIEMPARDIS

SECOND SUPERVISOR

ALKMINI ANASTASIADI

AIGALEO 2024

Επιτροπή εξέτασης

Ημερομηνία εξέτασης: 1/10/2024

	Ονόματα εξεταστών	Υπογραφή
1 ^{ος} Εξεταστής	Αναστάσιος Κριεμπάρδης	
2 ^{ος} Εξεταστής	Αλκμήνη Αναστασιάδη	

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Κωνσταντίνα Μουντάνιαλη του Βασιλείου, με αριθμό μητρώου 22018 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

Κωνσταντίνα Μουντάνιαλη

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να απευθύνω ευχαριστίες στους επιβλέποντες καθηγητές αυτής της διπλωματικής τον κ. Αναστάσιο Κριεμπάρδη (επιβλέπων Α) και την κα Αλκμήνη Αναστασιάδη (επιβλέπων Β) για την δυνατότητα που μου χάρισαν να εκπονήσω αυτή την εργασία και τις σημαντικές παρατηρήσεις που μου έκαναν καθ' όλη τη διάρκεια. Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, που αποτελεί το μεγαλύτερο στήριγμά μου σε όλη την μέχρι τώρα εκπαιδευτική μου πορεία.

Αφιερώσεις

Η διπλωματική αυτή εργασία αποτελεί μια αφιέρωση στους γονείς μου Βασίλη και Γεωργία και στον αδερφό μου Ηλία, για την απόλυτη εμπιστοσύνη και στήριξη που μου παρέχουν όλα αυτά τα χρόνια.

Περίληψη

Η δρεπανοκυτταρική νόσος αποτελεί μία από τις συχνότερες και σοβαρότερες μονογονιδιακές διαταραχές παγκοσμίως. Ο πολυμερισμός της αιμοσφαιρίνης, που οδηγεί σε ακαμψία των ερυθροκυττάρων και αγγειοαπόφραξη, είναι κεντρικός στην παθοφυσιολογία αυτής της νόσου, αν και έχει τεκμηριωθεί η σημασία της χρόνιας αναιμίας, της αιμόλυσης και της αγγειοπάθειας. Η διαχείριση της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας είναι ζωτικής σημασίας και ενώ λίγες θεραπείες έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικές, ο ρόλος της μετάγγισης αίματος και της υδροξυκαρβαμίδης αρχίζει να γίνεται κατανοητός για την πρόληψη επιπλοκών. Το μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών με δρεπανοκυτταρική νόσο κατοικεί στην Αφρική, χωρίς όμως να υπάρχει ευρεία ενημέρωση για τη νόσο αυτή σε αυτήν την περιοχή. Ωστόσο, γνωρίζουμε ότι η δρεπανοκυτταρική νόσος εξελίσσεται πιο σοβαρά στην Αφρική σε σχέση με άλλες περιοχές του κόσμου, με τις μολυσματικές ασθένειες να διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην επιδείνωση της κατάστασης. Απαιτείται περαιτέρω έρευνα προκειμένου να αναπτυχθούν αποτελεσματικές θεραπείες που θα στοχεύουν στις παθοφυσιολογικές μεταβολές και τις κλινικές επιπλοκές της νόσου. Η γονιδιακή θεραπεία, που έχει αναπτυχθεί πρόσφατα, παρουσιάζει θεραπευτική δυνατότητα με την τροποποίηση γενετικά των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων και την μεταμόσχευσή τους. Σημαντική πρόοδος έχει σημειωθεί στην εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας στην κλινική πρακτική για τη δρεπανοκυτταρική νόσο, χρησιμοποιώντας φορείς φακοΐδους με αντιδρεπανικά γονίδια. Το σύστημα CRISPR/Cas9 για την SCD είναι μία ελπιδοφόρα προσέγγιση που αναπτύσσεται συνεχώς και αναμένεται να καθορίσει το μέλλον της θεραπείας της νόσου. Παρ' όλο που η εφαρμογή αυτής της τεχνολογίας φαίνεται πολλά υποσχόμενη, είναι ακόμα πρόωγη για ευρεία και εύκολη χρήση, ιδίως σε λιγότερο ανεπτυγμένες περιοχές. Όλα αυτά τα στοιχεία παρουσιάζονται σε αυτήν την εργασία με σκοπό να ενημερώσουν και να κεντρίσουν το ενδιαφέρον των αναγνωστών για τη μονογονιδιακή αυτή διαταραχή και τις θεραπευτικές προοπτικές της.

Λέξεις κλειδιά: Γονιδιακή θεραπεία, δρεπανοκυτταρική νόσος, αιμοσφαιρίνη, φορέας, μεταμόσχευση, δικτυοερυθροκύτταρα

Abstract

Sickle cell disease is one of the most common and severe monogenic disorders world-wide. Polymerization of hemoglobin, leading to red blood cell rigidity and vaso-occlusion, is central to the pathophysiology of this disease, although the importance of chronic anemia, hemolysis, and vasculopathy has been documented. Managing sickle cell anemia is crucial, and while few treatments have proven effective, the role of blood transfusion and hydroxyurea is beginning to be understood for complications prevention. The majority of patients with sickle cell disease reside in Africa, yet there is limited awareness about this disease in the region. However, it is known that sickle cell disease progresses more severely in Africa compared to other parts of the world, with infectious diseases playing a critical role in worsening the condition. Further research is needed to develop effective treatments targeting the pathophysiological changes and clinical complications of the disease. Genetic therapy, a recent development, offers therapeutic potential by genetically modifying hematopoietic stem cells and trans-planting them. Significant progress has been made in applying gene therapy in clinical practice for sickle cell disease, utilizing viral vectors with anti-sickling genes. The CRISPR/Cas9 system for SCD is a promising approach that is continually being developed and is expected to shape the future of the disease's treatment. While the application of this technology appears very promising, it is still premature for widespread and easy use, especially in less developed areas. All these elements are presented in this work to inform and engage readers about this monogenic disorder and its therapeutic prospects.

Key words: Gene therapy, sickle cell disease, fetal hemoglobin, vector, transplant, sickled red blood cells

Περιεχόμενα

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας	iv
Ευχαριστίες	v
Αφιερώσεις	vi
Περίληψη.....	vii
Abstract	viii
Συνομογραφίες.....	1
Πρόλογος.....	4
Εισαγωγή.....	6
1.Η Δρεπανοκυτταρική Νόσος	6
1.1 Ιστορική Αναδρομή.....	6
1.2 Επιδημιολογία	8
1.3 Παθοφυσιολογία αιμοσφαιρίνης.....	9
1.4 Κλινική εικόνα	16
2.Θεραπεία	21
2.1 Μετάγγιση Ερυθρών Αιμοσφαιρίων.....	22
2.2 Χορήγηση Υδροξυουρίας.....	24
2.3 Ο ρόλος της Γλουταμίνης.....	25
2.4 Μεταμόσχευση μυελού των οστών.....	27
3.Γονιδιακή θεραπεία.....	28
3.1 Γενικά	28
3.2 Προσθήκη γονιδίου	29
3.2.1 Φορέας β & γ Σφαιρίνης.....	29
3.2.2 Lentiviral vectors (LVs)	32
3.3 Επεξεργασία γονιδίου.....	33
3.3.1 CRISPR/Cas9 system	34
3.3.2 BCL11A πρωτεΐνη	35
3.3.3 Nanoparticles (Polymer, Au)	38
3.3.4 miRNAs για επανενεργοποίηση παραγωγής της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης (HbF).....	40

4.Μελλοντικές Προσεγγίσεις	41
5.Συμπεράσματα.....	42
Αναφορές.....	43
Πίνακας Αναφοράς Εικόνων.....	49

Συντομογραφίες

	Αγγλική ορολογία	Ελληνική ορολογία
ACS	Acute Chest Syndrome	Οξύ Θωρακικό Σύνδρομο
BCAM1/LU	Basal Cell Adhesion Molecule (Lutheran antigen)	Μόριο Προσκόλλησης Βασικών Κυττάρων
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats	Ομαδοποιημένες Τακτικά Διακεκομμένες Σύντομες Παλινδρομικές Επαναλήψεις
DAMPs	Damage-Associated Molecular Patterns	Μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με βλάβες
DNA	DeoxyriboNucleic Acid	Δεσοξυριβονουκλεϊκό Οξύ
DSB	Double-Strand Break	Σπάσιμο διπλού κλώνου
FDA	Food and Drug Administration	Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων
Hb	Hemoglobin	Αιμοσφαιρίνη
HbA	Hemoglobin A	A αιμοσφαιρίνη
HbF	Fetal Hemoglobin	Εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη
HbS	Sickle Hemoglobin	Δρεπανοειδής αιμοσφαιρίνη
HbSC	Hemoglobin Sickle C Disease	Δρεπανοπάθεια αιμοσφαιρίνης C
HDR	Homology-Directed Repair	Διόρθωση κατευθυνόμενη από ομολογία
HLA	Human Leukocyte Antigen	Ανθρώπινο λευκοκυτταρικό αντιγόνο
HIV	Human Immunodeficiency Virus	Ιός ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας
HPFH	Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin	Κληρονομική επιμονή της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης
HSCs	Hematopoietic Stem Cells	Αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα
GPCR	G Protein-Coupled Receptors	Υποδοχείς συζευγμένους με πρωτεΐνη G
IAP	Integrin-Associated Protein	Πρωτεΐνη που σχετίζεται με την ιντεγκρίνη
ICAM-4	InterCellular Adhesion Molecule 4	Μόριο ενδοκυτταρικής προσκόλλησης 4
IL-8	Interleukin 8	Ιντερλευκίνη 8

KC	Kupffer Cells	Κύτταρα Kupffer
LDH	Lactate Dehydrogenase	Γαλακτική αφυδρογονάση
LTB4	Leukotriene B4	Λευκοτριένιο B4
LV	Lentiviral Vector	Φακοϊός φορέας
MCV	Mean Corpuscular Volume	Μέσος όγκος ερυθρών
miRNA	microRNA	Μικρά τμήματα RNA
MMEJ	Microhomology-Mediated End Joining	Τελική σύνδεση με τη μεσολάβηση μικροομολογίας
NAD	Nicotinamide Adenine Dinucleotide	Δινουκλεοτίδιο νικοτιναμίδης αδενίνης
NET	Neutrofilis	Ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνα
NHEJ	Non-Homologous End Joining	Μη ομόλογη σύνδεση τέλους
NO	Nitric Oxide	Μονοξείδιο αζώτου
PNP	Protein NanoParticles	Νανοδοματίδια Πρωτεΐνης
PS	Phosphatidylserine	Φωσφατιδυλοσερίνη
RBC	Red Blood Cells	Ερυθρά αιμοσφαίρια
RH	Rhesus	Ρέζους
RNA	RiboNucleic Acid	Ριβονουκλεϊκό Οξύ
RNP	RiboNucleoProtein	Ριβονουκλεοπρωτεΐνη
ROS	reactive oxygen species	Δραστικές μορφές οξυγόνου
SCD	Sickle Cell Disease	Δρεπανοκυτταρική νόσος
TALEN	Transcription Activator-Like Effector Nucleases	Νουκλεάσες που μοιάζουν με ενεργοποιητές μεταγραφής
TCD	TransCranial Doppler	Διακρανιακός υπέρηχος
TLR4	Toll-Like Receptor 4	Υποδοχείς Αναγνώρισης Προτύπων
TNFα	Tumor Necrosis Factor α	Παράγοντας Νέκρωσης Όγκου α
UTR	UnTranslated Region	Αμετάφραστη περιοχή
VOC	Vaso-Occlusive Crisis	Αποφρακτική κρίση
VLA-4	Very Late Activation antigen 4	Αντιγόνο Πολύ Καθυστερημένης Ενεργοποίησης 4

ZFN

Zinc-Finger Nucleases

Νουκλεάσες Δακτύλου Ψευδαργύρου

Πρόλογος

Η δρεπανοκυτταρική νόσος αποτελεί μία από τις πιο συνηθισμένες παθήσεις της αιμοσφαιρίνης σε παγκόσμια κλίμακα (1). Υπολογίζεται ότι ετησίως γεννιούνται περισσότερα από 300.000 παιδιά που πάσχουν από αυτή την πάθηση και εκτιμάται ότι έως το 2050 θα υπερβεί τα 400.000 νεογνά. Η ασθένεια παρουσιάζεται κυρίως στην υποσαχάρια Αφρική, τη Μεσόγειο, τη Μέση Ανατολή και την Ινδία ακριβώς επειδή το δρεπανοκυτταρικό σχήμα των ερυθρών προσδίδει προστασίας έναντι της ελονοσίας (2).

Το 1910, ο James Herrick είναι εκείνος που για πρώτη φορά αναφέρει ερυθρά κύτταρα που έχουν μορφή δρεπάνου σε άτομο που νοσεί από δρεπανοκυτταρική αναιμία (3). Το 1949, ο Linus Pauling τεκμηριώνει την ύπαρξη διαφοράς στην αιμοσφαιρίνη των φυσιολογικών ερυθρών και αυτών με δρεπανοκυτταρικό σχήμα (4). Αργότερα το 1960, οι Ingram και Hunt ανακαλύπτουν πως η μοριακή βάση της δρεπανοκυτταρικής νόσου λόγω αντικατάστασης μιας βάσης (A→T) οδηγεί στην αλλαγή του γλουταμικού οξέος σε βαλίνη στο γονίδιο 6 της βήτα σφαιρίνης (5). Ως αποτέλεσμα, η SCD αποτελεί την πρώτη γονιδιακή ασθένεια η οποία ερευνήθηκε σε μοριακό επίπεδο.

Οι κλινικές εμφανίσεις της δρεπανοκυτταρικής νόσου είναι πολλές και εξαρτώνται από τη βαρύτητά τους για κάθε μεμονωμένη περίπτωση ασθενή. Ένα κλασικό σύμπτωμα είναι ο οξύς και χρόνιος πόνος, όπου παρουσιάζεται σε ποσοστό μικρότερο του 50% των ασθενών. Επιπλέον, η καρδιοπνευμονική νόσος, οι επιπλοκές του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ), η λοίμωξη και η νεφροπάθεια αποτελούν ορισμένα από τα πιο συνηθισμένα παρατηρούμενα συμπτώματα (6).

Παρά το γεγονός ότι η νόσος είναι γνωστή για τουλάχιστον 100 χρόνια, δεν παύει να είναι μια πάθηση που προσφέρει στους ασθενείς ελάχιστες μεθόδους θεραπείας. Οι θεραπείες οι οποίες είναι διαθέσιμες επικεντρώνονται στο προφίλ του εκάστοτε πάσχοντα και έχουν να κάνουν με την πρόληψη και την μείωση της σοβαρότητας της νόσου. Η υδροξυουρία και η διαβίου μετάγγιση αίματος είναι οι βασικότερες θεραπείες που προτείνονται σε αυτούς τους ανθρώπους, οι οποίες δυστυχώς δεν αναιρούν ιδιαίτερα τις εκδηλώσεις και συγκεκριμένα στην μετάγγιση οι δότες δεν είναι αρκετοί (7). Έτσι, προέκυψε η ανάγκη για αυτόλογη μετάγγιση με τη συνδρομή της γονιδιακής θεραπείας.

Σήμερα, ύστερα από αρκετά χρόνια επιστημονικής εξέλιξης, η γονιδιακή θεραπεία για τη Δρεπανοκυτταρική νόσο αναπτύσσεται σε τεράστιο αριθμό κλινικών δοκιμών με αξιοσημείωτα πρώτα αποτελέσματα. Στην παρούσα εργασία θα αναλυθούν ορισμένες κύριες προσεγγίσεις όπως :

- η τεχνολογία CRISPR-Cas9, η οποία οδηγεί στην λεπτομερή επεξεργασία του DNA του ασθενούς για να διορθωθεί η γενετική μετάλλαξη που οδηγεί στη νόσο, με αφαίρεση ή αντικατάσταση στις αλληλουχίες του γονιδίου (8),
- το σύστημα φακοϊκών φορέων, κατά το οποίο χρησιμοποιείται ένα λειτουργικό αντίγραφο του γονιδίου της αιμοσφαιρίνης στα βλαστοκύτταρα του πάσχοντα μειώνοντας κατά αυτόν τον τρόπο την γονοτοξικότητα στα όργανά του (9)
- οι μέθοδοι γονιδιακής επεξεργασίας προκειμένου να πραγματοποιηθεί εκ νέου ενεργοποίηση παραγωγής της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης (HbF) μέσω των miRNAs στα ερυθρά κύτταρα ασθενών (9, 10).

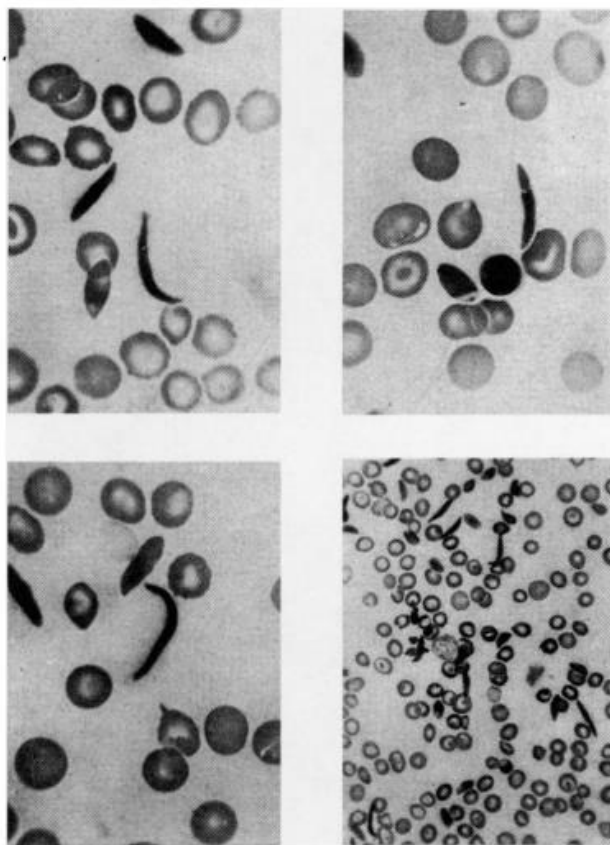
Ο στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν να πραγματοποιηθεί μια ανασκόπηση της βιβλιογραφίας σχετικά με τη δρεπανοκυτταρική νόσο, τις κλινικές της εκδηλώσεις και τις περιορισμένες θεραπευτικές επιλογές που υπάρχουν. Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στην ανάπτυξη της γονιδιακής θεραπείας και στις τελευταίες εξελίξεις στον τομέα αυτό.

Εισαγωγή

1. Η Δρεπανοκυτταρική Νόσος

1.1 Ιστορική Αναδρομή

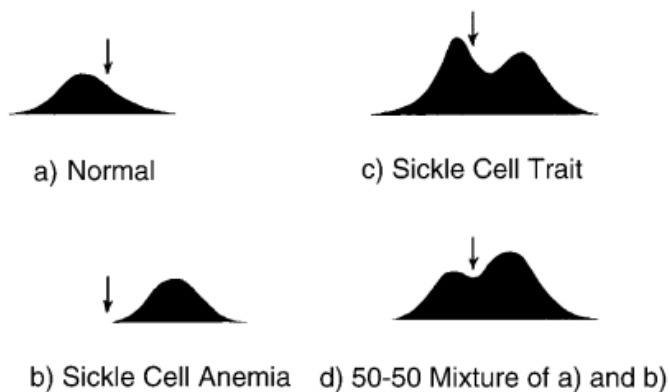
Η πρώτη παρατήρηση και περιγραφή της δρεπανοκυτταρικής νόσου έγινε από τον James Herrick, το 1910. Ανέφερε ασυνήθιστα ευρύματα αίματος και ειδικά ένα περιστατικό παράξενης ποικιλοκυττάρωσης (πολλά μικροκύτταρα και κάποια μακροκύτταρα), που δεν υπήρχε αναφορά ξανά. Ήταν ένας 20χρονος Αφρικανός άνδρας κάτοικος των Ηνωμένων Πολιτειών με καταγωγή από τη Γρενάδα, στη Δυτική Ινδία. Έκανε λόγο, λοιπόν, σε πλάκα αίματος για μεγάλο αριθμό ακανόνιστων ερυθρών αιμοσφαιρίων. Όμως, το ενδιαφέρον ήταν τα πάρα πολλά λεπτά, επιμήκη ερυθρά σε μορφή δρεπάνου και μισοφέγγαρου (3).



Εικόνα 1. Οι μικροφωτογραφίες απεικονίζουν τις ιδιόμορφες επιμήκεις μορφές των ερυθρών σωματιδίων. Περιστατικές μορφές σκιάς εμφανίζονται με λίγα εμπύρρινα ερυθρά. Οι παραλλαγές στο σχήμα και το μέγεθος φαίνονται καλύτερα στο χαμηλής ισχύος σχήμα. Στα συγκεκριμένα σχήματα δε φαίνεται ο αριθμός των λευκών σωματιδίων και των νορμοβλαστών.
Πηγή: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2588723/pdf/yjbm00012-0035.pdf>

Αφού πέρασαν κάποιες δεκαετίες, το 1949, ο Linus Pauling και οι συνεργάτες του παρουσίασαν για πρώτη φορά επιστημονική μελέτη για τη Δρεπανοκυτταρική Νόσο. Ανακάλυψαν πως η νόσος οφείλεται σε γενετική μετάλλαξη στην αιμοσφαιρίνη, την πρωτεΐνη

που μεταφέρει το οξυγόνο στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Συγκεκριμένα, παρατήρησε πως τα ερυθρά κύτταρα μεταβάλλονταν όταν μειωνόταν η μερική πίεση του οξυγόνου. Πραγματοποιώντας πειράματα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών, διαπίστωσαν την ύπαρξη δύο διαφορετικών μορφών αιμοσφαιρίνης - HbS (την οποία ονόμασαν HbS) για τους ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία και HbA για τους υγιείς. Έτσι, φάνηκε όπως ποτέ ξανά το γεγονός πως μια μη φυσιολογική πρωτεΐνη έχει την ικανότητα να συσχετισθεί αιτιολογικά με μια νόσο και τα γονίδια είναι καθοριστικά για τη δομή των πρωτεϊνών (4, 11).



Εικόνα 2. Διαγράμματα σάρωσης Longsworth καρβονομονοξυλλερωσφαιρινών σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 ιοντικής ισχύος και pH 6,90 που λαμβάνονται μετά από ηλεκτροφόρηση 20 ωρών σε βαθμίδα δυναμικού 4,73 volts/cm. Πηγή: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15395398/>

Το 1957, ο Vernon Ingram εντόπισε μια ελάχιστη διαφορά στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες των σφαιρινών της φυσιολογικής αιμοσφαιρίνης σε σύγκριση με την αιμοσφαιρίνη της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας. Από τα 300 αμινοξέα που περιέχουν οι δύο πρωτεΐνες, μόνο ένα είναι διαφορετικό. Συγκεκριμένα, στην αιμοσφαιρίνη της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας, το γλουταμικό οξύ που υπάρχει στην φυσιολογική αιμοσφαιρίνη έχει αντικατασταθεί από βαλίνη. Έτσι, καθιστά ξεκάθαρη την επίδραση μιας γονιδιακής μετάλλαξης στην πολυπεπτιδική αλυσίδα της αιμοσφαιρίνης, προβάλλοντας τη σημασία της δομής πρωτεΐνης στην εκδήλωση ασθενειών (12).

Τρία χρόνια μόλις μετά, το 1960, ο M. Perutz αποκρυπτογράφησε τη δομή της αιμοσφαιρίνης και ανέλυσε τη μοριακή βάση της λειτουργίας της. Διαπίστωσε ότι η αιμοσφαιρίνη διαθέτει μοριακό βάρος 67.000 και ότι από τα 10.000 άτομα σιδήρου που περιέχει, τα 4 συμβάλλουν στη δημιουργία των 4 ομάδων αίμης. Επιπλέον, αποδείχτηκε ότι τα υπόλοιπα άτομα σιδήρου συγκεντρώνονται στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες της αιμοσφαιρίνης, οι οποίες είναι ανά δύο όμοιες και περίπου ίσου μεγέθους. Αυτές οι ανακαλύψεις βοήθησαν στην κατανόηση της λειτουργίας της αιμοσφαιρίνης και της μοριακής της δομής (13).

1.2 Επιδημιολογία

Η SCD αποτελεί την πιο συχνή μονογονιδιακή διαταραχή, που κληρονομείται με αυτοσωματικό υπολειπόμενο τρόπο (1). Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα πως τα δύο αντίγραφα του γονιδίου οφείλουν να έχουν μια παραλλαγή για να αναπτύξουν τη νόσο. Οι γονείς ενός παιδιού με αυτό το υπολειπόμενο γονίδιο κουβαλούν το μεταλλαγμένο γονίδιο, αλλά συνήθως δεν εμφανίζουν συμπτώματα της νόσου. Αυτό είναι ένα παράδειγμα αξιοσημείωτου γονιδιακού μηχανισμού που καθορίζει την έκφραση μιας ασθένειας (14).

Η γεωγραφική κατανομή του δρεπανοκυτταρικού χαρακτηριστικού επηρεάζεται κυρίως από δύο παράγοντες: την ενδημικότητα της ελονοσίας και τις μετακινήσεις των πληθυσμών. Η ασθένεια εμφανίζεται σε υψηλά ποσοστά σε μεγάλες περιοχές της υποσαχάριας Αφρικής, της Μεσογείου, της Μέσης Ανατολής και της Ινδίας, λόγω του σημαντικού επιπέδου προστασίας που παρέχει το δρεπανοκυτταρικό χαρακτηριστικό ενάντια στη βαριά ελονοσία. Οι μετακινήσεις πληθυσμών, όπως το δουλεμπόριο, έχουν συμβάλει στη διάδοση του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου και σε περιοχές όπως η Βόρεια Αμερική και η Δυτική Ευρώπη (15).

Το γονίδιο του δρεπανιού έχει την ικανότητα και προσδίδει προστασία στους φορείς από την λοίμωξη με πλασμώδιο της μαλάριας (*Plasmodium falciparum malariae*). Εν τούτοις, η ομοζυγωτική μορφή μπορεί να οδηγήσει σε πρόωρη θνησιμότητα. Αυτό το φαινόμενο αποτελεί ένα παράδειγμα ισορροπημένου πολυμορφισμού. Οι απλότυποι σφαιρίνης του γονιδίου ελέγχονται από μια σειρά πολυμορφισμών που προκύπτει από μια περιοριστική ενδονουκλεάση στο σύμπλεγμα γονιδίων της σφαιρίνης στο χρωμόσωμα 11. Αυτοί οι πολυμορφισμοί επηρεάζουν τη λειτουργία των ερυθρών αιμοσφαιρίων και την ευαισθησία στη μαλάρια (16).

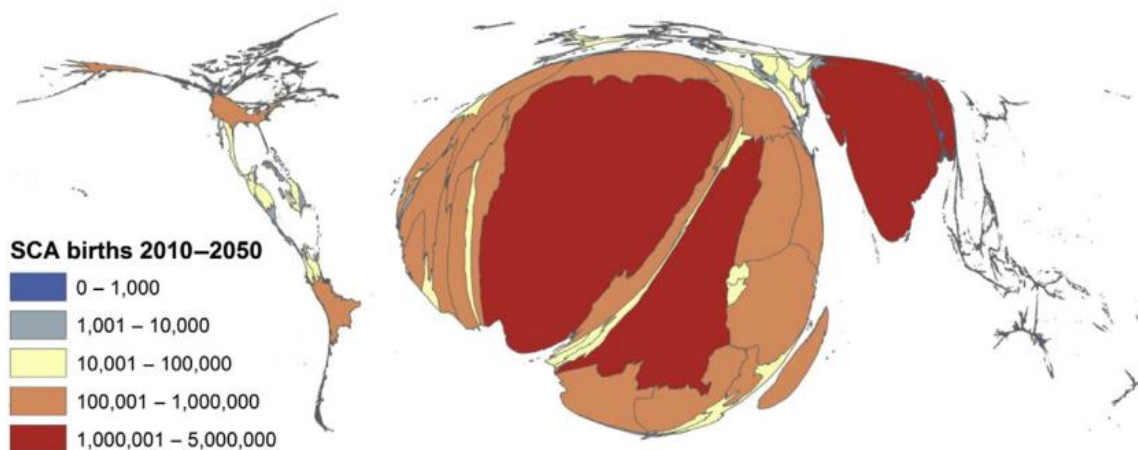
Έχει γίνει προσδιορισμός τεσσάρων αφρικανικών απλότυπων για συγκεκριμένες περιοχές (Σενεγάλης, Μπενίν, Μπαντού και Καμερούν) και ενός ασιατικού (αραβο-ινδικός απλότυπος) (1).

Παγκοσμίως, τουλάχιστον 300.000 παιδιά γεννιούνται με δρεπανοκυτταρική αναιμία ετησίως, με ποσοστό 75% στην υποσαχάρια Αφρική. Το γεγονός ότι το 50-90% των προσβεβλημένων παιδιών στην υποσαχάρια Αφρική εκτιμάται ότι χάνουν τη ζωή τους πριν κλείσουν τα πέντε τους χρόνια λόγω έλλειψης επαρκούς δημόσιας υγείας, αναδεικνύει την ανάγκη για αποτελεσματικές παρεμβάσεις σε αυτές τις περιοχές στις περισσότερες Αφρικανικές χώρες (17).

Στις ΗΠΑ, η δρεπανοκυτταρική νόσος επηρεάζει περισσότερους από 100.000 ανθρώπους, με τη μεγαλύτερη επιρροή να υπάρχει στην αφρικανική αμερικανική κοινότητα.

Οι στατιστικές δείχνουν ότι περίπου ένα στα 13 αφροαμερικανικά μωρά γεννιούνται φορείς της νόσου, ενώ μόνο ένα στα 365 γεννιούνται με την πλήρη μορφή της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας. Αυτά τα στοιχεία αντικατοπτρίζουν τη σοβαρότητα της κατάστασης σε αυτές τις κοινότητες και την ανάγκη για περαιτέρω προσοχή και υποστήριξη.

Οι προβλέψεις δημογραφίας τείνουν στο ότι, έως το 2050, ο επιπολασμός της νόσου θα μετρήσει τουλάχιστον 100.000 νεογνά σε ολόκληρο τον πλανήτη, με τη Νιγηρία και τη Λαϊκή Δημοκρατία του Κονγκό να αποτελούν χώρες υψηλής ανάγκης σε παρεμβάσεις από φορείς υγείας. Έτσι, η εφαρμογή στρατηγικών προληπτικών μέτρων, όπως η εκτέλεση ευρείας κλίμακας προσυμπτωματικών ελέγχων για νεογνά σε αυτές τις χώρες, αποτελεί ζωτικής σημασίας προσέγγιση για τη μείωση του βάρους της νόσου (17).



Εικόνα 3. Η παγκόσμια κατανομή της δρεπανοκυτταρικής νόσου. Χαρτόγραμμα που δείχνει την παγκόσμια κατανομή της SCD, με το μέγεθος των χωρών να κλιμακώνεται στον αριθμό των ετήσιων γεννήσεων.

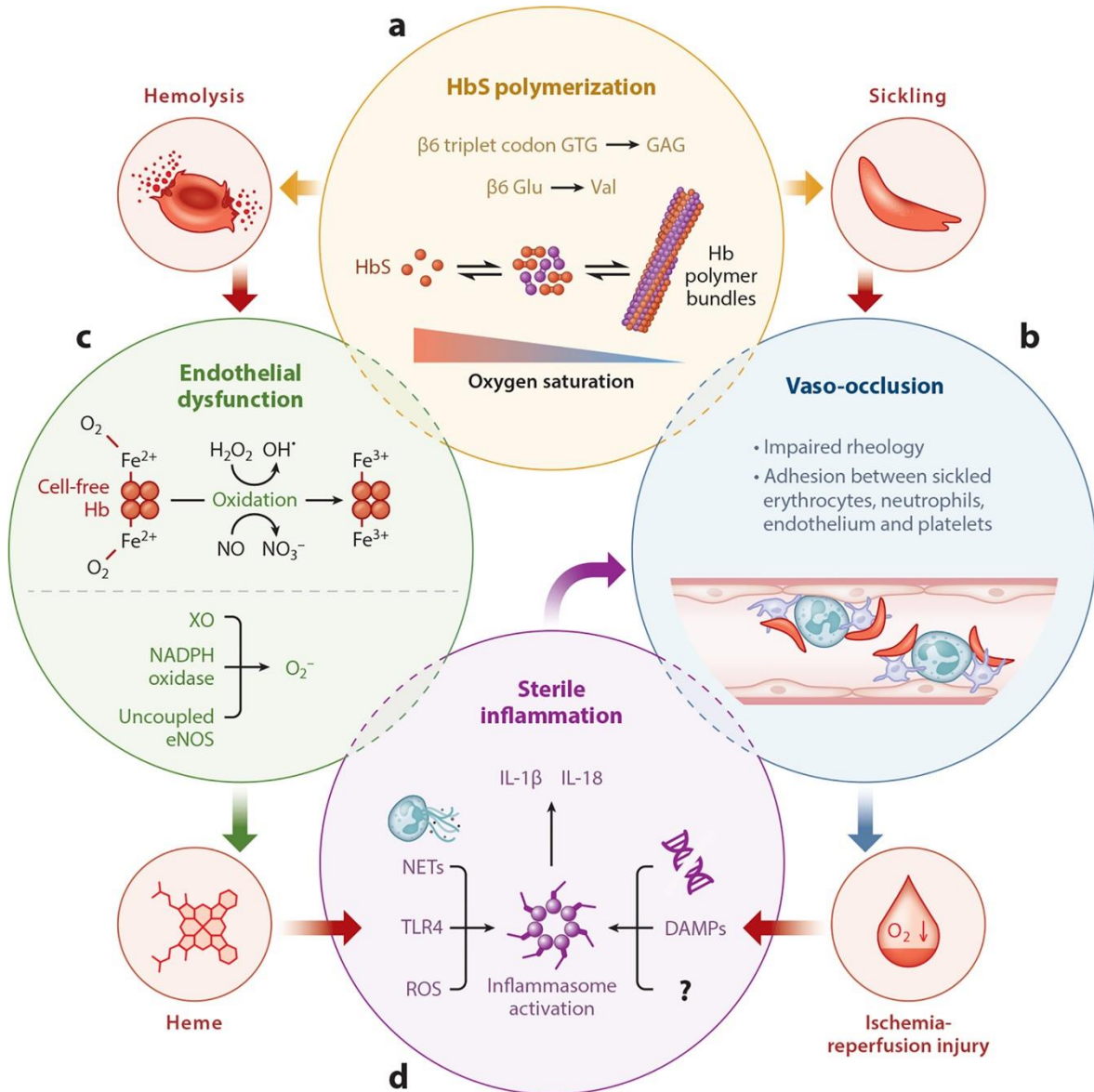
Πηγή: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6858853/>

1.3 Παθοφυσιολογία αιμοσφαιρίνης

Η SCD προκύπτει από μια μετάλλαξη στο γονίδιο της β-σφαιρίνης στην οποία το 17ο νουκλεοτίδιο μεταβάλλεται από θυμίνη (GTG) σε αδενίνη (GAG) και το έκτο αμινοξύ στην αλυσίδα της β-σφαιρίνης μετατρέπεται στην υδρόφοβη βαλίνη αντί για το υδρόφιλο γλουταμινικό οξύ (12). Απόρροια της μετάλλαξης αυτής είναι ένα υδρόφοβο μοτίβο στο αποοξυγονωμένο τετραμερές της HbS που οδηγεί στη σύνδεση μεταξύ β1 και β2 αλυσίδων δύο γειτονικών μορίων αιμοσφαιρίνης της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας και της λειτουργίας της HbS στον οργανισμό. Ο πολυμερισμός αυτός της αποοξυγονωμένης HbS είναι καίριας σημασίας για την κατανόηση της μοριακής παθογένεσης της δρεπανοκυτταρικής νόσου (18).

Τις τελευταίες 7 δεκαετίες, οι επιστήμονες έχουν καταλήξει ότι τα τρία βασικά παθολογικά μονοπάτια που χαρακτηρίζουν τη δρεπανοκυτταρική αναιμία είναι ο πολυμερισμός της HbS, η αγγειοαπόφραξη και η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που οφείλεται στην

αιμόλυση. Το πρόσφατα εντοπισμένο τέταρτο μονοπάτι, η στείρα φλεγμονή, αναφέρεται στην χρόνια φλεγμονώδη κατάσταση που εμφανίζεται σε ασθενείς με δρεπανοκυτταρική νόσο. Αυτό το νέο μονοπάτι προσθέτει πρόσθετη πολυπλοκότητα στην κλινική εικόνα της νόσου και ανοίγει νέες προοπτικές για τη θεραπεία και τη διαχείριση των ασθενών.



Εικόνα 4. Η μοριακή παθοφυσιολογία της δρεπανοκυτταρικής νόσου. (α) Ένας πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου στο γονίδιο της β-σφαιρίνης οδηγεί σε υποκατάσταση του γλουταμινικού οξέος με βαλίνη στην έκτη θέση στην αλυσίδα της β-σφαιρίνης. Μετά την αποοξυγόνωση, τα μόρια μεταλλαγμένης αιμοσφαιρίνης (HbS) πολυμερίζονται για να σχηματίσουν δεσμίδες. Οι δέσμες πολυμερών οδηγούν σε δρεπάνωση των ερυθροκυττάρων, το οποίο με τη σειρά του έχει ως αποτέλεσμα (β) τη μειωμένη ρεολογία του αίματος και συσσώρευση δρεπανοειδών ερυθροκυττάρων με ουδετερόφιλα, αιμοπετάλια και ενδοθηλιακά κύτταρα για την πρόκληση της στάσης της ροής του αίματος, που αναφέρεται ως αγγειοαπόφραξη. Η αγγειοαπόφραξη προάγει τον τραυματισμό ισχαιμίας-επανοαιμάτωσης. (α) Οι δέσμες πολυμερών αιμοσφαιρίνης (Hb) προάγουν επίσης την αιμόλυση ή τη λύση των ερυθροκυττάρων, η οποία (γ) απελευθερώνει Hb χωρίς κύτταρα στην κυκλοφορία του αίματος. Η οξυγονωμένη Hb (Fe^{2+}) προάγει τη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου με την εξάντληση των αποθεμάτων ενδοθηλιακού μονοξειδίου του αζώτου (NO) για το σχηματισμό νιτρικών (NO_3^-) και μεθαιμοσφαιρίνης (Fe^{3+}). Εναλλακτικά, η Hb μπορεί επίσης να αντιδράσει με το H_2O_2 μέσω της αντίδρασης Fenton για να σχηματίσει ελεύθερη ρίζα υδροξυλίου (OH^\bullet) και μεθαιμοσφαιρίνη (Fe^{3+}). Επίσης, η οξειδάση NADPH, η οξειδάση της ζανθίνης (XO) και η μη συζευγμένη ενδοθηλιακή συνθάση NO (eNOS) δημιουργούν ελεύθερες ρίζες οξυγόνου για την πρόκληση της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας. Η μεθαιμοσφαιρίνη (Fe^{3+}) αποικοδομείται για να απελευθερώσει αίμη χωρίς κύτταρα, η οποία είναι ένα σημαντικό μοριακό σχέδιο που σχετίζεται με τη βλάβη των ερυθροκυττάρων (DAMP). (δ) Δημιουργία αντι-

δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS), ενεργοποίηση υποδοχέα τύπου Toll 4 (TLR4), δημιουργία εξωκυτταρικής παγίδας ουδετερόφιλων (NET), απελευθέρωση DAMPs ιστού ή κυττάρου, DNA και άλλων άγνωστων παραγόντων που προκαλούνται από το κύτταρο -Ο τραυματισμός χωρίς αίμη ή I-R μπορεί να συμβάλει σε στείρα φλεγμονή ενεργοποιώντας τη φλεγμονώδη οδό στα αγγειακά και φλεγμονώδη κύτταρα για την απελευθέρωση της IL-1β. Τέλος, η στείρα φλεγμονή προάγει περαιτέρω την αγγειοαπόφραξη μέσω ενός βρόχου ανάδρασης προάγοντας τη συγκόλληση των ουδετερόφιλων, των αιμοπεταλίων και των ενδοθηλιακών κυττάρων.

Πηγή: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7053558/>

Πολυμερισμός HbS

Η αποοξυγόνωση της αιμοσφαιρίνης HbS μέσα στα ερυθρά αιμοσφαίρια σε περιοχές με υψηλές ανάγκες οξυγόνου προκαλεί την αποκάλυψη υδρόφοβων περιοχών σε επιμέρους αποοξυγονωμένα τετραμερή της HbS (19, 20). Οι αλυσίδες βS-σφαιρίνης συνδέονται σε αποοξυγονωμένα τετραμερή HbS ώστε να καλύψουν τα υδρόφοβα μοτίβα, δημιουργώντας πυρήνες πολυμερούς HbS. Αυτά τα πολυμερή γρήγορα εξελίσσονται σε μακρές ίνες, οι οποίες ενισχύουν την ακαμψία των ερυθροκυττάρων και αλλοιώνουν τη μεμβράνη τους, προκαλώντας δρεπάνωση, ενεργειακή αποτυχία, αφυδάτωση, μειωμένη ρεολογία και πρόωρη αιμόλυση (19-21). Ο ρυθμός πολυμερισμού της HbS σχετίζεται άμεσα με την ενδοερυθροκυτταρική συγκέντρωση της HbS και αντίστροφα με τη συγκέντρωση της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης (HbF). Η HbF ανταγωνίζεται την HbS, καταλαμβάνοντας θέσεις και επηρεάζοντας τον πολυμερισμό της (22, 23). Γενετικοί παράγοντες όπως η κληρονομική παρουσία της HbF ή της α-θαλασαιμίας ή του βC-αλληλόμορφου μαζί με το βS μπορούν να επηρεάσουν τη σοβαρότητα της ασθένειας, διαμορφώνοντας τη φαινοτυπική παρουσία της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας σε κάθε ασθενή (1, 24).

Αγγειοαπόφραξη

Η αγγειοαπόφραξη, ή αλλιώς η απόφραξη των αιμοφόρων αγγείων που καταλήγει σε ισχαιμία, αποτελεί την κύρια παθοφυσιολογική διαδικασία που προκαλεί την οξεία συστηματική επώδυνη κρίση αγγειοαπόφραξης και δημιουργεί την ανάγκη για άμεση ιατρική φροντίδα σε πάσχοντες από δρεπανοκυτταρική νόσο (25). Τα τελευταία δέκα χρόνια, έρευνες ενδοβιολογικής απεικόνισης σε διαγονιδιακά ανθρωποποιημένα ποντίκια με SCD και in vitro μελέτες με αίμα ασθενή με SCD έχουν δώσει έμφαση στη σχέση μεταξύ μειωμένης ρεολογίας του αίματος, προσκόλλησης ερυθροκυττάρων σε φλεγμονώδη κύτταρα και αγγειακό ενδόθηλιο, ενώ ταυτόχρονα ενεργοποιείται η αιμοστατική δράση (26).

Η ρεολογία του αίματος επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του αιματοκρίτη, του ιξώδους του πλάσματος και της παραμόρφωσης των. Το αυξημένο ιξώδες του πλάσματος, που προκύπτει από χρόνια αιμόλυση και μειωμένη παραμόρφωση των δρεπανοειδών ερυθροκυττάρων λόγω πολυμερισμού και αφυδάτωσης της Hb, ενδέχεται

να διαταράξει τη ροή του αίματος στα τριχοειδή αγγεία και τα μετατριχοειδή φλεβίδια των ιστών που έχουν μεγάλη ανάγκη για οξυγόνωση (21). Τα δρεπανοειδή ερυθροκύτταρα με κακή παραμόρφωση ενδέχεται να απομονωθούν μηχανικά στη μικροκυκλοφορία, προάγοντας έτσι την παροδική αγγειοαπόφραξη (1, 20).

Η δρεπανοεξαρτώμενη βλάβη των μεμβρανών των ερυθροκυττάρων οδηγεί στην έκθεση μορίων προσκόλλησης και μοτίβων δέσμευσης που συνήθως υποεκφράζονται στα ερυθροκύτταρα, όπως η φωσφατιδυλοσερίνη (PS), το μόριο προσκόλλησης βασικών κυττάρων-1/Λουθηρανίου (B-CAM-1/Lu), η πρωτεΐνη σχετιζόμενη με ιντεγκρίνη (IAP) και το μόριο μεσοκυττάριας προσκόλλησης-4 (ICAM-4) (20, 21, 27). Η χρόνια αναιμία που προκαλείται από τη νόσο ενδέχεται να οδηγήσει στην απελευθέρωση ανώριμων ερυθροκυττάρων ή δικτυοερυθρών αιμοσφαιρίων που μπορεί να φέρουν μόρια προσκόλλησης, όπως η ιντεγκρίνη α4β1 (VLA-4) και το CD36. Αυτή η διαδικασία μπορεί να επηρεάσει την αγγειακή συστοιχία και να συμβάλει στην παθογένεια της νόσου (27).

Πρόσφατες μελέτες που διεξήχθησαν σε ποντίκια με SCD έχουν δείξει ότι οι συγγολητικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ ερυθροκυττάρων, δικτυοερυθροκυττάρων και φλεγμονώδων ή ενδοθηλιακών κυττάρων παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενίσχυση της αγγειακής απόφραξης στη νόσο (28).

Ενδοθηλιακή δυσλειτουργία

Καθώς, αναφέρθηκε προηγουμένως, τα ερυθροκύτταρα που ενέχουν HbS με ενδοκυτταρικό πολυμερές Hb παρατηρούνται ελάχιστα παραμορφώσιμα ενώ έχουν την τάση να παγιδούνται στη μικροκυκλοφορία, γεγονός που οδηγεί σε επεισοδιακή και παρατεταμένη αγγειοαπόφραξη (29, 30). Ακόμα, τα ερυθρά κύτταρα που αποτελούνται από πολυμερές καθορίζονται από ενδαγγειακή και εξωαγγειακή αιμόλυση, με αποτέλεσμα χρόνια αναιμία με χαμηλά επίπεδα Hb στο αίμα (6-11 g/dl) (31, 32). Η ενδαγγειακή αιμόλυση ζημιώνει άμεσα τα αιμοφόρα αγγεία, ενώ η αναιμία που προκύπτει πιέζει περισσότερο το καρδιαγγειακό σύστημα. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε μακροπρόθεσμες επιπτώσεις όπως αύξηση της καρδιακής παροχής, διαστολή του κοιλιακού θαλάμου και αύξηση της πίεσης στον κοιλιακό τοίχωμα. Το πρωταρχικό ποσοστό αιμολυτικής αναιμίας παρουσιάζει μια σχετική σταθερότητα σε κάποιο μεμονωμένο ασθενή με SCD υπό συνθήκες σταθερής κατάστασης (χωρίς κρίση). Αυτό το ποσοστό προκύπτει κυρίως από το γονότυπο της αιμοσφαιρίνης (όπως HbS, HbC κ.λπ.) και τα επίπεδα της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης (HbF). Όσοι ασθενείς έχουν αυξημένα ποσοστά αιμόλυσης έχουν χαμηλότερα επίπεδα Hb σε σταθερή κατάσταση και είναι πιο

επιρρεπείς στη δημιουργία αγγειακής βλάβης και δυσλειτουργίας οργάνων καθώς μεγαλώνουν, που παρουσιάζεται ως πνευμονική υπέρταση, διαστολική αριστερή καρδιακή νόσο και νεφρική δυσλειτουργία (πρωτεϊνουρία, λευκωματουρία και χρόνια νεφρική δυσλειτουργία). Η αγγειακή δυσκαμψία που αναπτύσσεται με τον χρόνο, σε συνδυασμό με τον αυξημένο κίνδυνο εγκεφαλικού επεισοδίου στο πλαίσιο της αναιμίας, μπορεί να προκαλέσει αύξηση της αρτηριακής πίεσης και της πίεσης παλμού. Οι υψηλές συστολικές συστηματικές αρτηριακές πιέσεις έχουν θεωρηθεί ως μεμονωμένος παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση πνευμονικής υπέρτασης, υποξαιμίας, διαστολικής καρδιακής δυσλειτουργίας, χρόνιας νεφρικής βλάβης, σιωπηλών εγκεφαλικών εμφράκτων (SCI) και εμφραγματικού εγκεφαλικού. Πέρα από τη χρόνια αναιμία, η ενδαγγειακή αιμόλυση οδηγεί άμεσα σε αγγειακό τραυματισμό και ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και συσχετίζεται με την αύξηση παλμικής πίεσης. Λόγω του ότι το oxy-Hb αντιδρά με το μονοξείδιο του αζώτου (NO) πολύ ταχύτατα και ουσιαστικά ο σχηματισμός αδρανούς νιτρικού είναι μη αναστρέψιμος και έτσι η παρουσία ενδοερυθροκυτταρικής Hb στο πλάσμα όσο διαρκεί η ενδαγγειακή αιμόλυση οδηγεί σε αντιδράσεις δέσμευσης NO και βλάπτει την κύρια αγγειοδιαστολή που είναι εξαρτώμενη από το NO (28).

Το μονοξείδιο του αζώτου (NO) ρυθμίζει τη λειτουργία των αιμοπεταλίων, τη φλεγμονή, τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων και το οξειδωτικό στρες. Η αφαίρεση του NO από την αιμοσφαιρίνη του πλάσματος, όταν δεν είναι ενσωματωμένη στα κύτταρα, εμποδίζει τη λειτουργία του ενδοθηλίου και βοηθά στην πολλαπλασιαστική αγγειοπάθεια στα πνευμονικά και συστηματικά αγγεία (32). Η διαταραγμένη ισορροπία οξειδοαναγωγής έχει ως αποτέλεσμα την οξείδωση κρίσιμων ενζύμων στο αγγειακό σύστημα, όπως η διαλυτή γουανυλική κυκλάση. Αυτή η διαδικασία συμμετέχει στην εξέλιξη της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, αφού η σηματοδότηση NO είναι παρεμποδισμένη.

Πέραν των βασικών επιπτώσεων της στη λειτουργία του ενδοθηλίου και στις χρόνιες αγγειακές βλάβες, η οξείδωση και η αποδόμηση της Hb μπορούν επίσης να προκαλέσουν την απελευθέρωση ελεύθερης αίμης και σιδήρου από την αίμη. Η Hb και η αίμη ενεργοποιούν τις φυσικές ανοσολογικές οδούς μέσω της σηματοδότησης TLR4, προάγοντας έτσι τη φλεγμονώδη αντίδραση (33-35). Αυτά τα προϊόντα αιμόλυσης χαρακτηρίζονται ως μοριακά μοτίβα που συνδέονται με τη βλάβη των ερυθροκυττάρων (eDAMPs) που προκαλούν και διαδίδουν τη στείρα φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες, επιδεινώνοντας περαιτέρω την ισορροπία οξειδοαναγωγής (36). Η απελευθέρωση της Hb και της ADP των ερυθροκυττάρων ενώ συμβαίνει αιμόλυση διεγείρει τα αιμοπεταλίων και ενεργοποιεί τις οδούς πήξης, επιδρώντας στην αγγειακή θρόμβωση και την πνευμονική υπέρταση. Αξιοσημείωτο είναι ότι

τόσο η αιμόλυση - μέσω της απελευθέρωσης eDAMPs - όσο και τα αγγειοαποφρακτικά συμβάντα που συνδέονται με την SCD - μέσω τραυματισμού ιστού και απελευθέρωσης κυτταρικών DAMPs - μπορούν να ενεργοποιήσουν στείρες οδούς φλεγμονής (28, 37).

Στείρα φλεγμονή

Η αγγειοαπόφραξη συνδέεται με τον τραυματισμό ισχαιμίας-επαναιμάτωσης και σε συνδυασμό με την παρουσία eDAMPs, ενθαρρύνει την ανάπτυξη της στείρας φλεγμονής στην SCD (26, 36, 38). Η αίμη και η οξειδωμένη μορφή της, η αιμίνη, που απελευθερώνεται μετά την οξείδωση της Hb, αποτελούν ισχυρούς αγωνιστές του TLR4 που συμμετέχουν σε μια προφλεγμονώδη και προπηκτική κατάσταση στην SCD. Αυτή η κατάσταση διακρίνεται από ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα, αιμοπετάλια, ενδοθηλιακά κύτταρα, παράγοντα ιστού, κυτταροκίνες, εξάντληση NO, και παραγωγή ROS. Η ενδοφλέβια χορήγηση αίμης χωρίς κύτταρα είναι απόδειξη ότι μπορεί να εξελιχθεί σε οξεία πνευμονική βλάβη και πνευμονική αγγειακή συμφόρηση σε ποντίκια με SCD. Σε αυτά τα ποντίκια, οι παραπάνω επιπτώσεις αντιμετωπίστηκαν αναστέλλοντας τη θεραπεία ή αφαιρώντας γενετικά το ενδοθήλιο TLR4 (34). Σε άλλη μελέτη, διαπιστώθηκε ότι η αίμη παρακινεί την ενδοθηλιακή ενεργοποίηση, με αποτέλεσμα την αυξημένη προσκόλληση ουδετερόφιλων και την αγγειοαπόφραξη στα φλεβίδια του δέρματος. Επίσης, προκαλεί δημιουργία ROS μέσω της μεσολάβησης του NOX, οδηγώντας σε θάνατο ποντικών με SCD, εξαρτώμενων από το ενδοθηλιακό TLR4. Επιπλέον, η αίμη ενεργοποιεί το TLR4 σε μακροφάγα, προάγοντας την απελευθέρωση TNF α , KC και λευκοτριενίου B4 (LTB4) (33). Με τον τρόπο αυτό, η αίμη ενισχύει την ανάπτυξη στείρας φλεγμονής στην SCD παρακινώντας την εξαρτώμενη από το TLR4 έμψυτη ανοσολογική σηματοδότηση σε ενδοθηλιακά και μονοκύτταρα (28).

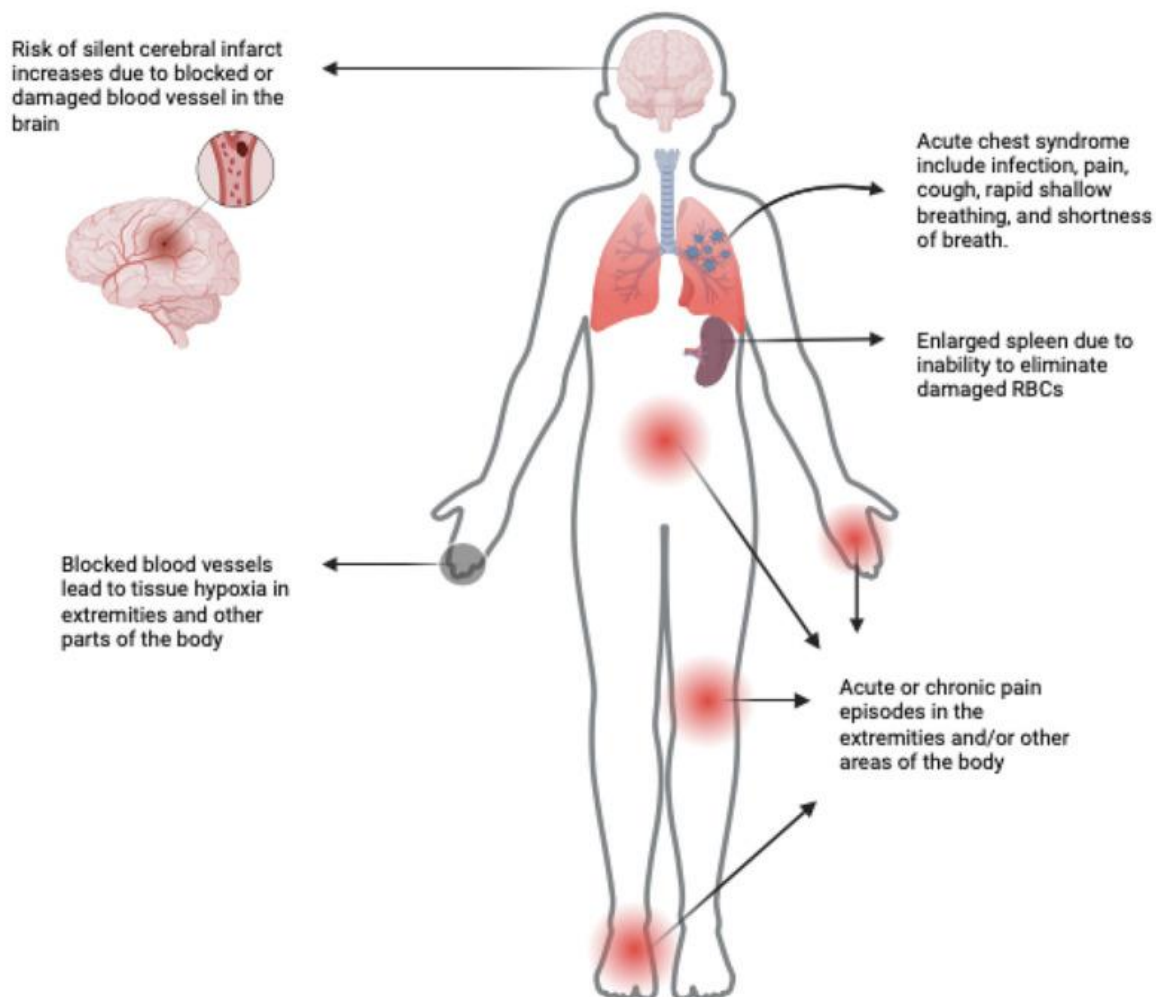
Είναι εμφανές πως η αίμη δρα μέσω σηματοδότησης που εξαρτάται από τον G-protein-coupled receptor (GPCR), προάγοντας τη μετανάστευση των ουδετερόφιλων, την οξειδωτική έκρηξη, τη δημιουργία εξωκυτταρικής παγίδας ουδετερόφιλων (NET), την παραγωγή IL-8 και την αυξημένη επιβίωση των ουδετερόφιλων. Παρ' όλα αυτά, ο υποδοχέας GPCR που διαμεσολαβεί για την αίμη στα ουδετερόφιλα δεν έχει γίνει σαφής (28, 39). Πιο πρόσφατα, η αίμη αποδείχθηκε ότι προκαλεί μια οξειδωτική έκρηξη που έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση NETs από ουδετερόφιλα στη μικροκυκλοφορία των πνευμόνων ποντικών SCD που προκλήθηκαν με TNF α (40). Ενδιαφέρον είναι ότι απελευθερώνοντας NET γίνεται αναστολή αφού χορηγηθεί αιμοπεξίνη (σαρωτή της αίμης στο πλάσμα). Σύμφωνα με τα παραπάνω, οι κυκλοφορούντες δείκτες των NETs, όπως τα νουκλεοσώματα και η ελαστάση- α 1-αντιθρυψίνη, φαίνονται εξαιρετικά αυξημένοι στο πλάσμα ασθενών με SCD

σε σταθερή κατάσταση και τα επίπεδα παρουσιάζουν περαιτέρω αύξηση μετά από VOC (41).

Μεγαλύτερο κίνδυνο να προσβληθούν από βακτηριακές λοιμώξεις παρουσιάζουν οι ασθενείς με SCD σε σύγκριση με τους υγιείς (42, 43). Παρ'όλα αυτά, η μοριακή παθοφυσιολογία που οδηγεί σε αυτή την ευαισθησία σε λοιμώξεις φαίνεται ακατανόητη. Πριν λίγο καιρό, η αίμη αποδείχθηκε ότι συμβάλλει στην κυτταροσκελετική διαταραχή που προάγει την εξασθενημένη βακτηριακή κάθαρση, τη φαγοκυττάρωση και τη μετανάστευση από μονοκύτταρα, μακροφάγα και ουδετερόφιλα. Συγκεντρωτικά, αυτές οι έρευνες ξεκαθαρίζουν πως η αίμη χωρίς κύτταρα προάγει την παρουσία του TLR4 σε μονοπύρηννα λευκοκύτταρα και στα ενδοθηλιακά κύτταρα, στη δημιουργία ROS από αγγειακά κύτταρα και στη δημιουργία NET από ουδετερόφιλα σε SCD (44). Συνεπώς, αποτελεί έναν ισχυρό ενεργοποιητή φλεγμονής (45).

1.4 Κλινική εικόνα

Η κλινική εικόνα της ΔΝ ποικίλει ανάλογα με τη σοβαρότητα της νόσου τον απλότυπο και τη γονιδιακή βλάβη και μπορεί να έχει διάφορες εκδηλώσεις. Παρακάτω αναφέρονται οι πιο συχνές επιπλοκές και πώς μπορούν να αντιμετωπιστούν.



Εικόνα 5. Επιπλοκές της δρεπανοκυτταρικής νόσου σε διάφορα σημεία του ανθρώπινου σώματος.
Πηγή: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC11120250/>

A. Κρίσεις

Αγγειοαποφρακτική ή Επώδυνη κρίση

Ο έντονος, διαλείπων οξύς πόνος αποτελεί την πιο διαδεδομένη παθολογική εκδήλωση της δρεπανοκυτταρικής νόσου και είναι ο κύριος λόγος νοσηλείας στους ενήλικες και τα παιδιά. Ο χρόνιος πόνος σε καθημερινή βάση, που εντείνεται με το γήρας, εμφανίζεται σε ποσοστό 30-40% των εφήβων και των ενηλίκων με δρεπανοκυτταρική νόσο. Ο έντονος πόνος συνδέεται σε μεγάλο βαθμό με αγγειοαπόφρακτα φαινόμενα που προκύπτουν από την αλληλε-

πίδραση των δρεπανοκυττάρων. Αυτός ο πόνος μπορεί να εκδηλώνεται είτε σε μια συγκεκριμένη ανατομική περιοχή (όπως το χέρι, το πόδι ή η πλάτη) είτε σε πολλές περιοχές ταυτόχρονα. Οι περιοχές που επηρεάζονται περιλαμβάνουν τα μακριά οστά, τα πλευρά, το στήθος, τη σπονδυλική στήλη και τη λεκάνη. Οι αποφράξεις συνήθως πλήττουν τα τριχοειδή αγγεία και τα μετατριχοειδή φλεβίδια. Μια επώδυνη αγγειοαποφρακτική κρίση ενδεχομένως να συνοδεύεται και από πυρετό. Σε παιδιά ηλικίας μικρότερης των 3 ετών, συχνά επηρεάζονται τα οστά και ο πόνος μπορεί να εκδηλωθεί ως δακτυλίτιδα ή σύνδρομο χεριού-ποδιού. Ο χρόνιος πόνος πιθανώς να οφείλεται στην ευαισθητοποίηση του κεντρικού και/ή του περιφερικού νευρικού συστήματος και συχνά έχει διάχυτο χαρακτήρα. Ο ορισμός του χρόνιου πόνου περιλαμβάνει την παρουσία μεγάλης διάρκειας πόνου τις περισσότερες ημέρες των τελευταίων 6 μηνών, σε μεμονωμένη ή όχι περιοχή. Επιπλοκές της νόσου, όπως η αγγειακή νέκρωση (π.χ. ισχίο, ώμος) και τα έλκη στα πόδια, μπορεί και να προκαλέσουν χρόνια πόνο. Η θεραπεία για τα περισσότερα αγγειοαποφρακτικά επεισόδια μπορεί να γίνει στο σπίτι με τη χρήση αντιφλεγμονωδών φαρμάκων και αναλγητικών (6, 46).

Απλαστική κρίση

Στις χρόνιες αιμολυτικές αναιμίες, ο προσωρινός έλεγχος της ερυθροποίησης είναι ικανός να προκαλέσει σοβαρή αναιμία, γνωστή ως απλαστική κρίση με μείωση της αιμοσφαιρίνης και των ΔΕΚ. Παρόλο που συνήθως οι ασθενείς αναρρώνουν εντός λίγων ημερών, η αναιμία μπορεί σε ορισμένες περιπτώσεις να είναι τόσο σοβαρή που να οδηγήσει σε καρδιακή ανεπάρκεια, με σπάνιες περιπτώσεις θανάτου. Η λοίμωξη από τον παρβοϊό Β19 είναι υπεύθυνη για ποσοστό πάνω από 70% των περιπτώσεων. Η απλασία προκαλείται από την κυτταροτοξικότητα των πρόδρομων ουσιών του ιού, με τη δικτυοκυτταροπενία να διαρκεί από 7 έως 10 ημέρες (47, 48).

Αιμολυτική κρίση

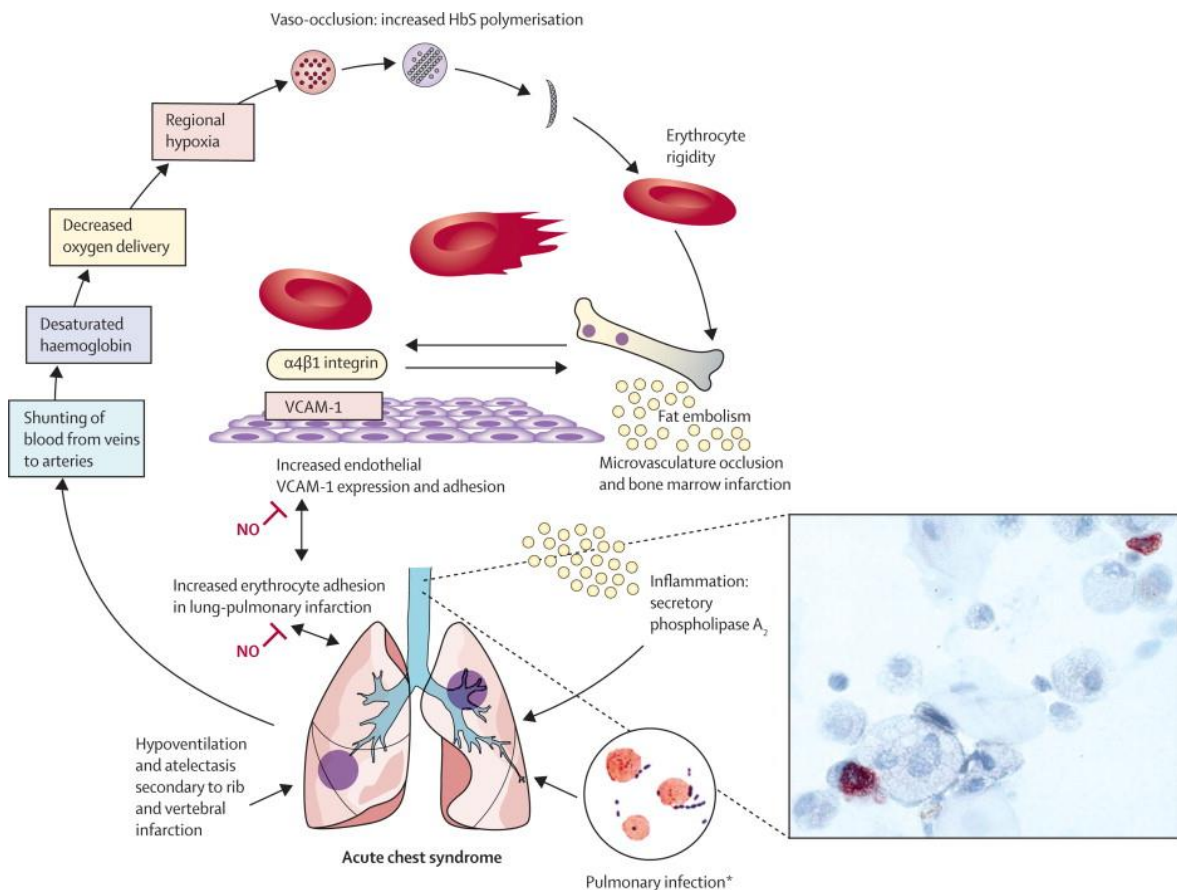
Διακρίνεται από ταχύτατη μείωση των επιπέδων αιμοσφαιρίνης λόγω της έντονης καταστροφής των ερυθρών κυττάρων. Εμφανίζονται δείκτες αιμόλυσης, όπως αυξημένα ΔΕΚ, LDH και έμμεση χολερυθρίνη. Συνήθως παρατηρείται σε άτομα με έλλειψη του ενζύμου G6PD (49).

Β. Άλλες εκδηλώσεις

Οξύ θωρακικό σύνδρομο

Το οξύ θωρακικό σύνδρομο αποτελεί βασική αιτία εισαγωγής στο νοσοκομείο και κύριο λόγο θνησιμότητας στους νεαρούς ενήλικες. Διαγιγνώσκεται όταν υπάρχουν τουλάχιστον

δύο από τα εξής συμπτώματα ή ενδείξεις: θωρακικός πόνος, πυρετός, πνευμονικό διήθημα ή εστιακή ανωμαλία, αναπνευστικά προβλήματα, ή υποξαιμία (50). Τα συνεχόμενα επεισόδια μπορούν να οδηγήσουν σε χρόνια πνευμονική νόσο, συμπεριλαμβανομένης της πνευμονικής υπέρτασης. Το σύνδρομο διακρίνεται από την ακτινολογική εμφάνιση νέας πνευμονικής διήθησης που επηρεάζει τουλάχιστον ένα πλήρες τμήμα του πνεύμονα, συνοδευόμενη από πυρετό και άλλα αναπνευστικά συμπτώματα. Συνήθως εκδηλώνεται υποξία. Ορισμένοι ασθενείς, σχεδόν οι μισοί, εισάγονται για διάγνωση που δεν αφορά το οξύ θωρακικό σύνδρομο (1). Το σύνδρομο εμφανίζεται συχνότερα στα παιδιά, αν και η θνητότητα τους είναι χαμηλότερη (<2%) σε σύγκριση με τους ενήλικες (4-9%). Στα παιδιά παρατηρείται συχνότερα κατά τη διάρκεια του χειμώνα, πιθανότατα λόγω της αυξημένης εμφάνισης λοιμώξεων του αναπνευστικού συστήματος (51).



Εικόνα 6. Η παθοφυσιολογία του οξέος θωρακικού συνδρόμου. Η μόλυνση ή άλλα φλεγμονώδη ερεθίσματα προκαλούν πνευμονική υποξία και αυξημένη έκφραση μορίων ενδοθηλιακής προσκόλλησης, συμπεριλαμβανομένων των $\alpha 4\beta 1$ και VCAM-1. Αυτό επιταχύνει τον πολυμερισμό της HbS και την αγγειοαπόφραξη, προκαλώντας περαιτέρω υποξία και φλεγμονή και δημιουργώντας έναν σταθερό κύκλο. Η αγγειοαπόφραξη προκαλεί την απελευθέρωση ελεύθερης αιμοσφαιρίνης στο πλάσμα, η οποία μειώνει τη διαθεσιμότητα NO, αλλάζοντας την έκφραση του VCAM-1. Η αγγειοαπόφραξη και το έμφραγμα του μυελού των οστών μπορεί να προκαλέσουν λιπώδη εμβολή, βλάπτοντας περαιτέρω την πνευμονική κυκλοφορία. Η χρώση δείχνει ελαιοκόκκινη χρώση O των πνευμονικών κυψελιδικών μακροφάγων, δείχνοντας τα χαρακτηριστικά ερυθρά λιπιδικά εγκλείσματα που είναι διαγνωστικά για λιπώδη εμβολή. Οι συγκεντρώσεις της εκκριτικής φωσφολιπάσης A₂, οι οποίες αυξάνονται ως απόκριση στη φλεγμονή και είναι γνωστό ότι είναι πολύ υψηλές στο οξύ θωρακικό σύνδρομο, αυξάνουν περαιτέρω την

Λοιμώξεις

Οι βακτηριακές λοιμώξεις συνιστούν κύρια αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας στα παιδιά με δρεπανοκυτταρική αναιμία (ΔΝ). Η αυξημένη ευαισθησία αυτών των παιδιών ενδέχεται να προκύπτει από διάφορους παράγοντες, όπως η μειωμένη λειτουργία του σπλήνα, τα ελαττώματα στην ενεργοποίηση του συμπληρώματος, οι ελλείψεις σε μικροθρεπτικά συστατικά και η ισχαιμία των ιστών. Στις ανεπτυγμένες χώρες, έχουν σηματοδοτηθεί ως σημαντικές αιτίες λοίμωξης, όπου έχουν σημειωθεί σημαντικές πρόοδοι με την εισαγωγή της προφύλαξης με πενικιλίνη και της ανοσοποίησης με συζευγμένα εμβόλια κατά του πνευμονιόκοκκου και του αιμόφιλου ινφλουέντζα. Παρόμοιες προσπάθειες απαιτούνται και σε άλλες περιοχές, όπως η υποσαχάρια Αφρική, όπου η αντιμετώπιση των βακτηριακών λοιμώξεων παραμένει πρόκληση λόγω ελλειμμάτων στις υποδομές υγείας και της έλλειψης πρόσβασης σε κατάλληλη φροντίδα υγείας.

Νευρολογικές επιπλοκές

Βασική επιπλοκή της δρεπανοκυτταρικής νόσου είναι τα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια. Η αγγειοπάθεια δείχνει να αρχίζει από τη βρεφική ηλικία, με το πρώτο εγκεφαλικό επεισόδιο συνήθως να συμβαίνει μεταξύ 2 και 5 ετών. Περίπου το 11% των ασθενών με SCD έχει υποστεί εγκεφαλικό επεισόδιο μέχρι την ηλικία των 20 ετών. Η πρόληψη και η πρόωπη διάγνωση είναι κρίσιμες για τη μείωση του κινδύνου εγκεφαλικών επεισοδίων σε ασθενείς με δρεπανοκυτταρική νόσο (32). Η χρήση διακρανιακού υπερηχογραφήματος Doppler μπορεί να βοηθήσει στην ανίχνευση της αγγειοπάθειας σε πρώιμο στάδιο σε ασθενείς με SCD. Η συχνή μετάγγιση αίματος για την εξασφάλιση της HbS κάτω από 30% ελαττώνει τον κίνδυνο εγκεφαλικού επεισοδίου σε ποσοστό 90% σε πάσχοντες με αυξημένες διακρανιακές ταχύτητες Doppler. Παράλληλα, προγράμματα διακρανιακού προσυμπτωματικού ελέγχου Doppler έχουν εγκαθιδρυθεί σε ορισμένες χώρες με στόχο τη μείωση της εμφάνισης των εγκεφαλικών επεισοδίων. Η χρόνια μεταγγισιοθεραπεία εμπεριέχει τους κοινούς κινδύνους της αλλοανοσοποίησης, της αιμοσιδήρωσης και των λοιμώξεων. Συνεπώς, πρέπει να εξεταστούν εναλλακτικές προσεγγίσεις για την πρόληψη του προβλήματος. Ερευνώνται μέθοδοι όπως η χορήγηση υδροξυκαρβαμίδης για την πρόληψη της εγκεφαλοαγγειακής νόσου, αν και φαίνεται ότι αυτή η μέθοδος έχει περιορισμένη αποτελεσματικότητα (1).

Η μεταμόσχευση μπορεί να βοηθήσει στην πρόληψη της επανεμφάνισης εγκεφαλικών επεισοδίων σε ασθενείς με δρεπανοκυτταρική νόσο. Εν τούτοις, αυτή η παρέμβαση θα

ήταν πιο αποτελεσματική αν εφαρμοζόταν πριν την εμφάνιση του επεισοδίου, καθώς θα ελαττώσει το ενδεχόμενο εγκεφαλικής αιμορραγίας που σχετίζεται με την απλασία κατά τη διάρκεια της μεταμόσχευσης. Παρά τα προληπτικά μέτρα για την αποφυγή αγγειακών επιπλοκών, εγκεφαλικά επεισόδια συνεχίζουν να συμβαίνουν τόσο σε παιδιά όσο και σε ενήλικες ασθενείς με ΔΝ.

Νεφροπάθεια

Η σπειραματοπάθεια είναι μια πρόιμη ασυμπτωματική εκδήλωση της νεφροπάθειας στην ασθένεια της δρεπανοκυτταρικής νόσου. Αυτή η κατάσταση χαρακτηρίζεται από υπερδιήθηση που οδηγεί σε λευκωματουρία και επιδεινώνεται με την πάροδο του χρόνου. Η υπερδιήθηση, η οποία χαρακτηρίζεται ως η απόλυτη αύξηση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης, παρουσιάζεται στο 43% των παιδιών με SCD, ενώ η λευκωματουρία αναφέρεται στο 32% των ενηλίκων ασθενών με τη νόσο. Η σπειραματοπάθεια προέρχεται από ενδαγγειακή αιμόλυση και δυσλειτουργία του ενδοθηλίου στον νεφρικό φλοιό. Η μυελική υποαιμάτωση και η ισχαιμία συνεισφέρουν επίσης στην ανάπτυξη νεφρικής νόσου σε άτομα με SCD, εμφανίζοντας αιματουρία, δυσκολία συγκέντρωσης ούρων και δυσλειτουργία των περιφερικών σωληναρίων. Περίπου το 20-40% των ενηλίκων με δρεπανοκυτταρική νόσο εκδηλώνουν χρόνια νεφρική νόσο, με κίνδυνο εξέλιξης σε νεφρική νόσο τελικού σταδίου. Η ταχεία μείωση του εκτιμώμενου ρυθμού σπειραματικής διήθησης σχετίζεται με αύξηση της θνησιμότητας σε ασθενείς με δρεπανοκυτταρική νόσο.

Καρδιοπνευμονική νόσος

Η καρδιοπνευμονική νόσος συνδέεται με υψηλότερα ποσοστά ασθένειας και θανάτου σε άτομα με SCD. Η πνευμονική υπέρταση, πιο συχνά η πνευμονική αρτηριακή υπέρταση (ΠΑΥ) εμφανίζεται σε περίπου 10% των ενηλίκων με SCD. Η χρόνια ενδαγγειακή αιμόλυση αποτελεί τον κυριότερο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση ΠΑΥ σε άτομα με SCD. Αυτή η κατάσταση προκαλεί αγγειοσυστολή της πνευμονικής αρτηρίας και αύξηση του αριθμού των λείων μυϊκών κυττάρων. Σύμφωνα με τον έλεγχο της πνευμονικής λειτουργίας, η αποφρακτική πνευμονοπάθεια παρατηρείται σε ποσοστό 16% των παιδιών και 8% των ενηλίκων με SCD. Από την άλλη πλευρά, η περιοριστική πνευμονοπάθεια εντοπίζεται σε έως και 28% των ενηλίκων και μόνο στο 7% των παιδιών με SCD. Η διαταραχή της αναπνοής στον ύπνο, που ενδέχεται να εμφανιστεί ως αποφρακτική άπνοια ύπνου ή νυχτερινή υποξαιμία, εκδηλώνεται σε ποσοστό σχεδόν 50% των παιδιών και των ενηλίκων με SCD. Η καρδιοπνευμονική νόσος, που περιλαμβάνει την πνευμονική υπέρταση και τη περιοριστική

πνευμονοπάθεια, εμφανίζεται με συμπτώματα όπως η δύσπνοια, ο πόνος στο στήθος, η υποξαιμία ή η δυσκολία στην άσκηση. Επίσης, μπορεί να εκδηλωθεί με συριγμό. Σημασία έχει να καταλάβουν οι ασθενείς τα συμπτώματα και να δεχθούν άμεση ιατρική παρέμβαση (6).

Σπληνικός εγκλωβισμός

Ο σπληνικός εγκλωβισμός αναφέρεται στη γρήγορη δέσμευση κυτταρικών στοιχείων του αίματος εντός της σπλήνας. Το πρώτο επεισόδιο σπληνικού εγκλωβισμού συνήθως παρατηρείται σε παιδιά ηλικίας έως 5 ετών. Το εύρος της βαρύτητας του σπληνικού εγκλωβισμού είναι μεγάλο και ενδεχομένως να εμπεριέχει σπάνια φαινόμενα οξείας διόγκωσης του σπλήνα, που συνοδεύεται από κυκλοφορική κατάρρευση και μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο λόγω αναιμίας και υπογκαιμικού σοκ. Αυτός ο συνδυασμός χαρακτηριστικών πρέπει να προσμετράται και στα παιδιά και στους ενήλικες σε τμήματα επειγόντων περιστατικών, όπου η γνώση σχετικά με τις αιμοσφαιρινοπάθειες μπορεί να μην είναι διαθέσιμη από την αρχή. Συχνά, παρουσιάζεται διεύρυνση του οργάνου που ξεπερνά τα 2 cm, συνοδευόμενη από ελάττωση της συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης κατά τουλάχιστον 20 g/L και σημαντική αύξηση των ΔΕΚ.

Πριαπισμός

Εμφανίζεται στο 35% των ανδρών ανεξαρτήτως ηλικίας. Ενδέχεται να είναι χαμηλής (ισχαιμικής) ή υψηλής (μη ισχαιμικής) ροής. Ο πριαπισμός χαμηλής ροής συνήθως προκύπτει από μειωμένη φλεβική εκροή και υποξία λόγω της δρεπανοκύτταρης μορφολογίας των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Είναι βασικό να υπάρχει άμεση αντιμετώπιση, καθώς μπορεί να προκαλέσει μερική ή ακόμα και πλήρη ανικανότητα. Η διαχείριση του πριαπισμού είναι σημαντική και μπορεί να περιλαμβάνει φαρμακευτική θεραπεία, συμβουλές για αλλαγές στον τρόπο ζωής και σε ορισμένες περιπτώσεις χειρουργική επέμβαση. Η πρόληψη και η διαχείριση του πριαπισμού είναι σημαντικές για τη διατήρηση της σεξουαλικής υγείας και της ποιότητας ζωής (46).

2. Θεραπεία

Μια σειρά μεθόδων θεραπείας για τη δρεπανοκυτταρική νόσο μπορεί να περιλαμβάνει τη χρήση φαρμάκων όπως η υδροξυουρία, τη μετάγγιση ερυθρών κυττάρων, τη μεταμόσχευση βλαστοκυττάρων και την παρουσία γλουταμίνης. Οι ασθενείς μπορεί να επωφεληθούν από

τη συνδυασμένη δράση αυτών των θεραπειών, η οποία μπορεί να βελτιώσει την ποιότητα ζωής τους και να μειώσει τη συχνότητα και τη σοβαρότητα των κρίσεων πόνου.

2.1 Μετάγγιση Ερυθρών Αιμοσφαιρίων

Η βασική θεραπευτική μέθοδος για τη δρεπανοκυτταρική νόσο είναι η μετάγγιση ερυθρών αιμοσφαιρίων. Τουλάχιστον το 90% των ενηλίκων δέχονται μία μετάγγιση κατά τη διάρκεια του βίου τους. Ο σκοπός των μεταγγίσεων είναι να αντικαταστήσουν τα δρεπανοειδή άκαμπτα ερυθροκύτταρα με φυσιολογικά ερυθροκύτταρα, βοηθώντας έτσι στην πρόληψη μακροχρόνιων επιπλοκών. Οι χρόνιες μεταγγίσεις βοηθούν στη μείωση του σχηματισμού δρεπανοειδών ερυθροκυττάρων, προσφέροντας αντικατάσταση με φυσιολογικά ερυθροκύτταρα. Αυτή η θεραπεία συνήθως περιλαμβάνει μηνιαίες απλές ή ανταλλακτικές μεταγγίσεις, ανάλογα με τις ανάγκες του ασθενούς (24).

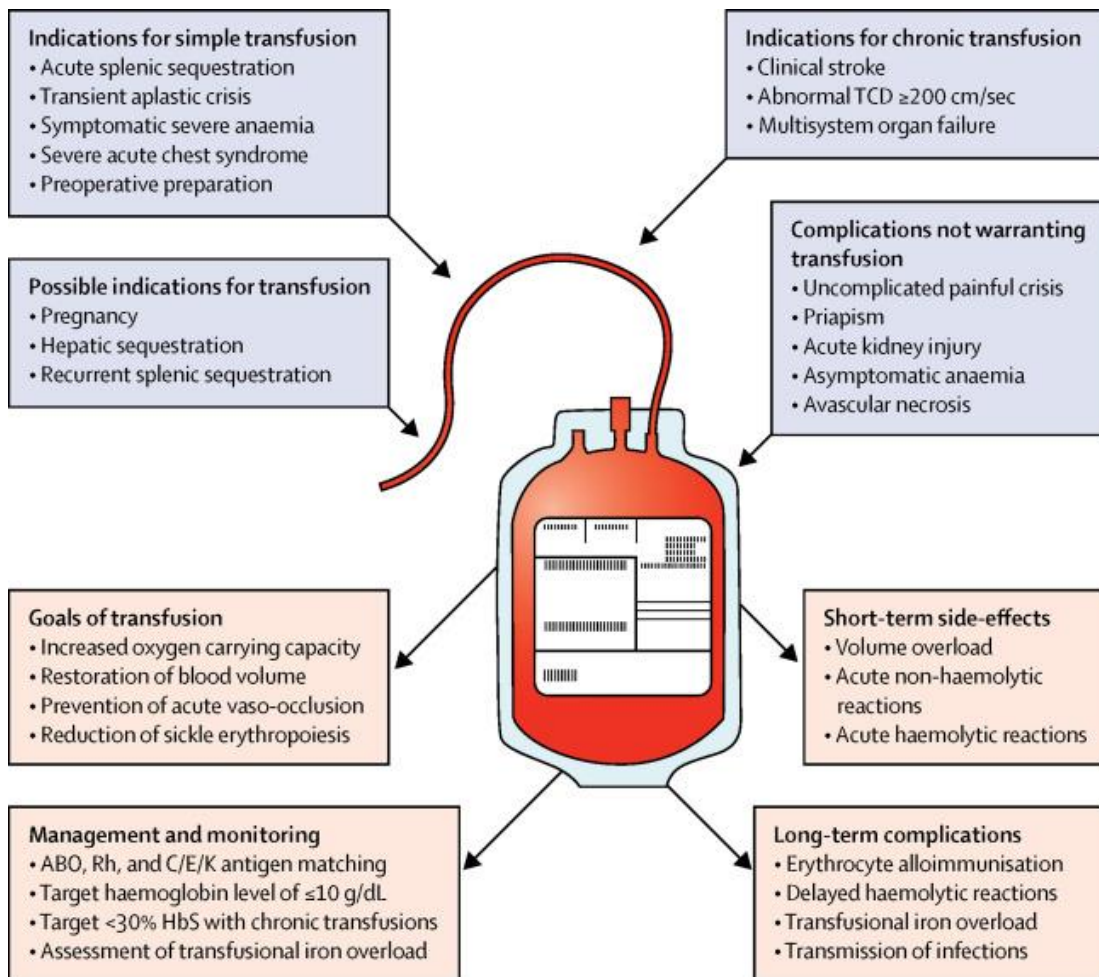
Η μετάγγιση αίματος αποτελεί σημαντικό μέρος στη θεραπεία ορισμένων καταστάσεων όπως το εγκεφαλικό επεισόδιο και το οξύ θωρακικό σύνδρομο, όπου μπορεί να ωφελήσει στη μείωση των επιπλοκών και να βοηθήσει στην πρόληψη επαναλαμβανόμενων επεισοδίων. Η προεγχειρητική προετοιμασία επίσης επωφελείται από τη μετάγγιση, ενώ οι μεταγγίσεις μπορούν να συνδράμουν και στην πρόληψη δευτερογενών εγκεφαλικών επεισοδίων. Η κλινική προσέγγιση στη διαχείριση του εγκεφαλικού επεισοδίου έχει εστιαστεί προς την πρωτογενή πρόληψη, με τη χρήση προσυμπτωματικών ελέγχων όπως το Transcranial Doppler (TCD) για την ανίχνευση υψηλού κινδύνου ατόμων, ακολουθούμενο από μεταγγίσεις, με σκοπό την αποτροπή υποτροπής και τη μείωση της θνησιμότητας.

Οι μεταγγίσεις αίματος έχουν αποδεδειγμένα οφέλη, αλλά μπορεί να προκαλέσουν και επιπλοκές που μπορούν να περιορίσουν τη μακροχρόνια χρήση τους. Η αλλοανοσοποίηση των ερυθροκυττάρων είναι ένα σημαντικό ζήτημα, ειδικά στη δρεπανοκυτταρική νόσο, όπου οι αντιδράσεις αλλοανοσοποίησης μπορεί να απειλήσουν τη ζωή. Τα αντιγόνα RhD, RhC, RhE και Kell δεν προσφέρουν πλήρη προστασία από την αλλοανοσοποίηση, καθώς ορισμένες μορφές αυτών των αντιγόνων με μειωμένη ή αλλοιωμένη έκφραση μπορεί να μην αποτρέπουν εντελώς την αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος (7).

Η αιμοσιδήρωση με παρεγχυματική εναπόθεση σιδήρου αποτελεί σημαντικό πρόβλημα για ασθενείς που υποβάλλονται σε τακτικές μεταγγίσεις αίματος. Η υπερβολική εναπόθεση σιδήρου μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές επιπλοκές ακόμα και θανατηφόρες και γι' αυτό συχνά απαιτείται θεραπεία αποσιδήρωσης (52).

Η μετάδοση αιματογενών λοιμώξεων μέσω μεταγγίσεων είναι μια σημαντική ανησυχία στον τομέα της υγείας. Παρ' όλες τις προόδους που έχουν σημειωθεί στη μείωση της

μετάδοσης ιογενών λοιμώξεων μέσω μεταγγίσεων με τη χρήση προληπτικών μέτρων, όπως ο προσυμπτωματικός έλεγχος, εξακολουθούν να υπάρχουν ανησυχίες, ιδίως σε περιοχές χαμηλών πόρων. Η μετάδοση ηπατίτιδας Β, ηπατίτιδας C και του HIV παραμένει πρόκληση σε περιβάλλοντα όπου ο συστηματικός έλεγχος δεν είναι ευρέως διαθέσιμος. Η προσεκτική διαχείριση των αιμοδοσιών και η ενίσχυση των προληπτικών προσπαθειών αποτελούν ζωτικούς παράγοντες για τη μείωση του κινδύνου μετάδοσης αυτών των λοιμώξεων. Στη Σενεγάλη, υπάρχει ένα ποσοστό της τάξης του 7% των αποδεκτών αιμοδοτών που διαθέτουν το επιφανειακό αντιγόνο ηπατίτιδας Β. Αντίστοιχα, υπάρχουν αιμοδότες (0,71%) που έχουν αντισώματα για την ηπατίτιδα C, για τη σύφιλη (0,34%) και HIV (0,05%) (53). Στην Αφρική, παρατηρούνται πρόσθετες ανησυχίες που έχουν σχέση με την εύρεση αίματος και το κόστος (7).



Εικόνα 7. Κλινικές ενδείξεις που επηρεάζουν την απόφαση για μετάγγιση σε ασθενή με ΔΝ
 Πηγή: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673617301939?via%3Dihub#fig2>

2.2 Χορήγηση Υδροξουρίας

Το υδροξυκαρβαμίδιο (αλλιώς υδροξουρία) αποτελεί αναστολέα της ριβονουκλεοτιδικής αναγωγής που έχει πολλές και διαφορετικές φυσιολογικές επιδράσεις. Ένα από τα σημαντικά του χαρακτηριστικά είναι η ικανότητά του να αυξάνει την έκφραση της HbF σε πολλούς ασθενείς με θαλασσαιμία ή άλλες σχετικές διαταραχές. Η αύξηση της HbF μπορεί να βοηθήσει στη μείωση των συμπτωμάτων και των επιπλοκών που σχετίζονται με αυτές τις διαταραχές. Επιπλέον, το υδροξυκαρβαμίδιο μπορεί να έχει άλλες θετικές επιδράσεις, όπως τη μείωση του αριθμού των λευκοκυττάρων σε ορισμένες περιπτώσεις (15).

Η μακροχρόνια καθημερινή χορήγηση υδροξουρίας από του στόματος έχει δείξει πως περιορίζει ή προλαμβάνει αρκετές από τις οξείες και χρόνιες επιπλοκές της SCD. Η χρήση της ξεκίνησε από το 1970 ως μέθοδος αντιμετώπισης μυελοπερπλαστικών νεοπλασμάτων και από το 1980 γνωστοποιήθηκε ως υποσχόμενο φάρμακο για τη SCD. Προάγει τη σύνθεση εμβρυϊκής σφαιρίνης (HbF) μειώνοντας έτσι τις επιπλοκές που σχετίζονται με την SCD. Έχει αποδειχθεί ότι η υδροξουρία απορροφάται γρήγορα και έχει υψηλή βιοδιαθεσιμότητα, ενώ η θεραπεία με δόση από το στόμα μία φορά την ημέρα έχει καταδειχθεί ως αποτελεσματική.

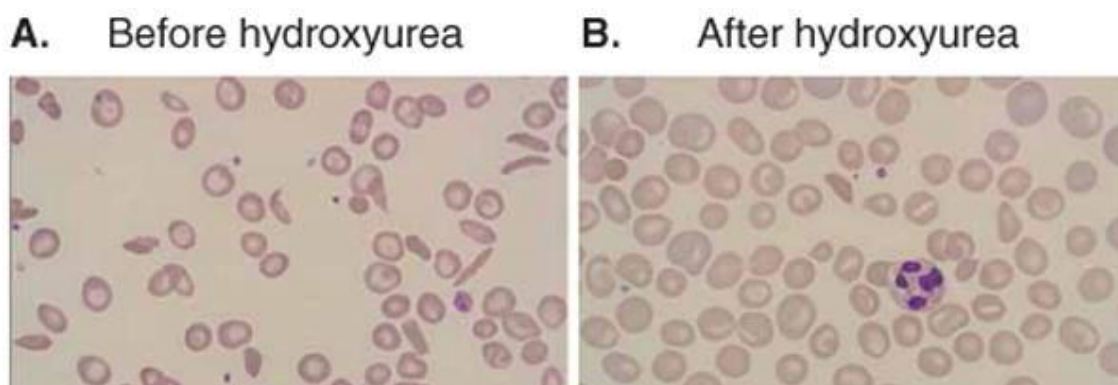
Η βασική επίδραση της υδροξουρίας είναι η αύξηση της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης, η οποία προσφέρει τα μεγαλύτερα οφέλη σε άτομα με SCD. Εκτός από αυτόν τον βασικό μηχανισμό δράσης, υπάρχουν και άλλοι τρόποι με τους οποίους επηρεάζει τη νόσο και προσφέρει οφέλη (7).

Πρωτίστως, η ελάττωση των κυκλοφορούντων λευκοκυττάρων και δικτυοερυθροκυττάρων με τη χρήση υδροξουρίας περιορίζει τόσο την τάση προσκόλλησής τους σε μόρια όσο και την αγγειακή απόφραξη. Ακόμα, μεγενθύνει τα ερυθρά κύτταρα (υψηλότερος MCV) και προάγει την παραμόρφωση των κυττάρων, η οποία συμβάλει στη βελτίωση της ροής του αίματος και της μείωσης την αγγειοαπόφραξη (54). Επιπροσθέτως, η άμεση απελευθέρωση του μονοξειδίου του αζώτου από το μεταβολισμό της υδροξουρίας ενδέχεται να ενισχύσει στην τοπική αγγειοδιαστολή.

Η θεραπεία με υδροξουρία ενέχει σπουδαία οφέλη σε ασθενείς με SCD, όπως η μείωση της συχνότητας επώδυνων κρίσεων και περιστατικών ACS, καθώς και η μείωση της ανάγκης για μεταγγίσεις ερυθρών αιμοσφαιρίων και παραμονής σε χώρους υγείας. Ακόμα, η μακροχρόνια χορήγησή της οδηγεί στη συρρίκνωση της θνησιμότητας σε αυτούς τους ασθενείς (55).

Η θεραπεία με υδροξυουρία σε παιδιά έχει σημαντικά οφέλη στη βελτίωση εργαστηριακών παραμέτρων όπως η ολική αιμοσφαιρίνη και η εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη, καθώς και στη μείωση του αριθμού των κλινικών συμβάντων που σχετίζονται με τα δρεπανοκύτταρα, όπως ο πόνος και το οξύ θωρακικό σύνδρομο. Συγκεκριμένα, συνιστάται η χορήγηση θεραπείας με υδροξυουρία σε παιδιά ηλικίας από 9 μηνών, συμπεριλαμβανομένων και των ασυμπτωματικών (56).

Υφίστανται, βέβαια, ορισμένα κλινικά περιστατικά, που μπορεί να χρήζουν πιο εξειδικευμένων προσεγγίσεων. Για παράδειγμα, η θεραπεία αυτή δεν ενδείκνυται κατάλληλη για τις έγκυες ή θηλάζουσες γυναίκες με ΔΝ. Εξετάζεται, ακόμα, η ανάγκη προσαρμογής της δόσης σε άτομα με δρεπανοκυτταρική και νεφρική νόσο. Ακόμα, έχουν καταγραφεί πολλοί ασθενείς με νόσο HbSC ή άλλους παραλλαγμένους γονότυπους της SCD για τους οποίους δεν είναι διαθέσιμα επαρκή στοιχεία που να τους συνδέουν με τους κινδύνους και τα οφέλη της θεραπείας με υδροξυουρία (7).

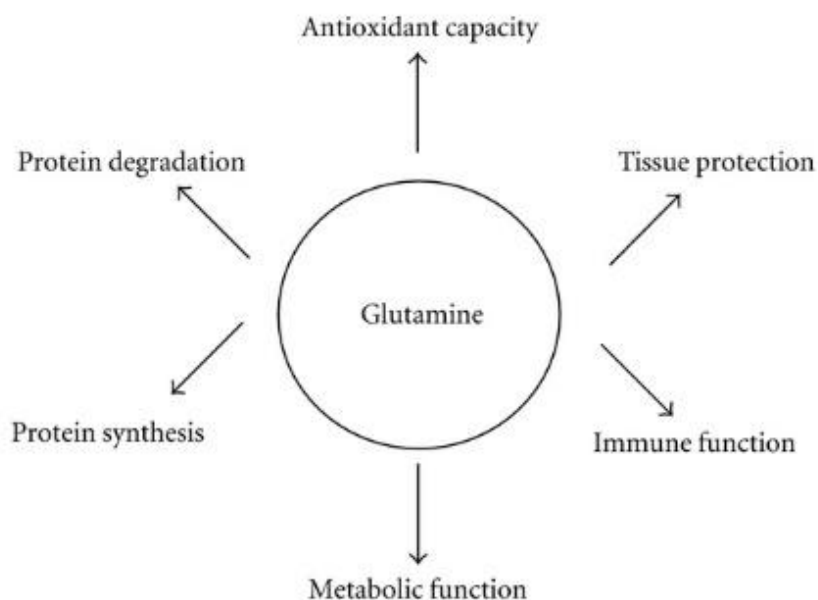


Εικόνα 8. Η αλλαγή στο επίχρισμα περιφερικού αίματος με τη θεραπεία με υδροξυουρία. Το επίχρισμα του περιφερικού αίματος αλλάζει με τη θεραπεία με υδροξυουρία. Το πάνελ Α απεικονίζει τη σοβαρή αναιμία και τα συχνά μη αναστρέψιμα δρεπανοειδή ερυθροκύτταρα που παρατηρούνται συνήθως σε ασθενείς με SCD που δεν λαμβάνουν θεραπεία. Το πάνελ Β δείχνει τη βελτίωση της αναιμίας και τις αυξήσεις τόσο στο μέγεθος όσο και στην περιεκτικότητα σε αιμοσφαιρίνη των ερυθροκυττάρων κατά τη θεραπεία με υδροξυουρία.
Πηγή: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5868345/>

2.3 Ο ρόλος της Γλουταμίνης

Η L-γλουταμίνη παρουσιάζεται ως το αμινοξύ με τη μεγαλύτερη αφθονία στο ανθρώπινο αίμα, καθώς εμπλέκεται σε πολλές βιολογικές λειτουργίες. Η γλουταμίνη συμμετέχει στη μεταφορά του αζώτου, στη διατήρηση της ομοιόστασης οξέος-βάσης και των καταβολικών σημάτων. Έχει τεράστια σημασία για τη ημιουργία άλλων αμινοξέων, πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων και νουκλεοτιδίων (57). Ενώ ο οργανισμός έχει τη δυνατότητα να παράγει αρκετή L-γλουταμίνη, σε περιόδους έντονου στρες ή αυξημένων αναγκών, η λήψη της μέσω της διατροφής είναι σημαντική. Για παράδειγμα, σε καταστάσεις όπως σοβαρές ασθένειες,

τραυματισμοί ή έντονη άσκηση, η ανάγκη για L-γλουταμίνη μπορεί να αυξηθεί. Σε τέτοιες περιπτώσεις, η ενίσχυση της διατροφής με τρόφιμα πλούσια σε L-γλουταμίνη μπορεί να βοηθήσει στην κάλυψη αυτών των επιπλέον αναγκών. Επομένως, αποτελεί ένα υπό συνθήκες χρήσιμο αμινοξύ για το ανθρώπινο όν (58).



Εικόνα 9. Σχηματική απεικόνιση των τρόπων δράσης της γλουταμίνης.

Πηγή: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3228321/>

Η L-γλουταμίνη μετατρέπεται σε γλουταμικό, το πρόδρομο της γλουταθειόνης, και συντηρεί το ενδοκυτταρικό δινουκλεοτίδιο νικοτιναμίδης αδενίνης (NAD), το οποίο συμβάλλει στην ανακύκλωση της γλουταθειόνης. Η χορήγηση από του στόματος συμπληρώματος γλουταμίνης στην SCD, ενισχύει το δυναμικό οξειδοαναγωγής του NAD και πιθανώς να περιορίζει την προσκόλληση των δρεπανοειδών ερυθροκυττάρων. Ανακαλύφθηκε από την Emmaus Medical για την εξάλειψη του συνδρόμου του βραχέως εντέρου και της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας και της β θαλασσαιμίας. Βοηθά στον περιορισμό της ανάγκης για ενέργεια σε παιδιά με SCD (59).

Η πολυκεντρική δοκιμή Φάσης III συμπληρωμάτων L-γλουταμίνης που διεξήχθη σε 230 παιδιά για την πρόληψη των κρίσεων πόνου σε παιδιά με δρεπανοκυτταρική νόσο έδειξε ότι ο μέσος όρος κρίσεων πόνου σε διάστημα 48 εβδομάδων ήταν χαμηλότερος στην ομάδα που έλαβε L-γλουταμίνη σε σχέση την ομάδα που έλαβε placebo. Αυτό υποδεικνύει τη δυνητική ωφέλεια της χρήσης της L-γλουταμίνης στη μείωση των κρίσεων πόνου σε αυτήν την πληθυσμιακή ομάδα (60).

Το Endari, που περιέχει L-γλουταμίνη σε μορφή σκόνης, πήρε έγκριση από τον FDA το 2017 για τον περιορισμό των οξέων παθολογικών εκδηλώσεων της δρεπανοκυτταρικής νόσου σε ενήλικες και παιδιατρικούς ασθενείς ηλικίας 5 ετών και άνω. Ανάμεσα στις ανεπιθύμητες ενέργειες του φαρμάκου περιλαμβάνονται ναυτία χαμηλού βαθμού, μη καρδιακός πόνος στο στήθος, κόπωση και μυοσκελετικός πόνος. Αν και αυτές οι ενέργειες εμφανίστηκαν πιο συχνά στην ομάδα που λάμβανε L-γλουταμίνη σε σχέση με την ομάδα του placebo, πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι δεν είναι ακόμα διαθέσιμα δεδομένα για τη λήψη του Endari κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης και της γαλουχίας (58).

2.4 Μεταμόσχευση μυελού των οστών

Η μεταμόσχευση μυελού των οστών, γνωστή και ως μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, αποτελεί μέχρι σήμερα την πιο αποτελεσματική θεραπεία για τη δρεπανοκυτταρική νόσο (61, 62). Οι διαδικασίες μεταμόσχευσης με δότη συγγενούς που είναι συμβατός για το σύστημα HLA χρησιμοποιούν βλαστοκύτταρα μυελού των οστών ή ομφαλοπλακουντιακού αίματος. Αυτές οι διαδικασίες δίνουν συνολική επιβίωση και επιβίωση χωρίς συμβάντα που πλησιάζουν το 90% (61). Αντίθετα, η χρήση βλαστοκυττάρων από το περιφερικό αίμα συνδέεται με αυξημένη θνησιμότητα. Ασχέτως με την επιτυχία της, η μεταμόσχευση βλαστοκυττάρων έχει μικρή εφαρμογή, καθώς μόνο το 10-20% των ασθενών διαθέτουν συμβατούς δότες που δεν επηρεάζονται από την κατάσταση της νόσου. Επίσης, παρατηρούνται σημαντικές ανησυχίες σχετικά με τη θνησιμότητα που σχετίζεται με τη μεταμόσχευση και τις χρόνιες τοξικότητες, ειδικά σε σχέση με τη στειρότητα (63). Τα αποτελέσματα της μεταμόσχευσης πρέπει επίσης να συγκρίνονται με τη θεραπεία με υδροξυκαρβαμίδα, η οποία δείχνει να είναι ασφαλής και αποτελεσματική για μακροχρόνια χρήση (24). Οι περισσότερες επιτυχείς μεταμοσχεύσεις βλαστοκυττάρων για δρεπανοκυτταρική νόσο έχουν προσαρμοστεί σε παιδιά και πραγματοποιούνται με τη χρήση μυελοεκαθαριστικής προετοιμασίας και πλήρως ταιριασμένων συγγενών δοτών. Αυτά τα σχήματα ενδέχεται να είναι τοξικά, και για το λόγο αυτό συνήθως εφαρμόζονται μόνο σε άτομα με σοβαρό φαινότυπο της νόσου, αλλά χωρίς προχωρημένη δυσλειτουργία τελικών οργάνων (64). Παρ' όλα αυτά, οι μεταμοσχεύσεις φαίνονται να έχουν αποτέλεσμα στην πρόληψη μελλοντικών κλινικών επιπλοκών όπως οι επώδυνες αγγειοαποφρακτικές κρίσεις, το οξύ θωρακικό σύνδρομο και το εγκεφαλικό επεισόδιο (62). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι θεραπευτικά σχήματα με μειωμένη τοξικότητα επιτρέπουν επιτυχείς μεταμοσχεύσεις και σε ενήλικες, με υψηλά ποσοστά επιβίωσης. Αυτές οι διαδικασίες έχουν επιτύχει ποσοστό 87% επιβίωσης χωρίς περιστατικά (24).

Οι προσπάθειες για ευρύτερη διαθεσιμότητα μεταμοσχεύσεων βλαστοκυττάρων σε περισσότερους ασθενείς, μέσω της επέκτασης της δεξαμενής δωρητών με τη χρήση μη συγγενών ταιριασμένων δοτών και μονάδων αίματος ομφάλιου λώρου, δεν έχουν αποδώσει τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Σε μια πολυκεντρική μελέτη στις ΗΠΑ που εξερεύνησε τις μεταμοσχεύσεις από μη συγγενείς ταιριασμένους δότες, η ομάδα που χρησιμοποίησε αίμα ομφάλιου λώρου διακόπηκε νωρίς λόγω υψηλής συχνότητας απόρριψης του μοσχεύματος. Η επιβίωση χωρίς συμβάντα ήταν μόλις 37,5%, και περιλάμβανε έναν θάνατο από χρόνια μόσχευμα εναντίον ασθένεια του ξενιστή (65). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε μια ομάδα 29 ασθενών που έλαβαν μεταμόσχευση από μη συγγενείς ταιριασμένους δότες, με διετή επιβίωση χωρίς επεισόδια στο 69%. Η συχνότητα εμφάνισης οξείας και χρόνιας νόσου του μοσχεύματος εναντίον του ξενιστή ήταν 28% και 62%, αντίστοιχα, και καταγράφηκαν 7 θάνατοι. Εξαιτίας αυτών των αποτελεσμάτων, το θεραπευτικό σχήμα ορίστηκε μη ασφαλές για να χρησιμοποιείται εκτεταμένα (66). Οι μη συγγενείς δότες έχουν τη δυνατότητα να επιτρέψουν σε περισσότερους νεαρούς ασθενείς με δρεπανοκυτταρική νόσο να υποβληθούν σε μεταμόσχευση βλαστοκυττάρων. Ωστόσο, προς το παρόν, αυτές οι διαδικασίες βρίσκονται σε πειραματικό στάδιο και ενέχουν υψηλό κίνδυνο. Η αναφερόμενη συνολική επιβίωση κυμαίνεται από 75% έως 100% (63), αλλά συνοδεύεται από υψηλά ποσοστά απόρριψης μοσχεύματος και νοσηρότητας που σχετίζεται με τη μεταμόσχευση.

3. Γονιδιακή θεραπεία

3.1 Γενικά

Τελευταία, η μεταφορά γονιδίων σε αυτόλογα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα μελετάται εντατικά και παρουσιάζει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα, τα οποία έχουν ήδη αποδειχθεί σε ζωικά μοντέλα. Χρησιμοποιώντας τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα του ίδιου ασθενούς, αποφεύγεται η ανάγκη για ιστοσυμβατό δότη και οι ανοσολογικές επιπλοκές που συνδέονται με την αλλογενή μεταμόσχευση μυελού των οστών. Οι αιμοσφαιρινοπάθειες έγιναν από τις πρώτες ασθένειες που εξετάστηκαν για γονιδιακή θεραπεία, επειδή η μεταφορά ενός μόνο γονιδίου θα ήταν ικανή θεωρητικά να έχει θεραπευτικό εύρος. Η εκτενής βάση δεδομένων με πληροφορίες για την παθοφυσιολογία των αναιμιών και η εις βάθος γνώση της έκφρασης του γονιδίου της σφαιρίνης προωθούν αυτές τις ασθένειες ως υποψήφιες για θεραπεία με γονιδιακή παρέμβαση.

Η γονιδιακή θεραπεία ονομάζουμε γενικά την εισαγωγή νουκλεϊκών οξέων σε κύτταρα μέσω ενός φορέα, με στόχο την τροποποίηση της γονιδιακής έκφρασης για την πρόληψη,

διακοπή ή αντιστροφή μιας παθολογικής διαδικασίας. Η γονιδιακή θεραπεία είναι εφικτή με τρεις κύριους τρόπους:

- προσθήκη γονιδίου,
- γονιδιακή διόρθωση ή
- αποσιώπηση γονιδίου

αλλά και συνδυάζοντάς τους.

Οι φορείς χορηγούνται είτε *in vivo* είτε *ex vivo* κάνοντας χρήση αυτόλογων κυττάρων από έναν συγκεκριμένο ασθενή. Με βάση τον τύπο του φορέα, το θεραπευτικό DNA είτε ενσωματώνεται στο χρωμοσωμικό DNA του ξενιστή είτε παραμένει ως εξωσωματικός φορέας.

3.2 Προσθήκη γονιδίου

Η προσθήκη γονιδίου αποτελεί την πιο διαδεδομένη τεχνική γονιδιακής θεραπείας που έχει εξεταστεί σε προκλινικές και κλινικές έρευνες. Αυτή η μέθοδος διεξάγεται είτε για την παροχή θεραπευτικού οφέλους είτε για την παραγωγή μιας πρωτεΐνης που λείπει λόγω γενετικής μετάλλαξης (67).

Οι στρατηγικές προσθήκης γονιδίων έχουν μελετηθεί από τη δεκαετία του 1970. Στην αρχή, χρησιμοποιήθηκαν ιοί άγριου τύπου, αφού ανακαλύφθηκε ότι οι ιοί μπορούν να μεταφέρουν γενετικές πληροφορίες. Στην περίπτωση της SCD, τα HSCs έχουν κυρίως τροποποιηθεί γονιδιακά *ex vivo* και στη συνέχεια επανεγχυθεί στον ασθενή, προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η γονοτοξικότητα εκτός στόχου σε άλλα όργανα που ενδεχομένως να προκληθεί από τη συστηματική χορήγηση γονιδιακά τροποποιημένων ιικών φορέων (68).

3.2.1 Φορέας β & γ Σφαιρίνης

Φορείς γαμμα ρετροϊών

Οι φορείς ρετροϊού βασίζονται σε ιούς που δύνανται να μετατρέπουν το RNA τους σε DNA κατά τη διάρκεια του μολυσματικού τους κύκλου και να εντάσσουν το γενετικό υλικό στο γονιδίωμα του μολυσμένου κυττάρου (69).

Μία ομάδα ρετροϊκών φορέων, οι φορείς γαμμαρετροϊών, χρησιμοποιήθηκε σε πρώιμες δοκιμές που αφορούν τη γονιδιακή θεραπεία για το σύνδρομο Wiskott-Aldrich και τη σοβαρή συσχετιζόμενη ανοσοανεπάρκεια. Υπάρχουν περιστατικά που η χρήση τους προκάλεσε κακοήθειες. Οι γαμμαρετροϊοί εντάσσονται κοντά σε γονιδιακές ρυθμιστικές περιοχές ή ογκογονίδια και διαθέτουν πολύ ισχυρούς προαγωγείς που ενδυναμώνουν το ογκογονικό τους δυναμικό. Η μέθοδος για την προσθήκη του γονιδίου που μας απασχολεί (γνωστό ως

«δια-γονίδιο») στα κύτταρα-στόχους έχει αναπτυχθεί το τελευταίο διάστημα για να ενισχύσει την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα.

Διαγονίδια τύπου γάμμα-σφαιρίνης

Η ενεργοποίηση της παραγωγής εμβρυϊκής σφαιρίνης ήταν μια ευρέως χρησιμοποιούμενη στρατηγική για την καταπολέμηση της SCD (70). Μία προσέγγιση για την αύξηση της έκφρασης της εμβρυϊκής σφαιρίνης περιλαμβάνει τον σχεδιασμό LVs για την παράδοση του γονιδίου γ-σφαιρίνης. Φορείς που μεταφέρουν το γονίδιο γ-σφαιρίνης σε συνδυασμό με ρυθμιστικά στοιχεία της β-σφαιρίνης έχουν αποδειχθεί ότι προκαλούν θεραπευτικά επίπεδα HbF, συμβάλλοντας στη βελτίωση της SCD σε μοντέλα δρεπανοκυτταρικής αναιμίας Berkeley (71). Άλλες τροποποιήσεις στους φορείς γ-σφαιρίνης περιλάμβαναν την αντικατάσταση της 3' αμετάφραστης περιοχής (UTR) της γ-σφαιρίνης με αυτήν της β-σφαιρίνης για την ενίσχυση της έκφρασης της γ-σφαιρίνης. Οι φορείς γ-σφαιρίνης που περιλάμβαναν την 3' UTR της β-σφαιρίνης παρουσίασαν γενικά καλύτερη διόρθωση της SCD σε μοντέλα ποντικών Berkeley, μέσω αυξημένης σταθερότητας του mRNA, υψηλότερης έκφρασης HbF και βελτιωμένων μετρήσεων RBC, συγκριτικά με τους φορείς γ-σφαιρίνης που περιλάμβαναν την 3' UTR της γ-σφαιρίνης (72).

Διαγονίδια τύπου γάμμα (βT87Q-σφαιρίνη)

Η χρήση ιογενών φορέων ιικού τύπου (LV) που εκφράζουν β-σφαιρίνη σε ερυθρά αιμοσφαίρια (RBC) που κάνουν ήδη παραγωγή αιμοσφαιρίνης HbS αποτελεί μια εναλλακτική προσέγγιση για τη βελτίωση της SCD. Ένα από τα μειονεκτήματα της υπερέκφρασης του γονιδίου της β-σφαιρίνης αποτελεί η ανάγκη για εξαιρετικά υψηλά επίπεδα έκφρασης της HbA, προκειμένου να αποτραπεί η πολυμερισμένη συσσώρευση της HbS.

Η εισαγωγή ενός μεταλλαγμένου κωδικονίου 87 (βA-T87Q) στη β-σφαιρίνη, το οποίο μετατρέπει το αμινοξύ θρεονίνη σε γλουταμίνη, ενισχύει την αντιδρεπανική δράση διαταράσσοντας τις πλευρικές αλληλεπιδράσεις στις δρεπανικές ίνες αιμοσφαιρίνης. Αυτή η μεταλλαγή του κωδικονίου προέρχεται από την αλλαγή αμινοξέων στη γ-σφαιρίνη, η οποία είναι υπεύθυνη για την ικανότητά της να περιορίζει τον πολυμερισμό της HbS (73). Η βA-T87Q-σφαιρίνη αξιολογήθηκε *in vivo*, και οι μελέτες κινητικής παρουσίασαν ότι ο μυελός των οστών των ποντικών BERK που τροποποιήθηκε με βA-T87Q-σφαιρίνη παρουσίασε καθυστέρηση στον πολυμερισμό της HbS και βελτίωση των αιματολογικών παραμέτρων στα ποντίκια (74). Αυτή τη στιγμή, οι κλινικές δοκιμές που διεξάγονται από την Bluebird Bio χρησιμοποιούν τη βA-T87Q-σφαιρίνη (HBG-206) για τη θεραπεία ασθενών με σοβαρή

δρεπανοκυτταρική αναιμία (SCD). Τα κύτταρα CD34+ μετατράπηκαν με τον ιικό φορέα LentiGlobin BB305 LV, και μετά την αυτόλογη μεταμόσχευση, οι ασθενείς παρουσίασαν μέση έκφραση της HbAT87Q περίπου 40% της συνολικής αιμοσφαιρίνης, με μέσο διάστημα 17,3 μήνες μετά την έγχυση. Μία εφάπαξ έγχυση αυτόλογων αιμοποιητικών βλαστικών και προγονικών κυττάρων (HSPC), που είχαν μετατραπεί με τον LentiGlobin BB305, οδήγησε σε περιορισμένη αιμόλυση και πλήρη ανάρρωση από VOC και οξύ θωρακικό σύνδρομο στους 25 ασθενείς που αξιολογήθηκαν (75).

Διαγονίδια που μοιάζουν με γάμμα (βAS3-σφαιρίνη)

Περαιτέρω τροποποιήσεις για την καταπολέμηση της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας έχουν μελετηθεί και ενσωματωθεί στα LVs. Η αντικατάσταση του γλουταμικού οξέος στη θέση αμινοξέος 22 με αλανίνη προάγει επιπλέον τις αντιδρεπανικές ιδιότητες μεταβάλλοντας την αξονική επαφή στη δρεπανοειδή ίνα (76). Η συνδυασμένη παρουσία των μεταλλάξεων E22A και T87Q μειώνει αρκετά τον πολυμερισμό της HbS. Μια επιπλέον τροποποίηση (G16D) ενισχύει τη συγγένεια για το πολυπεπτίδιο α-σφαιρίνης, προσφέροντας στην αντιδρεπανομονάδα β-σφαιρίνης μια ανταγωνιστική ιδιότητα απέναντι στις δρεπανικές υπομονάδες για το σχηματισμό τετραμερών αιμοσφαιρίνης. Μια αντιδρεπανοσφαιρίνη που περιλαμβάνει και τις τρεις τροποποιήσεις αντιδρεπανοειδούς κωδικονίου (βAS3-σφαιρίνη) ενσωματώθηκε στα LVs (Lenti/βAS3) (77). Αυτός ο φορέας βελτίωσε τόσο τα αιματολογικά όσο και τα κλινικά ευρήματα σε μοντέλα δρεπανοκυτταρικής αναιμίας σε ποντικούς και αποδείχθηκε ότι μεταδίδει αποτελεσματικά κύτταρα BM CD34+ από ασθενείς με SCD, επάγοντας θεραπευτικά επίπεδα της HbβAS3-σφαιρίνης για τη διόρθωση της φυσιολογίας των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Οι κλινικές δοκιμές διαθέτουν επί του παρόντος LVs βAS3 SIN για ασθενείς με SCD (78).

Μία από τις σημαντικές προκλήσεις στις κλινικές εφαρμογές γονιδιακής θεραπείας που χρησιμοποιούν β-ιογενείς φορείς (β-LVs) είναι η χαμηλή συγκέντρωσή τους, η οποία οφείλεται στο μεγάλο μήκος του προϊκού φορέα (79). Έχει τεκμηριωθεί ότι τα μικρότερα LVs έχουν την δυνατότητα να παραχθούν με 10-100 φορές υψηλότερους τίτλους από τους β-LVs. Πέρα από τα μεγαλύτερα γονιδιώματα, οι β-LVs συχνά περιέχουν πολύπλοκες κασέτες έκφρασης, οι οποίες επίσης επηρεάζουν αρνητικά τη συγκέντρωση του φορέα. Οι χαμηλές συγκεντρώσεις μετατρέπουν πιο δαπανηρή την δημιουργία των παρασκευασμάτων για κλινική χρήση, σύμφωνα με τις ορθές πρακτικές παραγωγής, που έχουν ως απόρροια το αυξημένο κόστος ανά δόση για τους ασθενείς. Επίσης, οι β-LVs έχουν αποδειχθεί λιγότερο αποτελεσματικοί στη μεταγωγή πρωτογενών ανθρώπινων HSCs σε σχέση με τα πιο απλά

LVs. Αυτό μπορεί να προάγει μη βέλτιστα επίπεδα μεταφοράς γονιδίων και διαγονιδιακής έκφρασης, με συνέπεια περιορισμένο θεραπευτικό όφελος.(80) Ένας βAS3-LV (GLOBE-AS3) που σχεδιάστηκε με έναν βραχύ προαγωγέα ανθρώπινης β-σφαιρίνης και ένα περιορισμένο LCR που διαθέτει στοιχεία HS2 και HS3, εμφάνισε μεγαλύτερο τίτλο ενώ προωθούσε την υψηλή έκφραση διαγονιδίων (81). Οι LV βAS3-σφαιρίνης έχουν αναπτυχθεί περαιτέρω για να μειωθεί το προϊκό μήκος τους (~4,7 kb) τροποποιώντας το μέγεθος του LCR. Αυτή η τροποποίηση έχει οδηγήσει σε υψηλότερους τίτλους και βελτιωμένη μεταφορά γονιδίων στα HSPCs. Επιπλέον, τα μικρότερα LV βAS3-σφαιρίνης έχουν αποδειχθεί ικανά να βελτιώσουν τον φαινότυπο του δρεπανιού σε μοντέλα ποντικών με δρεπανοκυτταρική νόσο (79).

3.2.2 *Lentiviral vectors (LVs).*

Οι φακοϊοί (LVs) ανήκουν στο γένος της οικογένειας των ρετροϊών. Οι ρετροϊοί είναι σφαιρικοί, περικαλυμμένοι, μονόκλωνοι ιοί RNA με διάμετρο περίπου 100 nm. Το σωματίδιο του φακοϊού περιέχει δύο αλυσίδες RNA που συνδέονται με πρωτεΐνες νουκλεοκαψιδίου και περιλαμβάνει επίσης πρωτεΐνες αντίστροφης μεταγραφάσης, ιντεγκράσης και πρωτεάσης. Οι ρετροϊοί μπορούν να διακριθούν σε απλούς ή σύνθετους ιούς, ανάλογα με την οργάνωση του γονιδιώματός τους. Οι γαμμαρετροϊοί είναι ένα παράδειγμα απλών ρετροϊών, ενώ ο HIV-1, ως φακοϊός, είναι παράδειγμα σύνθετου ρετροϊού (83).

Οι LVs διαθέτουν αρκετά χαρακτηριστικά που τους καθιστούν κατάλληλους για την ενσωμάτωση φορέων που επιτρέπουν τη μακροπρόθεσμη έκφραση διαγονιδίων. Έχουν τη δυνατότητα να συσκευάζουν γενετικό υλικό έως και 9 kb (84). Για ορισμένες ασθένειες, η έκφραση υψηλών επιπέδων πολλαπλών γονιδίων μπορεί να είναι κρίσιμη για την επίτευξη θεραπευτικών αποτελεσμάτων. Η χρήση δύο χωριστών φορέων που μεταφέρουν συνδεδεμένα διαγονίδια δεν αποτελεί την ιδανική λύση, καθώς η αποτελεσματικότητα της ταυτόχρονης μεταγωγής πολλαπλών ικών φορέων σε ένα κύτταρο είναι περιορισμένη. Αντίθετα, οι φορείς αυτοί έχουν αποδειχθεί ικανοί να εκφράζουν πολλαπλά γονίδια από έναν ενιαίο φορέα, προσφέροντας μια πιο αποτελεσματική λύση για την επίτευξη των απαιτούμενων θεραπευτικών αποτελεσμάτων (85, 86). Οι φακοϊκοί φορείς έχουν την ικανότητα να μεταφέρουν γονιδιακό υλικό σε μεταμιτωτικά και ήρεμα κύτταρα, σε αντίθεση με άλλες πλατφόρμες βασισμένες σε ρετροϊούς, όπως οι φορείς γαμμαρετροϊών, οι οποίοι απαιτούν ενεργή κυτταρική διαίρεση για την επιτυχή μόλυνση. Ενώ τα κύτταρα σε ηρεμία είναι γενικά λιγότερο επιρρεπή στη μόλυνση λόγω της έμφυτης ανοσολογικής τους απόκρισης, οι φακοϊκοί

φορείς μπορούν να επιτύχουν αποτελεσματική μεταγωγή ακόμη και σε τέτοιες συνθήκες, (87) η διέγερση της μιτωτικής εισόδου πιθανώς να προωθήσει τη μεταγωγή του ιού.

Τα συστήματα φορέων φακοϊών που προέρχονται από τον ιό HIV-1 έχουν αναπτυχθεί εξαιρετικά με την πάροδο του χρόνου. Αυτές οι εξελίξεις έχουν πραγματοποιηθεί εν μέρει για να μετριαστούν οι πιθανές κίνδυνοι που συνδέονται με τον ιό (84). Μια σημαντική παράμετρος ασφαλείας κατά το σχεδιασμό ενός συστήματος φακοϊκού φορέα για γονιδιακή θεραπεία είναι ο κίνδυνος ακούσιας δημιουργίας ενός προϊόντος ικανής για αναπαραγωγή. Με την μεταβολή αυτού του επικίνδυνου παθογόνου ιού σε φορέα γονιδιακής θεραπείας, έχουμε προχωρήσει σημαντικά στην κατανόηση και την ασφαλή χρήση των φακοϊών (83).

Τα τελευταία 20 χρόνια, η χρήση του lentiviral ως φορέα για την εισαγωγή υγιούς γονιδιακής πληροφορίας έχει αποδειχθεί τόσο ασφαλής όσο και αποτελεσματική, όπως επιβεβαιώνεται από προκλινικές και κλινικές μελέτες. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα επιτυχούς θεραπείας είναι η περίπτωση του πρώτου ασθενούς με δρεπανοκυτταρική αναιμία που υπήρξε αποδέκτης αυτής της. Στην εν λόγω θεραπεία, ο lentiviral φορέας μετέφερε το φυσιολογικό γονίδιο HBB, που κωδικοποιεί τη β-σφαιρίνη, σε αιμοποιητικά κύτταρα του ασθενούς. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την υψηλή παραγωγή φυσιολογικής β-σφαιρίνης στα ερυθρά αιμοσφαίρια του ασθενούς, 15 μήνες μετά την εφαρμογή της θεραπείας (Κλινική μελέτη NCT02151526) (88).

3.3 Επεξεργασία γονιδίου.

Σε αντίθεση με τις παραδοσιακές μεθόδους γονιδιακής θεραπείας, οι τεχνολογίες γονιδιακής επεξεργασίας προάγουν τη μόνιμη τροποποίηση των γονιδίων που ευθύνονται για ασθένειες, εκτελώντας ακριβή διόρθωση, διαγραφή, προσθήκη ή διακοπή συγκεκριμένων αλληλουχιών (89).

Μια στρατηγική γονιδιακής επεξεργασίας που πορωθεί ειδικά σχεδιασμένες νουκλεάσες, όπως οι νουκλεάσες τελεστών TAL (TALENs), οι νουκλεάσες δακτύλων ψευδαργύρου (ZFNs) και τα συστήματα CRISPR/Cas9, επιτρέπει τη δημιουργία σπασίματος του διπλού κλώνου DNA (DSB) σε καθορισμένη θέση. Αυτή η τεχνολογία προσφέρει τη δυνατότητα μόνιμης διόρθωσης μεταλλάξεων μέσω της δημιουργίας DSB, η οποία ακολουθείται από μη ομόλογη σύνδεση άκρων (NHEJ) ή επιδιόρθωση κατευθυνόμενη από ομολογία (HDR). Οι ZFN και TALEN διαθέτουν συγκεκριμένες περιοχές δέσμησης DNA και οι δύο χρησιμοποιούν την ενδονουκλεάση FokI για την διάσπαση του DNA. Όμως, ο προγραμματισμός αυτών των νουκλεασών είναι περίπλοκος, χρονοβόρος και συνιστά εξειδικευμένη

τεχνογνωσία. Αντιθέτως, το σύστημα CRISPR/Cas9 έχει αποδειχθεί ως η πιο ευέλικτη και αποτελεσματική κατηγορία προγραμματιζόμενων νουκλεασών τα τελευταία χρόνια (90).

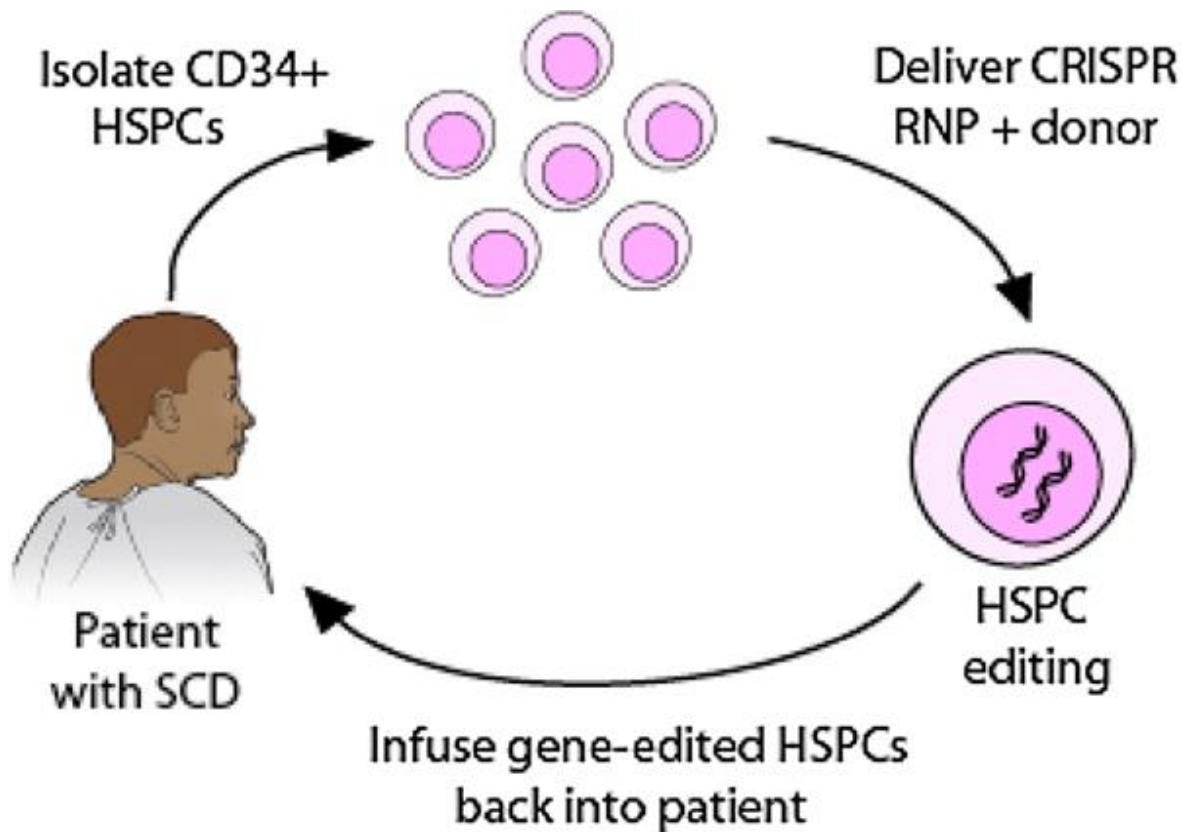
3.3.1 CRISPR/Cas9 system

Το σύστημα CRISPR/Cas9 χρησιμοποιεί αλληλουχίες οδηγού RNA (gRNA) που προσδένονται σε μια συγκεκριμένη θέση στόχο στο γονιδίωμα και συνεργάζονται με την ενδονουκλεάση Cas9. Η ενδονουκλεάση Cas9 καθοδηγείται προς τη συγκεκριμένη θέση στόχο μέσω της ομολογίας μεταξύ του gRNA και των αλληλουχιών του DNA στόχου.

Οι περισσότερες μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει το σύστημα CRISPR/Cas9 που δημιουργείται από το βακτήριο *Streptococcus pyogenes* (Spy Cas9). Με το πέρασμα του χρόνου, η ανάπτυξη και η βελτίωση του αντιδραστηρίου επεξεργασίας γονιδιώματος CRISPR/Cas9, καθώς και της μεθόδου παράδοσης, έχουν συμβάλει σε μεγάλο βαθμό στη βελτίωση της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας της γονιδιακής επεξεργασίας στα αιμοποιητικά αρχέγονα κύτταρα (91). Οι πρώτες προσπάθειες χρησιμοποίησαν ένα σύστημα προσαρμοσμένο σε πλασμιδιακό DNA για την έκφραση της Cas9 και του gRNA, το οποίο οδήγησε σε χαμηλή απόδοση επεξεργασίας και υψηλή τοξικότητα. Η ηλεκτροδιάτρηση με τη χρήση πρωτοκόλλου πυρηνολεξίας είναι συχνά η προτιμώμενη μέθοδος για την άμεση εισαγωγή των ριβονουκλεοπρωτεϊνών (RNP) στον πυρήνα των αιμοποιητικών αρχέγονων κυττάρων (HSPC), επιτρέποντας τους να αρχίσουν αμέσως την κοπή του γονιδιώματος. Η πλειονότητα των μελετών γονιδιακής επεξεργασίας έχει χρησιμοποιήσει τα RNP για να επιτύχει τη μέγιστη απόδοση επεξεργασίας και ειδικότητα, με την ελάχιστη δυνατή κυτταροτοξικότητα στα CD34+ HSPC (90).

Εν ολίγοις, η διαδικασία είναι η εξής:

Αρχικά, τα CD34+ HSPC απομονώνονται από έναν ασθενή με δρεπανοκυτταρική αναιμία από διάφορες πηγές του ανθρώπινου σώματος, όπως ο μυελός των οστών, ο ομφάλιος λώρος και το περιφερικό αίμα. Τα απομονωμένα CD34+ κύτταρα καλλιεργούνται για μερικές ημέρες με κυτοκίνες, καθώς αυτή η διαδικασία έχει αποδειχθεί ότι ενισχύει την ικανότητά τους για γενετική τροποποίηση. Στη συνέχεια, το σύμπλεγμα RNP (ριβονουκλεοπρωτεΐνη) του CRISPR, που περιλαμβάνει το καθοδηγούμενο RNA και την πρωτεΐνη Cas9, καθώς και το πρότυπο δότη DNA, παραδίδεται στους πυρήνες των HSPC μέσω ηλεκτροδιάτρησης για τη διόρθωση του γονιδίου. Τέλος, τα γονιδιακά επεξεργασμένα HSPC εγχέονται ξανά στον ασθενή με σκοπό την ανατροπή του φαινότυπου της νόσου (90).



Εικόνα 10. Επεξεργασία γονιδιώματος για τη θεραπεία της δρεπανοκυτταρικής νόσου. Αρχικά τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (CD34+ HSPCs) απομονώνονται από τον ασθενή από διάφορες πηγές του ανθρωπίνου σώματος (μυελό των οστών, σπλήνιο και φυσικά από το περιφερειακό αίμα). Τα απομονωμένα CD34+ κύτταρα παραμένουν σε καλλιεργητικό υλικό για μερικές ημέρες με κυτοκίνες. Το ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο (RNP) που αποτελείται από το CRISPR, το Cas9 και το πρότυπο τμήμα του DNA εισάγεται/παραδίδεται στα HSPCs μέσω ηλεκτροφόρησης για την διόρθωση του γονιδίου. Κατόπιν τα γονιδιακά τροποποιημένα HSPCs εγχέονται πίσω στον ασθενή προκειμένου να ολοκληρωθεί η διαδικασία της διόρθωσης.

Πηγή: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8049447/>

Με τη χρήση της μεθόδου CRISPR/Cas9, διορθώνεται η μετάλλαξη στο γονίδιο που προκαλεί την παραγωγή δρεπανοειδών ερυθροκυττάρων και ενισχύεται η παραγωγή της HbF.

3.3.2. BCL11A πρωτεΐνη

Η HbF και η παρουσία της είναι ένας κύριος τροποποιητής της κλινικής σοβαρότητας της δρεπανοκυτταρικής νόσου. Η επανενεργοποίηση της HbF μέσω στοχευμένης τροποποίησης γονιδίων που αφορά τη ρύθμιση της HbF αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη θεραπευτική τεχνική για την SCD. Μελέτες συσχέτισης σε όλο το γονιδίωμα που εξετάζουν άτομα με HPFH έχουν εντοπίσει πολλούς αιτιολογικούς γενετικούς τόπους, ενώ αρκετοί μεταγραφικοί παράγοντες εμπλέκονται έμμεσα στην αποσιώπηση της HbF. Η πρωτεΐνη BCL11A αναγνωρίζεται ως ο μείζων ρυθμιστής των επιπέδων της HbF, καταστέλλοντας την έκφρασή

της μέσω σύνδεσης με άλλους δεσμευμένους στο DNA παράγοντες σε αρκετές θέσεις του γονιδίου της β-σφαιρίνης. Αυτό περιλαμβάνει την άμεση καταστολή του προαγωγού HBG από τη BCL11A (92). Συνεπώς, η επανενεργοποίηση της HbF μέσω της αναστολής των μοτίβων δέσμευσης BCL11A αποτελεί έναν ελκυστικό και σαφή στόχο για τη γονιδιακή θεραπεία της SCD.

Μια προηγούμενη μελέτη των Humbert et al. επιβεβαίωσε το ρόλο της BCL11A ως αναστολέα της HbF και εκπόνησε μια μελέτη μεταμόσχευσης που επιβεβαίωσε την ιδέα, χρησιμοποιώντας το μοντέλο NHP και την τεχνολογία mRNA νουκλεάσης TALE για να στοχεύσει την κωδικοποιητική αλληλουχία της BCL11A (93). Ωστόσο, η BCL11A έχει διάφορους ρόλους σε διαφορετικές αιμοποιητικές σειρές, και οι παραλλαγές στην κωδικοποιητική της περιοχή είναι ιδιαίτερα επιβλαβείς. Αντίθετα, η φυσική γενετική τροποποίηση στον ενισχυτή της BCL11A είναι γενικά ανεκτή. Πολλές έρευνες έχουν επιβεβαιώσει τον ενισχυτή ερυθροειδών BCL11A ως στόχο για την αύξηση της HbF, παρέχοντας μια βάση για ερυθροειδή-ειδική γονιδιακή θεραπεία μέσω της στόχευσης των κρίσιμων αλληλουχιών του ενισχυτή BCL11A σε HSPCs. Για παράδειγμα, οι Canver et al. χρησιμοποίησαν CRISPR με συγκεντρωμένο gRNA για να επιτύχουν *in situ* κορεσμένη μεταλλαξογένεση, προκειμένου να μελετήσουν την οργάνωση και λειτουργία του ερυθροειδούς ενισχυτή BCL11A. Ένα μοτίβο GATA1, που αποτελεί τον πυρήνα του ενισχυτή, είναι απαραίτητο για την έκφραση του ανθρώπινου ερυθροειδούς BCL11A και την αναστολή της HbF.

Η διαταραχή του ενισχυτή με τη χρήση μεμονωμένων gRNAs σε πρωτογενείς πρόδρομες ερυθροειδείς προκαλεί σημαντική αύξηση της HbF, ενώ ταυτόχρονα διατηρεί την έκφραση και τη λειτουργία της BCL11A σε μη ερυθροειδή περιβάλλοντα (94). Οι Chang et al. και Psatha et al. πραγματοποίησαν άμεσες συγκρίσεις των λειτουργικών επιπτώσεων της εξωνικής διαταραχής του γονιδίου BCL11A σε σχέση με την τροποποίηση του ενισχυτή χρησιμοποιώντας την τεχνική ZFN σε ανθρώπινα βλαστικά αιμοποιητικά κύτταρα (HSPC). Η διακοπή του ενισχυτή BCL11A παρουσίασε επίπεδα επανενεργοποίησης της HbF που ήταν συγκρίσιμα με εκείνα που επιτυγχάνονται με το κωδικοποιητικό νοκ-άουτ (KO) του BCL11A, διατηρώντας ταυτόχρονα την ικανότητα των βλαστικών αιμοποιητικών κυττάρων (HSCs) να υποστηρίζουν τη λειτουργία τους, όπως η διαφοροποίηση, η ανασύσταση και η μακροπρόθεσμη ικανότητα μεταμόσχευσης (95, 96). Οι Wu et al. πέτυχαν σημαντικά αποτελεσματική γονιδιακή επεξεργασία σε θεραπευτικό επίπεδο σε βλαστικά αιμοποιητικά κύτταρα (HSPCs) χρησιμοποιώντας την τεχνική CRISPR/Cas9 για να διαταράξουν τη θέση δέσμευσης GATA1 στον ενισχυτή ερυθροειδών +58 BCL11A. Αυτή η παρέμβαση οδήγησε σε σημαντική μείωση της έκφρασης του γονιδίου BCL11A στα ερυθροειδή κύτταρα και σε

επαγωγή της εμβρυϊκής γ -σφαιρίνης, προσφέροντας θεραπευτικά οφέλη σε μεταμοσχεύματα HSCs από ασθενείς με δρεπανοκυτταρική νόσο. Το gRNA που στοχεύει απευθείας στον ενισχυτή +58 της BCL11A για τα ερυθροειδή κύτταρα παρήγαγε τα υψηλότερα επίπεδα επαγωγής HbF στους απογόνους των ερυθροειδών, συνοδευόμενο από υψηλό ρυθμό ιντελών. Σύμφωνα με την κλωνική ανάλυση των απογόνων των ερυθροειδών από CD34+ HSPCs που επεξεργάστηκαν στον ενισχυτή BCL11A, οι διαγονιδιακές τροποποιήσεις στη θέση διάσπασης οδήγησαν σε ισχυρή επαγωγή της γ -σφαιρίνης. Επεξεργασμένα ανθρώπινα CD34+ HSPC από ασθενείς με SCD μεταμοσχεύθηκαν σε ποντίκια NBSGW με ανοσοανεπάρκεια, προκειμένου να εξεταστεί η επίδραση της επεξεργασίας του ενισχυτή BCL11A στη μακροπρόθεσμη επιβίωση και λειτουργία των μεταμοσχευμένων βλαστικών αιμοποιητικών κυττάρων (HSCs). Τα ποντίκια NBSGW υποστήριζαν παρόμοια επίπεδα ανθρώπινου μυελοειδούς, λεμφοειδούς και ερυθροειδούς τύπου μεταμόσχευσης από τα επεξεργασμένα κύτταρα, σε σύγκριση με τα μη επεξεργασμένα. Αυτό επικύρωσε την αποτελεσματικότητα της γονιδιακής επεξεργασίας στις αυτοανανεούμενες βλαστικές αιμοποιητικές κυτταρικές γραμμές (HSCs). Οι συχνότητες Indel στον ενισχυτή BCL11A φάνηκαν σταθερές μετά τη δευτερογενή μεταμόσχευση, προάγοντα το γεγονός ότι η επεξεργασία του ενισχυτή BCL11A δεν επιδρά αρνητικά στη λειτουργία των HSCs (97).

Όσες έρευνες διεξήχθησαν στο παρελθόν έχουν καταγράψει μείωση των επιπέδων των θεραπευτικών αλληλόμορφων αφού πραγματοποιήθηκε η εμφύτευση, γεγονός που δημιουργεί αμφιβολίες για την ανθεκτικότητα της γονιδιακής επεξεργασίας στις μεταμοσχεύσεις. Η διατήρηση των επεξεργασμένων κυττάρων με ενισχυτή BCL11A υποδεικνύει ότι η στρατηγική γονιδιακής τροποποίησης μέσω NHEJ ενδέχεται να φαίνεται πιο αποτελεσματική σε σύγκριση με άλλες μεθόδους γονιδιακής επεξεργασίας που βασίζονται σε HDR ή MMEJ. Αυτό συμβαίνει επειδή το NHEJ είναι ενεργό σε όλα τα στάδια του κυτταρικού κύκλου, και τα HSC προτιμούν να υποβάλλονται σε NHEJ. Οι μελέτες των Park και Bao απέδειξαν ότι η επεξεργασία του ενισχυτή BCL11A με τη μέθοδο CRISPR/Cas9 αποτελεί μια αποτελεσματική θεραπευτική στρατηγική για την επίτευξη ενός ανθεκτικού επιπέδου επαγωγής HbF κατά τη μεταμόσχευση HSC. Η Vertex Pharmaceuticals και η CRISPR Therapeutics παρουσίασαν πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα στη κλινική δοκιμή Φάσης 1 (CTX001, clinicaltrials.gov), χρησιμοποιώντας την τεχνολογία CRISPR/Cas9 για την επεξεργασία του ερυθροειδούς ενισχυτή BCL11A με στόχο την πρόκληση της έκφρασης HbF (90).

3.3.3. Nanoparticles (Polymer, Au)

Νανοσωματίδια πολυμερών

Τα PNP είναι ένα μη ικό σύστημα μεταφοράς που έχει στεφθεί με επιτυχία όσον αφορά τη γενετική επεξεργασία λόγω της ικανότητάς τους να ενθυλακώνουν, να σταθεροποιούν και να προστατεύουν το γενετικό υλικό από την υποβάθμιση και την ανοσολογική αντίδραση. Τα σύμπλοκα νουκλεϊκού οξέος-PNP μπορούν να παραχθούν είτε μέσω μη ομοιοπολικής ενθυλάκωσης είτε μέσω ομοιοπολικής παραγωγοποίησης. Τα PNP είναι δομικά πιο ευέλικτα, καθώς μπορούν να κατασκευαστούν σε μια ευρύτερη ποικιλία χημικών μορφών, προσφέροντας τη δυνατότητα μεγαλύτερης εξειδίκευσης ανάλογα με τον ιστό.

Το πιο συνηθισμένο PNP είναι η πολυαιθυλενοϊμίνη (PEI). Έχει την ικανότητα να συμπυκνώνει και να ενθυλακώνει τα νουκλεϊκά οξέα με αποτελεσματικότητα εξαιτίας της υψηλής πυκνότητας φορτίου που διαθέτει. Παρ'όλα αυτά, τα PEI έχουν τοξικότητα λόγω της ισχυρής θετικής φόρτισης που φέρουν. Ως εκ τούτου, τα PEI χρησιμοποιούνται κυρίως για τη μεταφορά πλασμιδίων σε κύτταρα καλλιέργειας *in vitro*. Για τη μείωση της ανοσογονικότητας, την επιμήκυνση του χρόνου κυκλοφορίας στο σύστημα και τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας επεξεργασίας, μπορούν να προστεθούν μικρότερες μορφές PEI ή τμήματα όπως το PEG. Ένα ακόμα γνωστό PNP είναι το σύστημα νανοσωματιδίων παράδοσης πολλαπλών σταδίων (MDNP), το οποίο διαθέτει έναν κατιονικό πυρήνα και ένα αρνητικά φορτισμένο κέλυφος (98). Η αρνητική φόρτιση του κελύφους επιτρέπει τη μεγαλύτερη διάρκεια κυκλοφορίας στο σύστημα, ενώ η θετική φόρτιση του εσωτερικού διευκολύνει τη στενή σύνδεση και τη σταθεροποίηση των νουκλεϊκών οξέων που μεταφέρει.

Πολλές έρευνες αναδεικνύουν την αποτελεσματικότητα της χορήγησης CRISPR/Cas9 μέσω PNP τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Για παράδειγμα, το πολυαιθυλενογλυκόλη-β-πολυγαλακτικό-γλυκολικό οξύ (PEG-b-PLGA) έχει καταφέρει να παραδώσει επιτυχώς συστήματα CRISPR σε μακροφάγα. Επίσης, μια έρευνα που χρησιμοποίησε PEGylated κατιονικά νανοσωματίδια, γνωστά ως P-HNPs, πέτυχε 47,3% γονιδιακή τροποποίηση σε καλλιεργημένα κύτταρα και 35% σε μοντέλο ποντικού *in vivo*, με αποτέλεσμα την αναστολή της ανάπτυξης του όγκου (100). Ένα MDNP που μετέφερε dCas9-miR-524 λήφθηκε συστηματικά από ποντίκια, επιφέροντας αποτελεσματική αύξηση της έκφρασης του miR-524 και επιβράδυνση της ανάπτυξης του όγκου (98). Τελικά, χρησιμοποιήθηκε ένα νανοσωματίδιο πολυ (γαλακτικό-συν-γλυκολικό οξύ) (PLGA) για τη συστηματική μεταφορά νουκλεϊκών οξέων, πεπτιδίων που σχηματίζουν τρίπλεξ (εργαλείο ανασυνδυασμού) και DNA δότη, διευκολύνοντας την επεξεργασία του γονιδίου CCR5 σε μονοπύρηνα κύτταρα ανθρώπινου αίματος σε ανοσοανεπαρκή ποντίκια. Παρά την πρόοδο της τεχνολογίας,

προς το παρόν δεν υπάρχουν κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους που χρησιμοποιούν αυτή την προσέγγιση για την παροχή CRISPR (101).

Νανοσωματίδια Χρυσού

Τα νανοσωματίδια χρυσού (AuNPs) διαθέτουν έναν πυρήνα χρυσού, με μέγεθος που κυμαίνεται από μερικά έως πολλές εκατοντάδες νανόμετρα. Ο πυρήνας αυτός έχει την ικανότητα να επενδυθεί με συνθετικές ή βιολογικές ενώσεις. Οι επικαλυμμένες ενώσεις μπορούν να κάνουν σύζευξη είτε ομοιοπολικά είτε μη ομοιοπολικά με τα θεραπευτικά μόρια, όπως DNA, RNA και πρωτεΐνες (102). Τα φάρμακα που είναι συζευγμένα μη ομοιοπολικά μπορούν να απελευθερωθούν απλά μέσα στα κύτταρα-στόχους, ενώ για τα ομοιοπολικά συζευγμένα νανοσωματίδια χρυσού (AuNPs) απαιτείται ειδική μέθοδος διάσπασης. Αυτή η διαδικασία περιλαμβάνει μεθόδους όπως η απελευθέρωση με τη βοήθεια γλουταθειόνης και η θερμική πυροδότηση για την απελευθέρωση των φαρμάκων. Τα AuNP προσφέρουν πλεονεκτήματα λόγω της ευκολίας με την οποία μπορούν να συντεθούν σε διάφορα σχήματα και μεγέθη. Επιπλέον, μπορούν να προσαρμοστούν με διάφορα τμήματα για να ενισχύσουν την ειδικότητα και τη λειτουργικότητά τους, διαθέτουν θετικό φορτίο που διευκολύνει τη δέσμευση με DNA και RNA, και δεν είναι τοξικά. Σε σύγκριση με τα LNP και τα PNP, τα φορτία CRISPR προσκολλώνται στην επιφάνεια των AuNP, γεγονός που μπορεί να προκαλέσει μεγαλύτερη ανοσολογική αντίδραση στους ασθενείς. Παρόλα αυτά, η περιοχή δέσμευσης των φορτίων καλύπτεται από τα AuNP, κάνοντάς την λιγότερο ορατή από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Ακόμα, τα AuNPs θεωρούνται ότι διαθέτουν αντιφλεγμονώδη δράση, καθώς ο χρυσός λαμβάνεται για την ανακούφιση της φλεγμονής στη ρευματοειδή αρθρίτιδα. Επομένως, η ανοσογονικότητα ενδέχεται να μειωθεί στην *in vivo* χορήγηση που βασίζεται σε AuNPs, σε σχέση με την άμεση ένεση φαρμάκων (103).

Αν και τα AuNP δεν έχουν ακόμη ενταχθεί για τη χορήγηση CRISPR σε ανθρώπους, αρκετές έρευνες έχουν δείξει ότι είναι αποτελεσματικοί σε *in vitro* και *in vivo* συνθήκες. Ένας τρόπος χορήγησης CRISPR βασισμένος σε AuNP έχει επιτύχει ποσοστό απόδοσης παράδοσης 90% και ποσοστό επεξεργασίας έως 30% σε κυτταρική σειρά HeLa (104). Οι επιδόσεις επεξεργασίας ήταν παρόμοιες με αυτές της χορήγησης μέσω ηλεκτροδιάτρησης, υποδεικνύοντας ότι η χορήγηση CRISPR με βάση το AuNP ενδέχεται να είναι κατάλληλη για την επεξεργασία γονιδίων σε κύτταρα CD34+. Μια ενδομυϊκή ένεση CRISPR-AuNPs οδήγησε σε διόρθωση γονιδίου 5,4% *in vivo* σε ποντίκια με μυϊκή δυστροφία Duchenne (105). Τα AuNPs παρουσιάζουν σημαντικές προοπτικές ως μελλοντικό σύστημα παράδοσης

in vivo για τη θεραπεία της SCD. Ωστόσο, τα διαθέσιμα δεδομένα για τη χορήγηση εκτός στόχου, την ανοσογονικότητα και τις μακροπρόθεσμες επιδράσεις είναι περιορισμένα (103).

3.3.4. miRNAs για επανενεργοποίηση παραγωγής της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης (HbF)

Στο αίμα, τα miRNAs μελετήθηκαν σε αιμοπετάλια, λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, κοκκιοκύτταρα, ερυθρά αιμοσφαίρια (RBCs) και κατά τη διάρκεια των σταδίων της ερυθροποίησης. Τα miRNAs ρυθμίζουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες του κυττάρου σε εκπυρηνωμένα κύτταρα, όπως τα ερυθρά αιμοσφαίρια (RBCs) και τα αιμοπετάλια. Πάνω από 200 miRNAs έχουν ταυτοποιηθεί στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Έχουν παρατηρηθεί σημαντικές διαφορές στην έκφραση του miRNA σε ώριμα ερυθροκύτταρα HbSS. Η διαφορική έκφραση του miRNA στα ερυθροκύτταρα έχει προσφέρει νέες γνώσεις σχετικά με τις ασθένειες που επηρεάζουν τα ερυθροκύτταρα.

Η απορρύθμιση των miRNA μπορεί είτε να επιδεινώσει την κλινική σοβαρότητα της δρεπανοκυτταρικής νόσου (SCD) είτε να έχει θετική επίδραση. Τα miRNA μπορούν να ρυθμιστούν με τέτοιον τρόπο ώστε να ελαττώσουν τον ρυθμό του κυτταρικού κύκλου, να μειώσουν τα επίπεδα σιδήρου, να επιδράσουν στην αιμόλυση και το οξειδωτικό στρες, και κυρίως, να προάγουν την έκφραση του γονιδίου της γ-σφαιρίνης και να αναπτύξουν την αποτελεσματικότητα της υδροξυουρίας. Τα σημαντικά miRNA συνδέονται με τη προσαρμογή της σύνθεσης της HbF, τις ανωμαλίες που προκαλούνται από την αιμόλυση στην ερυθροποίηση, και άλλες ενισχυτικές επιδράσεις στην SCD, που ενδεχομένως να προσφέρουν νέους θεραπευτικούς στόχους (10).

miRNA-29b

Στους πρωτογενείς ερυθροειδείς προγόνους, το miRNA-29b, το οποίο λειτουργεί ως αναστολέας της μεθυλοτρανσφεράσης του DNA (DNMT), επανεκκινεί τη μεταγραφή του γονιδίου HBG και τη σύνθεση της HbF. Πειραματικές έρευνες έχουν δείξει ότι το miRNA-29b στοχεύει έναν από τους βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες, το ογκογονίδιο μυελοβλάστωσης (MYB), το οποίο διαθέτει κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της σίγησης του γονιδίου γ και σχετίζεται με περίπου 40% της κληρονομικής διακύμανσης της HbF (106, 107). Το MYB διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο ως πρωτεΐνη καταστολέας της HBG, και η υπερέκφραση του miRNA-29b, που καταστέλλει το MYB, θα μπορούσε να μεσολαβήσει στην επαγωγή της HbF. Σε μια μελέτη in vitro που διεξήγαγαν οι Starlard-Davenport et al., επιβεβαιώθηκε η δυνατότητα του miRNA-29b να μειώνει τη ρύθμιση του MYB, προκαλώντας έτσι την

παραγωγή HbF σε κύτταρα KU812. Ωστόσο, η συνδυασμένη θεραπεία miRNA-29b και υδροξυκαρβαμίδης δεν παρουσίασε πρόσθετη επαγωγή της HbF στους ερυθροειδείς προγόνους που παράχθηκαν από ενήλικα βλαστοκύτταρα CD34+.

Περαιτέρω, η έκφραση του miRNA-29b σε δικτυοερυθροκύτταρα σε μεγάλο ποσοστό που έχουν απομονωθεί από άτομα με SCD και παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα HbF προωθεί επιπλέον στοιχεία για τη σημασία αυτού του miRNA στην κλινική πράξη. Για την ανακάλυψη μιας αποτελεσματικής θεραπείας για την SCD, είναι απαραίτητο να αξιολογηθεί η ικανότητα του miRNA-29b να ενεργοποιεί τη μεταγραφή του γονιδίου HBG και την έκφραση της HbF σε προγόνους με SCD σε μελλοντικές μελέτες (108).

miRNA-15a/16-1 Cluster

Οι κατασταλτικές επιδράσεις των miRNA-15a και miRNA-16-1 στους βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες BCL11A, KLF1 και MYB κατά τη διάρκεια της έκφρασης του γονιδίου β-σφαιρίνης μπορεί να οδηγήσουν σε αύξηση της παραγωγής HbF (106). Τα αυξημένα επίπεδα των miRNA-15a και miRNA-16-1 οδηγούν στη μείωση της έκφρασης του παράγοντα MYB, ο οποίος είναι ένας σημαντικός αρνητικός ρυθμιστής της αιμοσφαιρίνης F (HbF). Ως αποτέλεσμα, καθυστερεί η μετάβαση από την εμβρυϊκή μορφή αιμοσφαιρίνης στην ενήλικη μορφή, με συνέπεια την παραμονή υψηλών επιπέδων HbF σε πρώιμους ερυθροειδείς προγόνους. Η στρατηγική της τροποποίησης της έκφρασης των καταστολέων της γ σφαιρίνης κατά τη διάρκεια της ερυθροποίησης έχει τη δυνατότητα να είναι αποτελεσματική ως νέα θεραπευτική προσέγγιση για την ενίσχυση της παραγωγής της HbF. Αυτό θα μπορούσε να βελτιώσει τις κλινικές επιπλοκές που αντιμετωπίζουν οι ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία (SCD), καθώς η αυξημένη παραγωγή της HbF συνήθως έχει ευεργετικά αποτελέσματα στη μείωση των συμπτωμάτων και των επιπλοκών της νόσου (10, 109).

4. Μελλοντικές Προσεγγίσεις

Λαμβάνοντας υπόψη ότι το συνολικό κόστος διαχείρισης ενός ασθενούς που ζει με SCD μέχρι την ηλικία των 50 ετών υπερβαίνει τα 8 εκατομμύρια δολάρια στις Η.Π.Α, το αρχικό υψηλό κόστος της HSCT ή της γονιδιακής θεραπείας/γονιδιακής επεξεργασίας θα πρέπει να είναι αποδεκτό και μια συντονισμένη προσπάθεια για τη διερεύνηση νέων οδών για τη θεραπεία ασθενών με SCD σε όλα τα μέρη του κόσμου είναι απαραίτητη (110). Αυτό πρέπει να περιλαμβάνει την ανάπτυξη ενός συστήματος παροχής γονιδιακής θεραπείας in vivo που παρακάμπτει την ανάγκη για αυτόλογη μεταμόσχευση και, ενδεχομένως, καθιστά δίκαιη την εφαρμογή σε παγκόσμιο επίπεδο.

Επιπλέον, η επένδυση στην ανακάλυψη νέων θεραπευτικών στόχων προσφέρει περισσότερες επιλογές για την επανενεργοποίηση της HbF χρησιμοποιώντας φαρμακολογικές προσεγγίσεις, όπως ρυθμιστές μικρών μορίων που στοχεύουν γονίδια τροποποίησης της HbF (111). Όπως αποδεικνύεται από την πρόσφατη γρήγορη ανάπτυξη και εφαρμογή των εμβολίων κατά του COVID-19, μια τέτοια προσπάθεια είναι δυνατή και πρέπει, όντως, να γίνει (112). Μαθαίνοντας από πρόσφατες αποτυχίες στην παγκόσμια διανομή εμβολίων κατά τη διάρκεια της πανδημίας COVID-19, αυτή η προσπάθεια θα πρέπει να συνοδεύεται από έναν μηχανισμό για την αντιμετώπιση της κρίσης της ισότητας με την ίδρυση κέντρων άριστης φροντίδας για την SCD, ιδιαίτερα στην Αφρική, και τη βοήθεια από διεθνείς οργανισμούς, όπως ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας. Αυτό πρέπει να υποστηριχθεί με συντονισμένες στρατηγικές από πολυάριθμα ενδιαφερόμενα μέρη, συμπεριλαμβανομένης της βιομηχανίας, των εθνικών κυβερνήσεων, ομάδων υποστήριξης ασθενών με SCD, επαγγελματικών εταιρειών, διεθνών φορέων και χρηματοδοτικών φορέων με επεκτεινόμενους μηχανισμούς, όπως για παράδειγμα η πρωτοβουλία Cure Sickle Cell που ξεκίνησε τον Σεπτέμβριο του 2018 από το National Heart Lung and Blood Institute, στις Η.Π.Α. Η διερεύνηση του γονιδιώματος στην SCD θα μπορούσε επίσης να βελτιώσει την κατανόησή μας για συγκεκριμένες καρδιαγγειακές επιπλοκές, όπως το εγκεφαλικό επεισόδιο ή η νεφρική νόσος, που είναι κοινές στην SCD και στο γενικό πληθυσμό. Επιπλέον, η επένδυση στη γονιδιωματική με σκοπό την ανάπτυξη νέων θεραπειών για την δρεπανοκυτταρική νόσο θα προσφέρει ένα πλαίσιο για την ανάπτυξη θεραπειών και για άλλες μονογονιδιακές ασθένειες (113).

5. Συμπεράσματα

Οι παραπάνω αναφορές αποσκοπούν στο να υπογραμμίσουν τη σημασία της ανάπτυξης της γονιδιακής θεραπείας για την αντιμετώπιση της δρεπανοκυτταρικής νόσου. Είναι επιτακτικό να εξεταστεί αυτή η ανάγκη, δεδομένου ότι οι υφιστάμενες θεραπευτικές μέθοδοι δεν παρέχουν ολοκληρωμένη λύση. Η ανάπτυξη της γονιδιακής θεραπείας αποτελεί σημαντικό τρόπο για να αντιμετωπιστεί αποτελεσματικά η νόσος. Η αναζήτηση λύσης σε αυτή την κατεύθυνση θα βοηθήσει περαιτέρω του ασθενείς με SCD. Με βάση την ανασκόπηση που παρατίθεται και τις τρέχουσες εξελίξεις, φαίνεται πως μια οριστική λύση είναι πολύ κοντά στο να επιτευχθεί σε παγκόσμιο επίπεδο.

Αναφορές

1. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sick cell disease. *Lancet*. 2010;376(9757):2018-31.
2. Piel FB, Steinberg MH, Rees DC. Sick Cell Disease. *N Engl J Med*. 2017;376(16):1561-73.
3. Herrick JB. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. *JAMA*. 2014;312(10):1063.
4. Pauling L, Itano HA, et al. Sick cell anemia a molecular disease. *Science*. 1949;110(2865):543-8.
5. Ingram VM. Abnormal human haemoglobins. I. The comparison of normal human and sickle-cell haemoglobins by fingerprinting. *Biochim Biophys Acta*. 1958;28(3):539-45.
6. Brandow AM, Liem RI. Advances in the diagnosis and treatment of sickle cell disease. *J Hematol Oncol*. 2022;15(1):20.
7. Yawn BP, Buchanan GR, Afenyi-Annan AN, Ballas SK, Hassell KL, James AH, et al. Management of sickle cell disease: summary of the 2014 evidence-based report by expert panel members. *JAMA*. 2014;312(10):1033-48.
8. Demirci S, Leonard A, Haro-Mora JJ, Uchida N, Tisdale JF. CRISPR/Cas9 for Sick Cell Disease: Applications, Future Possibilities, and Challenges. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1144:37-52.
9. Abraham AA, Tisdale JF. Gene therapy for sickle cell disease: moving from the bench to the bedside. *Blood*. 2021;138(11):932-41.
10. Cyrus C. The Role of miRNAs as Therapeutic Tools in Sick Cell Disease. *Medicina (Kaunas)*. 2021;57(10).
11. Strasser BJ. Linus Pauling's "molecular diseases": between history and memory. *Am J Med Genet*. 2002;115(2):83-93.
12. Ingram VM. Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. *Nature*. 1957;180(4581):326-8.
13. Perutz MF, Rossmann MG, Cullis AF, Muirhead H, Will G, North AC. Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-Å resolution, obtained by X-ray analysis. *Nature*. 1960;185(4711):416-22.
14. Ashley-Koch A, Yang Q, Olney RS. Sick hemoglobin (HbS) allele and sickle cell disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2000;151(9):839-45.
15. Kato GJ, Piel FB, Reid CD, Gaston MH, Ohene-Frempong K, Krishnamurti L, et al. Sick cell disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4:18010.
16. Serjeant GR. The natural history of sickle cell disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(10):a011783.
17. Esoh K, Wonkam-Tingang E, Wonkam A. Sick cell disease in sub-Saharan Africa: transferable strategies for prevention and care. *Lancet Haematol*. 2021;8(10):e744-e55.
18. Bookchin RM, Balazs T, Nagel RL, Tellez I. Polymerisation of haemoglobin SA hybrid tetramers. *Nature*. 1977;269(5628):526-7.
19. Piel FB, Patil AP, Howes RE, Nyangiri OA, Gething PW, Williams TN, et al. Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. *Nat Commun*. 2010;1:104.
20. Bunn HF. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N Engl J Med*. 1997;337(11):762-9.
21. Barabino GA, Platt MO, Kaul DK. Sick cell biomechanics. *Annu Rev Biomed Eng*. 2010;12:345-67.
22. Noguchi CT, Rodgers GP, Serjeant G, Schechter AN. Levels of fetal hemoglobin necessary for treatment of sickle cell disease. *N Engl J Med*. 1988;318(2):96-9.
23. Brittenham GM, Schechter AN, Noguchi CT. Hemoglobin S polymerization: primary determinant of the hemolytic and clinical severity of the sickling syndromes. *Blood*. 1985;65(1):183-9.

24. Ware RE, de Montalembert M, Tshilolo L, Abboud MR. Sick cell disease. *Lancet*. 2017;390(10091):311-23.
25. Manwani D, Frenette PS. Vaso-occlusion in sickle cell disease: pathophysiology and novel targeted therapies. *Blood*. 2013;122(24):3892-8.
26. Zhang D, Xu C, Manwani D, Frenette PS. Neutrophils, platelets, and inflammatory pathways at the nexus of sickle cell disease pathophysiology. *Blood*. 2016;127(7):801-9.
27. Kaul DK, Finnegan E, Barabino GA. Sick red cell-endothelium interactions. *Microcirculation*. 2009;16(1):97-111.
28. Sundd P, Gladwin MT, Novelli EM. Pathophysiology of Sickle Cell Disease. *Annu Rev Pathol*. 2019;14:263-92.
29. Belcher JD, Bryant CJ, Nguyen J, Bowlin PR, Kielbik MC, Bischof JC, et al. Transgenic sickle mice have vascular inflammation. *Blood*. 2003;101(10):3953-9.
30. Osarogiagbon UR, Choong S, Belcher JD, Vercellotti GM, Paller MS, Hebbel RP. Reperfusion injury pathophysiology in sickle transgenic mice. *Blood*. 2000;96(1):314-20.
31. Connes P, Lamarre Y, Waltz X, Ballas SK, Lemonne N, Etienne-Julan M, et al. Haemolysis and abnormal haemoreology in sickle cell anaemia. *Br J Haematol*. 2014;165(4):564-72.
32. Nourai M, Lee JS, Zhang Y, Kanas T, Zhao X, Xiong Z, et al. The relationship between the severity of hemolysis, clinical manifestations and risk of death in 415 patients with sickle cell anemia in the US and Europe. *Haematologica*. 2013;98(3):464-72.
33. Belcher JD, Chen C, Nguyen J, Milbauer L, Abdulla F, Alayash AI, et al. Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease. *Blood*. 2014;123(3):377-90.
34. Ghosh S, Adisa OA, Chappa P, Tan F, Jackson KA, Archer DR, et al. Extracellular heme crisis triggers acute chest syndrome in sickle mice. *J Clin Invest*. 2013;123(11):4809-20.
35. Almeida CB, Souza LE, Leonardo FC, Costa FT, Werneck CC, Covas DT, et al. Acute hemolytic vascular inflammatory processes are prevented by nitric oxide replacement or a single dose of hydroxyurea. *Blood*. 2015;126(6):711-20.
36. Gladwin MT, Ofori-Acquah SF. Erythroid DAMPs drive inflammation in SCD. *Blood*. 2014;123(24):3689-90.
37. Chen GY, Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(12):826-37.
38. Kato GJ, Steinberg MH, Gladwin MT. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. *J Clin Invest*. 2017;127(3):750-60.
39. Dutra FF, Bozza MT. Heme on innate immunity and inflammation. *Front Pharmacol*. 2014;5:115.
40. Chen G, Zhang D, Fuchs TA, Manwani D, Wagner DD, Frenette PS. Heme-induced neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of sickle cell disease. *Blood*. 2014;123(24):3818-27.
41. Schimmel M, Nur E, Biemond BJ, van Mierlo GJ, Solati S, Brandjes DP, et al. Nucleosomes and neutrophil activation in sickle cell disease painful crisis. *Haematologica*. 2013;98(11):1797-803.
42. Gladwin MT, Vichinsky E. Pulmonary complications of sickle cell disease. *N Engl J Med*. 2008;359(21):2254-65.
43. Vichinsky EP, Neumayr LD, Earles AN, Williams R, Lennette ET, Dean D, et al. Causes and outcomes of the acute chest syndrome in sickle cell disease. National Acute Chest Syndrome Study Group. *N Engl J Med*. 2000;342(25):1855-65.
44. Martins R, Maier J, Gorki AD, Huber KV, Sharif O, Starkl P, et al. Heme drives hemolysis-induced susceptibility to infection via disruption of phagocyte functions. *Nat Immunol*. 2016;17(12):1361-72.
45. Dutra FF, Alves LS, Rodrigues D, Fernandez PL, de Oliveira RB, Golenbock DT, et al. Hemolysis-induced lethality involves inflammasome activation by heme. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(39):E4110-8.

46. Stuart MJ, Nagel RL. Sickle-cell disease. *Lancet*. 2004;364(9442):1343-60.
47. Serjeant GR, Serjeant BE, Thomas PW, Anderson MJ, Patou G, Pattison JR. Human parvovirus infection in homozygous sickle cell disease. *Lancet*. 1993;341(8855):1237-40.
48. Ballas SK, Kesen MR, Goldberg MF, Luty GA, Dampier C, Osunkwo I, et al. Beyond the definitions of the phenotypic complications of sickle cell disease: an update on management. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:949535.
49. Balgir RS. Community expansion and gene geography of sickle cell trait and G6PD deficiency, and natural selection against malaria: experience from tribal land of India. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2012;10(1):3-13.
50. Glassberg J. Evidence-based management of sickle cell disease in the emergency department. *Emerg Med Pract*. 2011;13(8):1-20; quiz
51. Boyd JH, Macklin EA, Strunk RC, DeBaun MR. Asthma is associated with acute chest syndrome and pain in children with sickle cell anemia. *Blood*. 2006;108(9):2923-7.
52. Wood JC, Cohen AR, Pressel SL, Aygun B, Imran H, Luchtman-Jones L, et al. Organ iron accumulation in chronically transfused children with sickle cell anaemia: baseline results from the TWITCH trial. *Br J Haematol*. 2016;172(1):122-30.
53. Jayaraman S, Chalabi Z, Perel P, Guerriero C, Roberts I. The risk of transfusion-transmitted infections in sub-Saharan Africa. *Transfusion*. 2010;50(2):433-42.
54. Ware RE. How I use hydroxyurea to treat young patients with sickle cell anemia. *Blood*. 2010;115(26):5300-11.
55. Steinberg MH, Barton F, Castro O, Pegelow CH, Ballas SK, Kutlar A, et al. Effect of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia: risks and benefits up to 9 years of treatment. *JAMA*. 2003;289(13):1645-51.
56. Wang WC, Ware RE, Miller ST, Iyer RV, Casella JF, Minniti CP, et al. Hydroxycarbamide in very young children with sickle-cell anaemia: a multicentre, randomised, controlled trial (BABY HUG). *Lancet*. 2011;377(9778):1663-72.
57. Quinn CT. L-Glutamine for sickle cell anemia: more questions than answers. *Blood*. 2018;132(7):689-93.
58. Ballas SK. The Evolving Pharmacotherapeutic Landscape for the Treatment of Sickle Cell Disease. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2020;12(1):e2020010.
59. Minniti CP. L-Glutamine and the Dawn of Combination Therapy for Sickle Cell Disease. *N Engl J Med*. 2018;379(3):292-4.
60. Niihara Y, Miller ST, Kanter J, Lanzkron S, Smith WR, Hsu LL, et al. A Phase 3 Trial of L-Glutamine in Sickle Cell Disease. *N Engl J Med*. 2018;379(3):226-35.
61. Gluckman E, Cappelli B, Bernaudin F, Labopin M, Volt F, Carreras J, et al. Sickle cell disease: an international survey of results of HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2017;129(11):1548-56.
62. Walters MC, De Castro LM, Sullivan KM, Krishnamurti L, Kamani N, Bredeson C, et al. Indications and Results of HLA-Identical Sibling Hematopoietic Cell Transplantation for Sickle Cell Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22(2):207-11.
63. Dallas MH, Triplett B, Shook DR, Hartford C, Srinivasan A, Laver J, et al. Long-term outcome and evaluation of organ function in pediatric patients undergoing haploidentical and matched related hematopoietic cell transplantation for sickle cell disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013;19(5):820-30.
64. Angelucci E, Matthes-Martin S, Baronciani D, Bernaudin F, Bonanomi S, Cappellini MD, et al. Hematopoietic stem cell transplantation in thalassemia major and sickle cell disease: indications and management recommendations from an international expert panel. *Haematologica*. 2014;99(5):811-20.
65. Kamani NR, Walters MC, Carter S, Aquino V, Brochstein JA, Chaudhury S, et al. Unrelated donor cord blood transplantation for children with severe sickle cell disease: results of one cohort from the phase II study from the Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network (BMT CTN). *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18(8):1265-72.

66. Shenoy S, Eapen M, Panepinto JA, Logan BR, Wu J, Abraham A, et al. A trial of unrelated donor marrow transplantation for children with severe sickle cell disease. *Blood*. 2016;128(21):2561-7.
67. Kay MA. State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead. *Nat Rev Genet*. 2011;12(5):316-28.
68. In: Lenzi RN, Altevogt BM, Gostin LO, editors. Oversight and Review of Clinical Gene Transfer Protocols: Assessing the Role of the Recombinant DNA Advisory Committee. The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health. Washington (DC)2014.
69. In: Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, editors. Retroviruses. Cold Spring Harbor (NY)1997.
70. Murray N, Serjeant BE, Serjeant GR. Sickle cell-hereditary persistence of fetal haemoglobin and its differentiation from other sickle cell syndromes. *Br J Haematol*. 1988;69(1):89-92.
71. Perumbeti A, Higashimoto T, Urbinati F, Franco R, Meiselman HJ, Witte D, et al. A novel human gamma-globin gene vector for genetic correction of sickle cell anemia in a humanized sickle mouse model: critical determinants for successful correction. *Blood*. 2009;114(6):1174-85.
72. Pestina TI, Hargrove PW, Jay D, Gray JT, Boyd KM, Persons DA. Correction of murine sickle cell disease using gamma-globin lentiviral vectors to mediate high-level expression of fetal hemoglobin. *Mol Ther*. 2009;17(2):245-52.
73. Nagel RL, Bookchin RM, Johnson J, Labie D, Wajcman H, Isaac-Sodeye WA, et al. Structural bases of the inhibitory effects of hemoglobin F and hemoglobin A2 on the polymerization of hemoglobin S. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(2):670-2.
74. Pawliuk R, Westerman KA, Fabry ME, Payen E, Tighe R, Bouhassira EE, et al. Correction of sickle cell disease in transgenic mouse models by gene therapy. *Science*. 2001;294(5550):2368-71.
75. Kanter J, Walters MC, Krishnamurti L, Mapara MY, Kwiatkowski JL, Rifkin-Zenenberg S, et al. Biologic and Clinical Efficacy of LentiGlobin for Sickle Cell Disease. *N Engl J Med*. 2022;386(7):617-28.
76. McCune SL, Reilly MP, Chomo MJ, Asakura T, Townes TM. Recombinant human hemoglobins designed for gene therapy of sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(21):9852-6.
77. Levasseur DN, Ryan TM, Pawlik KM, Townes TM. Correction of a mouse model of sickle cell disease: lentiviral/antisickling beta-globin gene transduction of unmobilized, purified hematopoietic stem cells. *Blood*. 2003;102(13):4312-9.
78. Romero Z, Urbinati F, Geiger S, Cooper AR, Wherley J, Kaufman ML, et al. beta-globin gene transfer to human bone marrow for sickle cell disease. *J Clin Invest*. 2013;123(8):3317-30.
79. Morgan RA, Unti MJ, Aleshe B, Brown D, Osborne KS, Koziol C, et al. Improved Titer and Gene Transfer by Lentiviral Vectors Using Novel, Small beta-Globin Locus Control Region Elements. *Mol Ther*. 2020;28(1):328-40.
80. Han J, Tam K, Ma F, Tam C, Aleshe B, Wang X, et al. beta-Globin Lentiviral Vectors Have Reduced Titers due to Incomplete Vector RNA Genomes and Lowered Virion Production. *Stem Cell Reports*. 2021;16(1):198-211.
81. Urbinati F, Campo Fernandez B, Masiuk KE, Poletti V, Hollis RP, Koziol C, et al. Gene Therapy for Sickle Cell Disease: A Lentiviral Vector Comparison Study. *Hum Gene Ther*. 2018;29(10):1153-66.
82. Vogt PK. Historical Introduction to the General Properties of Retroviruses. In: Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, editors. Retroviruses. Cold Spring Harbor (NY)1997.
83. Bulcha JT, Wang Y, Ma H, Tai PWL, Gao G. Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1):53.
84. Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*. 1996;272(5259):263-7.
85. Zhu Y, Feuer G, Day SL, Wrzesinski S, Planelles V. Multigene lentiviral vectors based on differential splicing and translational control. *Mol Ther*. 2001;4(4):375-82.

86. Brooks SP, Lampi BJ. Time course of enzyme changes after a switch from a high-fat to a low-fat diet. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 1997;118(2):359-65.
87. Rausell A, Munoz M, Martinez R, Roger T, Telenti A, Ciuffi A. Innate immune defects in HIV permissive cell lines. *Retrovirology.* 2016;13(1):43.
88. Ribeil JA, Hacein-Bey-Abina S, Payen E, Magnani A, Semeraro M, Magrin E, et al. Gene Therapy in a Patient with Sickle Cell Disease. *N Engl J Med.* 2017;376(9):848-55.
89. Cox DB, Platt RJ, Zhang F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat Med.* 2015;21(2):121-31.
90. Park SH, Bao G. CRISPR/Cas9 gene editing for curing sickle cell disease. *Transfus Apher Sci.* 2021;60(1):103060.
91. Lattanzi A, Meneghini V, Pavani G, Amor F, Ramadier S, Felix T, et al. Optimization of CRISPR/Cas9 Delivery to Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells for Therapeutic Genomic Rearrangements. *Mol Ther.* 2019;27(1):137-50.
92. Liu N, Hargreaves VV, Zhu Q, Kurland JV, Hong J, Kim W, et al. Direct Promoter Repression by BCL11A Controls the Fetal to Adult Hemoglobin Switch. *Cell.* 2018;173(2):430-42 e17.
93. Humbert O, Peterson CW, Norgaard ZK, Radtke S, Kiem HP. A Nonhuman Primate Transplantation Model to Evaluate Hematopoietic Stem Cell Gene Editing Strategies for beta-Hemoglobinopathies. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2018;8:75-86.
94. Canver MC, Smith EC, Sher F, Pinello L, Sanjana NE, Shalem O, et al. BCL11A enhancer dissection by Cas9-mediated in situ saturating mutagenesis. *Nature.* 2015;527(7577):192-7.
95. Chang KH, Smith SE, Sullivan T, Chen K, Zhou Q, West JA, et al. Long-Term Engraftment and Fetal Globin Induction upon BCL11A Gene Editing in Bone-Marrow-Derived CD34(+) Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2017;4:137-48.
96. Psatha N, Reik A, Phelps S, Zhou Y, Dalas D, Yannaki E, et al. Disruption of the BCL11A Erythroid Enhancer Reactivates Fetal Hemoglobin in Erythroid Cells of Patients with beta-Thalassemia Major. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2018;10:313-26.
97. Wu Y, Zeng J, Roscoe BP, Liu P, Yao Q, Lazzarotto CR, et al. Highly efficient therapeutic gene editing of human hematopoietic stem cells. *Nat Med.* 2019;25(5):776-83.
98. Liu Q, Zhao K, Wang C, Zhang Z, Zheng C, Zhao Y, et al. Multistage Delivery Nanoparticle Facilitates Efficient CRISPR/dCas9 Activation and Tumor Growth Suppression In Vivo. *Adv Sci (Weinh).* 2019;6(1):1801423.
99. Luo YL, Xu CF, Li HJ, Cao ZT, Liu J, Wang JL, et al. Macrophage-Specific in Vivo Gene Editing Using Cationic Lipid-Assisted Polymeric Nanoparticles. *ACS Nano.* 2018;12(2):994-1005.
100. Wang HX, Song Z, Lao YH, Xu X, Gong J, Cheng D, et al. Nonviral gene editing via CRISPR/Cas9 delivery by membrane-disruptive and endosomolytic helical polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(19):4903-8.
101. McNeer NA, Schleifman EB, Cuthbert A, Brehm M, Jackson A, Cheng C, et al. Systemic delivery of triplex-forming PNA and donor DNA by nanoparticles mediates site-specific genome editing of human hematopoietic cells in vivo. *Gene Ther.* 2013;20(6):658-69.
102. Roca M, Haes AJ. Probing cells with noble metal nanoparticle aggregates. *Nanomedicine (Lond).* 2008;3(4):555-65.
103. Germino-Watnick P, Hinds M, Le A, Chu R, Liu X, Uchida N. Hematopoietic Stem Cell Gene-Addition/Editing Therapy in Sickle Cell Disease. *Cells.* 2022;11(11).
104. Ding Y, Jiang Z, Saha K, Kim CS, Kim ST, Landis RF, et al. Gold nanoparticles for nucleic acid delivery. *Mol Ther.* 2014;22(6):1075-83.
105. Lee K, Conboy M, Park HM, Jiang F, Kim HJ, Dewitt MA, et al. Nanoparticle delivery of Cas9 ribonucleoprotein and donor DNA in vivo induces homology-directed DNA repair. *Nat Biomed Eng.* 2017;1:889-901.
106. Sankaran VG, Menne TF, Scepanovic D, Vergilio JA, Ji P, Kim J, et al. MicroRNA-15a and -16-1 act via MYB to elevate fetal hemoglobin expression in human trisomy 13. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(4):1519-24.

107. Mnika K, Mazandu GK, Jonas M, Pule GD, Chimusa ER, Hanchard NA, et al. Hydroxyurea-Induced miRNA Expression in Sickle Cell Disease Patients in Africa. *Front Genet.* 2019;10:509.
108. Starlard-Davenport A, Smith A, Vu L, Li B, Pace BS. MIR29B mediates epigenetic mechanisms of HBG gene activation. *Br J Haematol.* 2019;186(1):91-100.
109. Saki N, Abroun S, Soleimani M, Kavianpour M, Shahjahani M, Mohammadi-Asl J, et al. MicroRNA Expression in beta-Thalassemia and Sickle Cell Disease: A Role in The Induction of Fetal Hemoglobin. *Cell J.* 2016;17(4):583-92.
110. Leonard A, Tisdale J, Abraham A. Curative options for sickle cell disease: haploidentical stem cell transplantation or gene therapy? *Br J Haematol.* 2020;189(3):408-23.
111. Yu L, Myers G, Engel JD. Small molecule therapeutics to treat the beta-globinopathies. *Curr Opin Hematol.* 2020;27(3):129-40.
112. Makoni M. The quest for more COVID-19 vaccinations in Africa. *Lancet Respir Med.* 2022;10(7):e70-e1.
113. Wonkam A. The future of sickle cell disease therapeutics rests in genomics. *Dis Model Mech.* 2023;16(2).

Πίνακας Αναφοράς Εικόνων

Εικόνα 1. Οι μικροφωτογραφίες απεικονίζουν τις ιδιόμορφες επιμήκεις μορφές των κόκκινων σωματιδίων. Περιστασικές μορφές σκιάς εμφανίζονται με λίγα εμπύρρινα ερυθρά. οι παραλλαγές στο σχήμα και το μέγεθος φαίνονται καλύτερα στο χαμηλής κατανάλωσης σχήμα.	6
Εικόνα 2. Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης των Pauling et al.	7
Εικόνα 3. Η παγκόσμια κατανομή της SCD με το μέγεθος των χωρών να κλιμακώνεται με τον αριθμό των ετήσιων γεννήσεων	9
Εικόνα 4. Η μοριακή παθοφυσιολογία της δρεπανοκυτταρικής νόσου	10
Εικόνα 5. Επιπλοκές της νόσου.....	16
Εικόνα 6. Η παθοφυσιολογία του οξέος θωρακικού συνδρόμου	18
Εικόνα 7. Κλινικές ενδείξεις που επηρεάζουν την απόφαση για μετάγγιση σε ασθενή με ΔΝ.....	23
Εικόνα 8. Η αλλαγή στο επίχρισμα περιφερικού αίματος με τη θεραπεία με υδροξυουρία	25
Εικόνα 9. Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού δράσης της γλουταμίνης	26
Εικόνα 10. Επεξεργασία γονιδιώματος για τη θεραπεία της δρεπανοκυτταρικής νόσου ...	35